

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANA BİLİM DALI**



**SALMONELLA'NIN LAMP YÖNTEMİ İLE TESPİTİ İÇİN
TANI PROTOTİPİ GELİŞTİRİLMESİ VE BU PROTOTİPİN
TANISAL DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Gülnur SERDAR

Danışman

Prof. Dr. Oktay GENÇ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Kurulu tarafından PYO.VET.1904.19.008 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığımı taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

26/12/2022
Gülnur SERDAR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : SALMONELLA'NIN LAMP YÖNTEMİ İLE TESPİTİ İÇİN TANI PROTOTİPİ GELİŞTİRİLMESİ VE BU PROTOTİPİN TANISAL DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 24/06/2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 9

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

26/12/2022
Prof. Dr. Oktay GENÇ

ÖZET

SALMONELLA'NIN LAMP YÖNTEMİ İLE TESPİTİ İÇİN TANI PROTOTİPİ GELİŞTİRİLMESİ VE BU PROTOTİPİN TANISAL DEĞERİNİN

ARAŞTIRILMASI

Gülnur SERDAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Aralık/2022

Danışman: Prof. Dr. Oktay GENÇ

Salmonellozis, *Salmonella* cinsi bakterilerin neden olduğu insan ve hayvanlarda görülen bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık tüm evcil hayvan türlerini etkilemekle birlikte; genç, gebe ve laktasyondaki hayvanlar hastalığa karşı daha duyarlıdır. En sık görülen klinik belirti enteritistir, bununla birlikte akut septisemi, abort, artrit ve solunum sistemi hastalıkları da görülebilmektedir.

Salmonella'nın neden olduğu enfeksiyonların tanısı için çok sayıda moleküler teşhis yöntemi mevcuttur. Ancak kullanım kolaylığı, uzun zaman gerektirmemesi ve bir uzmana ihtiyaç duyulmaması, LAMP yöntemini sınırlı imkanlarda öne çıkarmaktadır. LAMP tekniği, reaksiyon bileşenlerinin izotermal koşullara tabi tutulduğu ve tüm amplifikasyon ve tespit işlemlerinin tek bir adımda gerçekleştirildiği, basitliği ile karakterize bir yöntemdir. LAMP metodu, *Bsm* (*Bacillus subtilis*) veya *Bst* (*Bacillus sterotermophilus*) polimeraz enziminin izotermal iplikçik-yer değiştirme aktivitesine dayanmaktadır.

Bu çalışmada, Salmonellanın nükleik asit amplifikasyon temelli yöntemler (PCR, RT-PCR) yerine; hızlı, kolay ve saha koşullarında kullanımı mümkün LAMP yöntemiyle değerlendirilmesi için tanı prototipi geliştirilmesi amaçlandı. *Salmonella*'nın cins düzeyinde tanımlanması amacıyla yaygın olarak kullanılan *invaziv A (invA)* geni tercih edildi. LAMP testinde primer tasarımı için, <https://primerexplorer.jp/e/> web sayfası PrimerExplorerV5 yazılımından yararlanıldı.

Bu çalışmada, LAMP reaksiyonu 65°C sıcaklıkta 60dk'da gerçekleştirildi ve sonuçlar hem elektroforez ile hem de SYBR Green I boyası kullanılarak görsel hale getirildi. LAMP testinin saptanabilir limiti *S. Enteritidis* için 3.66×10^2 cfu/ml olarak belirlenirken, PCR ve RT-PCR testlerinin saptanabilir limiti sırasıyla 3.66×10^4 cfu/ml ve 3.66×10^3 cfu/ml olarak tespit edildi. LAMP testinin özgülüğü ise %100 olarak belirlendi.

Sonuç olarak, gelecek dönemde LAMP testinin standardizasyon çalışmalarının sürdürülmesi ve saha validasyonunun yapılarak testin diyagnostik performansının belirlenmesi konusunda planlama yapıldı.

Anahtar Sözcükler: Salmonellozis, LAMP, PCR, tanı

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC PROTOTYPE FOR DETECTION OF SALMONELLA BY THE LAMP METHOD AND INVESTIGATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF THIS PROTOTYPE

Gülnur SERDAR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Veterinary Microbiology

Ph.D., December/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Oktay GENÇ

Salmonellosis is a contagious disease of humans and animals caused by *Salmonella* bacteria. Although the disease affects all types of animals; young, pregnant and lactating animals are more susceptible to the disease. The most common clinical symptom is enteritis, however, acute septicemia, abortion, arthritis and respiratory tract diseases can also be seen.

There are many molecular diagnostic methods for the diagnosis of infections caused by *Salmonella*. However, the ease of use, not the requirement of a long time, and no need for an expert, make the LAMP method stand out in limited opportunities. The LAMP technique is a method characterized by its simplicity, in which the reaction components are subjected to isothermal conditions and all amplification and detection processes are performed in a single step. The LAMP method is based on the isothermal strand-displacement activity of the *Bsm* (*Bacillus subtilis*) or *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) polymerase enzyme.

In this thesis, it was aimed to develop a method that can detect *Salmonella* quickly and easily under limited conditions and also differentiate pathogen/apathogen to investigate alternatives to nucleic acid amplification-based methods (PCR, qPCR,). The *invA* gene, which is widely used for identification of *Salmonella* at genus level, was preferred. For the primer design in the LAMP test, the <https://primerexplorer.jp/e/> web page PrimerExplorerV5 software was used.

In this study, the LAMP reaction was performed at 65°C for 60 minutes and the results were visualized by both electrophoresis and SYBR Green I. The detectable limit of the LAMP test was determined as 3.66×10^2 cfu/ml for *S. Enteritidis*, while the limit of PCR and RT-PCR tests were determined as 3.66×10^4 cfu/ml and 3.66×10^3 cfu/ml, respectively. The specificity of the LAMP test was determined as 100%.

As a result, planning was made to continue the standardization studies of the LAMP test in the future and to determine the diagnostic performance of the test by performing field validation.

Keywords: Salmonellosis, LAMP, PCR, diagnosis

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her zaman bilgi ve desteğiyle yanımda olan, çalışmalarım konusunda beni yönlendirip, gereğinde motive eden ve doktora öğrenimim boyunca bana çok değerli katkılarda bulunan sayın danışman hocam Prof. Dr. Oktay GENÇ'e, ekonomik katkıları nedeniyle Ondokuz Mayıs Üniversitesi ve Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne, teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımın ilk gününden itibaren tüm çalışmalarım ve hayatımda büyük özveri ile yanımda olan sevgili eşim Ali SERDAR'a ve ailemize bu süreçte dahil olan biricik oğlum Mehmet Kağan SERDAR ile biricik kızlarım Mahinur Ela SERDAR ve Amine Güneş SERDAR'a minnettarlığımı sunarım.

Tüm eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan, haklarımı hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Nuriye ATALAR'a ve canım babam merhum B.Ali ATALAR'a yürekten sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.19.008 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Veteriner Hekim
Gülner SERDAR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Salmonellosis	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	4
2.1.3. Epidemiyoloji ve Klinik Bulgular	7
2.1.4. Patogenez	8
2.1.5. Tanı	10
2.1.5.1. Bakteri Kültürü.....	12
2.1.5.2. İmmunolojik ve Nükleik Asit Tabanlı Tanı Yöntemleri	14
2.1.5.3. Serolojik Tanı Yöntemleri	14
2.1.6. Koruma ve Kontrol.....	16
2.1.7. İnsanlarda <i>Salmonella</i> Enfeksiyonları.....	17
2.1.8. Sığırlarda <i>Salmonella</i> Enfeksiyonları.....	18
2.1.9. Koyunlarda <i>Salmonella</i> Enfeksiyonları.....	19
2.2. Salmonellosisin Tanısında Kullanılan DNA-RNA Tabanlı Yöntemler	21
2.2.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon(FISH)	21
2.2.2. DNA Mikroarray	22
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR)	23
2.2.4. İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP).....	25
2.2.4.1. LAMP Prensibi.....	26
2.2.4.2. Loop Primerler.....	29
2.2.4.3. LAMP Reaksiyonunda Kullanılan Enzimler (<i>Bst</i> - <i>Bsm</i> DNA Polimeraz) .	31
2.2.4.4. LAMP Reaksiyonu Aşamaları.....	31
2.2.4.5. LAMP Amplifikasyon Ürünlerinin Tespiti	32
2.2.4.6. LAMP Primer Dizayını.....	33
2.2.4.7. Reverse Transcriptase-Qualitative LAMP (RT-Q- LAMP)	37
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Referans Suşlar.....	39
3.1.2. Primerler.....	39
3.1.3. qRT-PCR Reaktifleri.....	40
3.1.4. Konvansiyonel PCR Bileşenleri.....	40
3.1.5. Jel Yükleme Tamponu	40
3.1.6. Agaroz Jel.....	41
3.1.7. Örnek Yükleme Boyası (DNA gel Loading Dye)	41
3.1.8. Belirteçler (DNA Ladder)	41
3.2. Metot	41
3.2.1. Bakteri Standart Suşlarının Canlandırılması	41
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu	41
3.2.3. Konvansiyonel PCR Optimizasyonu.....	41
3.2.3.1. Konvansiyonel PCR Uygulaması	42
3.2.3.2. PCR Ürünlerinin Analizi	43

3.2.4. Real Time (RT)-PCR Uygulaması	43
3.2.5. LAMP Optimizasyon Denemeleri	43
3.2.5.1. Primer Seçimi ve Hazırlığı	43
3.2.5.2. LAMP İçin Mastermiks Hazırlanması	44
4. BULGULAR	46
4.1. Genomik DNA Konsantrasyon Tayini	46
4.2. Referans <i>Salmonella invA</i> Geninin Konvansiyonel PCR ile Saptanması	46
4.3. Real Time (RT)-PCR İle Duyarlılığın Belirlenmesi	47
4.4. <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>invA</i> Geni LAMP Optimizasyonu	49
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	73



SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
B3	: Backward Outer Primer
BIP	: Backward Inner Primer
Ct	: Threshold Cycle
DIG	: Digoksinin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
F3	: Forward Outer Primer
FIP	: Forward Inner Primer
FISH	: Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
FRET	: Forster Rezonans Enerji Transferi
GC	: Guanin Sitozin
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
IMS	: Immuno Magnetic Separation
ISO	: International Standardization Organization
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
LAMP	: Loop Mediated Isothermal Amplification
LB	: Loop Backward
LF	: Loop Forward
LPS	: Lipopolisakkarit
MBP	: Maltose Binding Protein
MLST	: Multi-Locus Sequence Typing
MRSV	: Modified Semi-Solid Rappaport Vasiliadis
NASBA	: Nükleik Asit Dizisi Bazlı Amplifikasyon
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NSB	: Non Specific Binding

PCR	: Polimerase Chain Reaction
mRNA	: messenger Ribonükleikasit
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
rt-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RT-Q-LAMP	: Reverse Transcriptase-Qualitative-Lamp
SAO	: Salmonella Enterica Serovar Abortusovis
SAT	: Serum Agglutination Test
TBE	: Tris-Borat-EDTA
Tm	: Melting Temperature
TSI	: Triple Sugar Iron Agar
WHO	: World Health Organisation
XLD	: Ksiloz-Lizin Deoksikolat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Salmonella</i> spp'nin elektron mikroskopik görünümü.....	5
Şekil 2.2. LAMP primerlerinin tasarımı	26
Şekil 2.3. LAMP reaksiyonu için gerekli olan, hedef gen üzerindeki altı farklı nükleotid dizisini tanıyan dört primerin şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.4. LAMP reaksiyonunun aşamalarının şematik gösterimi.....	28
Şekil 2.5. LAMP reaksiyonunun ana amplifikasyon ürünleri olan tersine çevrilmiş tekrarlı konkatamerlerin şematik gösterimi	29
Şekil 2.6. Bir LAMP reaksiyonu sırasında oluşturulan iki kök halka yapısının (“dambıl” yapıları olarak da adlandırılır) şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.7. LAMP Reaksiyonu	32
Şekil 2.8. Bir LAMP primer tasarımında primerler arasındaki mesafe	37
Şekil 4.1. <i>invA</i> geninin amplifikasyonunu hedefleyen PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü.....	46
Şekil 4.2. <i>S. Enteritidis</i> identifikasyonunda Konvansiyonel PCR testinin duyarlılığının belirlenmesi	47
Şekil 4.3. <i>Salmonella</i> primerlerinin erime ısı düzeylerinin tespiti.....	48
Şekil 4.4. <i>Salmonella</i> CT değerlerinin belirlenmesi	48
Şekil 4.5. LAMP testinin <i>S. Enteritidis</i> identifikasyonu için duyarlılığının belirlenmesi.....	49
Şekil 4.6. LAMP testinin <i>S. Enteritidis</i> identifikasyonu için duyarlılığının SYBR Green I ile belirlenmesi.	50
Şekil 4.7. LAMP testinin <i>S. Enteritidis</i> identifikasyonu için özgülüğünün belirlenmesi.....	50
Şekil 4.8. LAMP testinin <i>S. Enteritidis</i> identifikasyonu için özgülüğünün SYBR Green I ile belirlenmesi	51
Şekil 4.9. <i>S. Enteritidis</i> 'in LAMP testi ile 1/10 alt dilüsyonu yapılarak duyarlılığının belirlenmesi	51
Şekil 4.10. <i>S. Enteritidis</i> LAMP testi sonucunun 1/10 alt dilüsyonu yapılarak SYBR Green I ile duyarlılığının belirlenmesi.....	52

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>S. enterica</i> ve <i>S. bongori</i> 'nin her bir alt türü içindeki serovar sayısı.....	6
Tablo 2.2. Salmonellozisin teşhisi için mevcut test yöntemleri ve kullanım amaçları	11
Tablo 2.3. LAMP için kullanılan polimeraz enzimleri ve özellikleri	31
Tablo 3.1. <i>S. Enteritidis</i> LAMP optimizasyonu için çalışmada planlanan primerler	39
Tablo 3.2. <i>S. Enteritidis</i> LAMP optimizasyonu için kullanılan primerler	40
Tablo 3.3. <i>S. Enteritidis</i> PCR, Q-RT PCR uygulamaları için kullanılan primerler	40
Tablo 3.4. Konvansiyonel PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	42
Tablo 3.5. Konvansiyonel PCR protokolü	42
Tablo 3.6. LAMP Reaksiyonu İçin Primer Karışım Oranları	43
Tablo 3.7. LAMP protokolü, bileşenler ve konsantrasyonları	44
Tablo 4.1. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>S. Enteritidis</i> referans suşunun 10 katlı alt dilüsyonlarına göre DNA konsantrasyonları ve <i>invA</i> genine göre SYBR Green CT değerleri	47

1. GİRİŞ

Salmonellozis, *Salmonella* cinsi bakterilerin neden olduğu insan ve hayvanlarda görülen bulaşıcı bir hastalıktır. *Salmonella* etkenleri, ishal ve sistemik enfeksiyonların etiyolojik etkenleridir. Genellikle subklinik enfeksiyonlara ve taşıyıcı hayvanların dışkısı ile saçılarak çevrenin kontaminasyonuna neden olurlar. Ekonomik öneme sahip hayvanlarda enfeksiyon genellikle et, süt yumurta ve peynir kontaminasyonuna yol açar. Hastalık tüm evcil hayvan türlerini etkileyebilir; genç, gebe ve laktasyondaki hayvanlar en duyarlı olanlardır. En sık görülen klinik belirti enteritistir, ancak akut septisemi, abort, artrit ve solunum yolu sistemi hastalıkları da görülebilir. Salmonellozisin teşhisi, nekropsi materyalleri, dışkı, rektal svap, çevresel örnekler, yem ve gıdalardan etkenin izolasyonu ile mümkündür. Reprodüktif sistem organlarının enfeksiyonu veya abort meydana geldiğinde, fetal mide içeriği, plasenta ve vajinal svaplardan embriyolu yumurtaya ekim yapılarak teşhise gidilebilir (OİE, 2016). *Salmonella*'nın teşhisinde çevresel örneklerden, su ve yemden izolasyon yapılacağı zaman bu tip örneklerde az sayıda bakteri olacağından ön zenginleştirme yöntemi özellikle diğer baskılayıcı mikroorganizmaların üremesini önlemek amacıyla oldukça önemlidir. Etkenin teşhisine yönelik Polimerase Chain Reaction (PCR) ve *Salmonella* antijenlerinin immünolojik tespiti gibi alternatif yöntemler de uygulanabilir. Elde edilen *Salmonella* şüpheli bir izolatın kesin identifikasyonu çeşitli biyokimyasal, serolojik ve moleküler testler ile yapılabilmektedir. *Salmonella*, spesifik tiplendirme serumları ile tanımlanabilen somatik (O), flagellar (H) ve virülans (Vi) antijenlerine sahiptir ve serovarlar, White-Kauffmann-LeMinor şemasındaki antijenik formlere göre belirlenebilir. Tüm genom dizilimine dayanan Multi-Locus Sequence Typing (MLST) dahil olmak üzere alternatif serotiplendirme yöntemleri, giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bazı serovarlar için faj ile tiplendirme yöntemleri de mevcuttur (OIE, 2016).

Salmonellozis, dünya çapında önemli gıda ve yem güvenliği endişesi taşıyan önemli bir zoonozdur. (OIE, 2016). Klinik örneklerde ve gıda matrislerinde patojen tespiti amacıyla PCR'a alternatif olarak İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon, Loop Mediated İzothermal Amplification (LAMP) yöntemi geliştirilmiştir. Bu gelişmeler son yıllarda ilgiyi çabuk teşhis için LAMP testlerine yöneltmiştir (Yang et al., 2018).

LAMP tekniği, reaksiyon bileşenlerinin izotermal koşullara tabi tutulduğu ve

tüm amplifikasyon ve tespit işlemlerinin tek bir adımda gerçekleştirildiği, basitliği ile karakterize bir yöntemdir (Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002a). LAMP, geleneksel PCR teknolojilerine göre daha az özel ekipman gerektirir ve bu nedenle, gelişmekte olan ülkelerde laboratuvarlar için kolaylıkla erişilebilir bir yöntem olarak karşımıza çıkar. LAMP metodu, *Bacillus subtilis* (*Bsm*) veya *Bacillus sterothophilus* (*Bst*) polimeraz enziminin izotermal iplikçik-yer değiştirme aktivitesine dayanmaktadır. Bu enzim, dört adet hedefe spesifik primerler ile kombine edildiğinde, bir DNA kalıbında spesifik bir bölgenin tek bir sıcaklıkta amplifikasyonu sonucunda, eşdeğer bir PCR'dakinden daha fazla miktarlarda ürün elde edilmesine olanak sağlar (Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002b).

Bu çalışmada, LAMP reaksiyonu 65°C sıcaklıkta 60dk'da gerçekleştirildi ve sonuçlar hem elektroforez ile hem de SYBR Green I boyası kullanılarak görsel hale getirildi. LAMP testinin saptanabilir limiti *S. Enteritidis* için 3.66×10^2 cfu/ml olarak belirlenirken, PCR ve RT-PCR testlerinin saptanabilir limiti sırasıyla 3.66×10^4 cfu/ml ve 3.66×10^3 cfu/ml olarak tespit edildi. LAMP testinin özgülüğü ise %100 olarak belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Salmonellozis

Salmonellozis, *Salmonella* cinsi bakterilerin neden olduğu insan ve hayvanlarda görülen bulaşıcı bir hastalıktır. *Salmonella* etkenleri, ishal ve sistemik enfeksiyonların etiyolojik etkenleridir. Genellikle subklinik enfekte ve taşıyıcı hayvanların dışkısı ile saçılarak çevrenin kontaminasyonuna neden olurlar. Çiftlik hayvanlarında enfeksiyon sıklıkla et, yumurta, süt ve peynir gibi hayvansal ürünlerin kontaminasyonuna yol açar.

Salmonella cinsinin üyeleri, çok çeşitli konakları enfekte etme yeteneğine sahiptirler. Taylor ve McCoy (1969), yılında *Salmonella*'ların, hemen hemen tüm omurgalı konakçılardan izole edilebildiğini gözlemlemişlerdir. *Salmonella* serotiplerinin çoğu (*Salmonella* Typhi (insanlar), *Salmonella* Dublin (sığır), *Salmonella* Gallinarum (kümes hayvanları) ve *Salmonella* Cholerasuis (domuz)) hariç geniş bir konakçı aralığına sahiptir (Griffith et al., 2019).

Salmonellozis, insanlarda yaygın olarak görülen, gıda kaynaklı zoonotik enfeksiyonlardan biridir. Hastalık tüm dünyada kabul edilmekle birlikte tifoidal olmayan *Salmonella*'nın, hayvanların yoğun olarak yetiştirildiği çiftliklerde özellikle de domuz yetiştiriciliği olmak üzere buzağı ve kanatlı işletmelerinde yaygın olduğu görülmektedir.

Salmonella enfeksiyonları tüm evcil hayvan türlerini etkileyebilir; genç hayvanlar, gebe ve laktasyon dönemindekiler en duyarlı olanlardır. Enterik enfeksiyonlar en yaygın olanlarıdır, ancak akut septisemi, abort, artrit ve solunum sistemi enfeksiyonlarını içeren çok çeşitli klinik belirtiler de görülebilir. Salmonellozis, özellikle domuzlar ve kümes hayvanları olmak üzere birçok hayvan türünde hiçbir klinik belirti göstermeksizin seyredebilir. Bu tür hayvanlar, enfeksiyonun sürüler arasında yayılmasından, gıda kontaminasyonundan ve insanlardaki enfeksiyon kaynağından sorumlu olabilirler (OIE, 2016).

2.1.1. Tarihçe

Tifoid ateşi Hipokrat döneminden itibaren yaygın olmasına rağmen, ilk tanımlama Thomas Willis tarafından 1659'da İngiltere'de yapılmıştır (Yoshikawa et al., 1980). 1855 yılında Theobald Smith klasik domuz ateşi ile enfekte olmuş domuzların bağırsaklarından *Salmonella*'yı izole etmiştir (Eng et al., 2015; Popoff et al., 2003). 1880'de Carl Joseph Eberth, tifodan ölen hastaların lenf düğümleri ve

dalak örneklerinde tifo basilini görmüş, Prusyalı bir ordu cerrahı olan Georg Gaffky ise, bakteriyi 1884 yılında ilk kez kültüre etmeyi başarmıştır. 1896'da Durham, Pfeiffer ve Kolle, organizmayı spesifik aglütinasyon ve immobilizasyon ile tanımlamak için hazırlanmış bir antiserum kullanmış ve 1896'da Fernand Widal, serumun aglütinasyon reaksiyonu gösterdiğini tespit etmiştir. İlk pratik Tifo aşısı, Sir Almroth Wright tarafından ısıyla öldürülen bakterilerden hazırlanmış ve 1898'de Hindistan'da 3.000'den fazla askeri aşılama için kullanılmıştır.

Paratifo ateşi ilk olarak Achard ve Bensaude tarafından 1896'da tanımlanmış, 1915'te Gelibolu yarımadasında Tifoya karşı aşılanan İngiliz birlikleri arasında şiddetli bir salgın meydana gelmiştir. *Salmonella* Paratyphi A ve B ile güçlendirilmiş spesifik aşılama geliştirilmesinden önce bile, Tifo ateşi aşısı, büyük oranda iyileşmelere yol açmıştır. 1875'te Büyük Britanya'da Halk Sağlığı Yasası'nın kabul edilmesinin ardından, Tifo ateşinden ölüm oranı sonraki on yılda yüzde 50'den fazla düşmüştür (Yoshikawa et al., 1980).

Salmonella cinsinin bugünkü adı, 1900 yılında Lignieres tarafından Theobald Smith ile birlikte *Salmonella Choleraesuis*'i ilk kez izole eden Daniel Elmer Salmon için önerilmiş ve bu isimlendirme resmi olarak 1933'te kabul edilmiştir. White (1925) ve Kauffman (1930) tarafından yapılan çalışmalar sonucu, *Salmonella* 'ların Kauffman-White serolojik sınıflandırma şeması ortaya çıkmıştır (Yoshikawa et al., 1980).

2.1.2. Etiyoloji

Salmonella spp. *Enterobacteriaceae* familyasına ait fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen Gram negatif 0.7-1.4x2.0.5-0.2µm boyutlarında basil morfolojili bakterilerdir (Mastroeni et al., 2000; Felix and Angnes, 2018; Silva et al., 2019). *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Gallinarum ve *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Pullorum hariç peritrik flagellaları ile hareketli mikroorganizmalardır (Şekil 2.1). Bu patojenler, gıda kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir rol oynar ve geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir. *Salmonella enterica*, memeliler, kuşlar ve sürüngenler dahil olmak üzere birçok hayvan türünden izole edilmiştir (Mastroeni et al., 2000; Lomborg et al., 2007; Filioussis et al., 2008; Adhikari et al., 2009; Switt et al., 2009; Biswas et al., 2010; Nielsen, 2012; Costa et al., 2012; Cheung and Kam, 2012; Yang et al., 2016). Çevrede yaygın olarak bulunabilen *Salmonella* spp.'ler nemli ve sıcak koşullarda konakçı dışında

çoğalabilir, sığır gübresi ve toprak gibi organik maddelerde uzun süre hayatta kalabilir ve ayrıca kurumuş dışkıda yıllarca yaşayabilir (Taylor and Burrows, 1971; Plym-Forshell and Ekesbo, 1996; Wray and Davies, 2000).



Şekil 2.1. *Salmonella* spp'nin elektron mikroskopik görünümü (gidalab, 2022).

Salmonella spp. genellikle serotiplendirme, biyokimyasal özellikleri ve faj tiplendirme yöntemleriyle tanımlanmaktadır (Wattiau et al., 2011). Kauffman-White şeması, *Salmonella* suşlarının ayırt edilmesi ve alt tiplendirmesi için yaygın olarak kullanılan bir serotiplendirme yöntemidir (Switt et al., 2009). Uzun yıllardır rutin olarak uygulanan ve antijenik değişkenliğe dayanan bu yöntem, *Salmonella* spp.'nin yüzey antijenlerini tanımlamak için spesifik antikorlarla aglütinasyon reaksiyonlarının oluşmasına bağlıdır (Switt et al., 2009; Wattiau et al., 2011). Kaufman-White yöntemi, hücre yüzeyinde bulunan lipopolisakkaritleri (O antijeni), flagellar proteinleri (H antijeni) ve kapsüler polisakkaritleri (Vi antijeni) tanımlayarak organizmanın antijenik yapısının belirlenmesini sağlar (Switt et al., 2009; Wattiau et al., 2011). *Salmonella* serotiplerinin antijenik formülleri, Paris, Fransa'daki Pasteur Enstitüsü'ndeki Dünya Sağlık Örgütü (WHO) *Salmonella* Hakkında İşbirliği ve Referans Merkezi (WHO İşbirliği Merkezi) tarafından tanımlanır ve korunur. Ayrıca yeni serotipler, Kauffmann-White şemasında yıllık güncellemelerle listelenir. *Salmonella* isimlendirmesi oldukça karmaşıktır ve bilim adamları bu cinse atıfta bulunmak için farklı sistemler kullanırlar. Bütün bunların yanı sıra *Salmonella*'nın isimlendirmesinde tekdüzelik gereklidir. Fakat, mevcut

kullanım genellikle *Salmonella*'yı türlere, alt türlere, gruplara, alt gruplara ve serotiplere (serovarlar) böler ve bu durum da kafa karışıklığına neden olur. *Salmonella* cinsinin adlandırılması, O (somatik) ve H (flagellar) antijenlerinin serolojik olarak tanımlanması Kauffmann (Kauffman, 1966) tarafından önerilen, bir serotip-bir tür kavramından gelişmiştir. Buna göre, her serotip ayrı bir tür olarak kabul edilmiştir (örneğin, *S. Paratyphi A*, *S. Newport*, *S. Enteritidis*). Diğer taksonomik öneriler, bir suşun klinik rolüne, serotipleri alt türlere ayıran biyokimyasal özelliklere ve nihayetinde genomik akrabalığa dayanmaktadır. İlk yayınlanan Kaufmann-White Şeması'nda (1934), 44 serovar tanımlanmış ve en son (2007)'de yayınlanan şemaya göre *Salmonella* türünün 2500'den fazla serovar içerdiği tespit edilmiştir (Tablo 2.1) (Ewing, 1986; Le Minor ve Popoff, 1987; Popoff et al., 1997; Farmer, 1999; Popoff et al., 2000; Brenner et al., 2000; Grimont and Weill, 2007; Chattaway et al., 2021).

Tablo 2.1. *S. enterica* ve *S. bongori*'nin her bir alt türü içindeki serovar sayısı (Grimont and Weill, 2007).

Tür	Alt tür	Grup	Serovar miktarı
<i>Salmonella enterica</i>			
	subspecies <i>enterica</i>	I	1531
	subspecies <i>salamae</i>	II	505
	subspecies <i>arizona</i>	IIIa	99
	subspecies <i>diarizonae</i>	IIIb	336
	subspecies <i>hautenae</i>	IV	73
	Subspecies <i>indica</i>	VI	13
<i>Salmonella bongori</i>			22
Toplam			2579

Salmonella cinsi içerisinde *Salmonella enterica* (*S. enterica*) ve *Salmonella bongori* (*S. bongori*) adı altında iki tür bulunmaktadır. Tarihsel olarak *S. enterica*'ya ait 6 alt türün (I *enterica*, II *salamae*, IIIa *arizonae*, IIIb *diarizonae*, IV *hautenae*, VI *indica*) tanımlanması biyokimyasal özelliklerine göre yapılmaktadır. İnsan enfeksiyonlarının çoğu, Kaufmann-White şemasına göre adlandırılan alt tür I içindeki serovarı içerir. *S. enterica* subsp. *enterica*, *Salmonella enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Moore and Feist, 2007) insanlar ve sığırlarla ilişkili türlerdir.

S. bongori serovarı, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar adlarıyla karıştırılmaması için V sembolü korunmuştur. İnsanlarda ve çiftlik hayvanlarında enfeksiyonlara neden olan en yaygın serovarlardan, *enterica* alt türlerine aittir. Diğer alt türlerin serovarlardan soğukkanlı hayvanlarda ve çevrede bulunma olasılığı daha yüksektir, ancak bazen insan hastalıklarıyla da ilişkilendirilebilmektedir. *S. arizonae*

alt türü ve *S. diarizonae* alt türünün bazı serovarları hindi ve koyunlarda hastalığa neden olabilir ve diğer türler de sürüngenler ve amfibiler tarafından taşınabilir. White-Kauffmann-Le Minor şemasına göre sadece *enterica* alt türlerinin serovarları bir isim taşır, örn. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis veya *S. enterica* serovar Enteritidis veya kısaca *S. Enteritidis* şeklinde isimlendirilir. *S. enterica* ve *S. bongori*'nin diğer alt türlerinin serovarları, yalnızca antijenik formülleriyle belirtilir (örn. *Salmonella* IV 48:g.z51) (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

2.1.3. Epidemiyoloji ve Klinik Bulgular

Enfeksiyonun seyri, klinik belirtiler, postmortem bulgular ve etkilenen hayvan türlerine göre değişir. Çoğu serovar, çok sayıda hayvan türünde hastalığa neden olabilir (Barrow and Methner, 2013), ancak bazı serovarlar konağa özgüdür (insanlarda *S. Typhi* ve koyunlarda *S. Abortusovis*). Diğer serovarlar, konakçıya adapte olmuştur (domuzlarda *S. Choleraesuis* ve sığırlarda *S. Dublin*). Konağa özgü ve konağa adapte olmuş serovarlar sıklıkla septisemik hastalığa neden olur. Kümes hayvanlarında, konakçıya özgü hastalıklar pullorum hastalığı ve kanatlı tifosu, sırasıyla *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum*'un neden olduğu enfeksiyonları tanımlamak için kullanılır (Barrow and Neto, 2011).

İnsanlarda, salmonellozise karşı en duyarlı olanlar, küçük çocuklar, yaşlılar ve bağışıklık sistemi zayıf olanlardır. Hastalık tüm evcil hayvan türlerini etkileyebilir; genç hayvanlar ve gebe hayvanlar hastalığa karşı daha hassastır. Akut septisemi, akut veya kronik diyare, solunum yolu hastalığı, abort ve artrit gibi çok çeşitli klinik belirtiler görülebilir. Buzağılarda, *S. Dublin* serovarıyla septisemik enfeksiyon esas olarak 2-6 haftalıkken ortaya çıkar. Kanlı ve mukuslu ishal meydana gelir, ilerleyen dönemlerde zatürre meydana gelebilir ve uygun tedavi zamanında yapılmazsa ölüm gerçekleşebilir. Gebe ineklerde *S. Dublin* enfeksiyonu, abortların en yaygın nedenlerinden biridir. Birçok hayvan, özellikle kanatlılar ve domuzlar enfekte olabilir, ancak klinik hastalık göstermez. Bu tür hayvanlar, enfeksiyonun sürüler arasında yayılmasına neden olabilirler. Salmonellozis tüm ülkelerde kabul edilmiştir, ancak tifoidal olmayan enfeksiyonlar, özellikle kümes hayvanları veya domuzlar olmak üzere yoğun hayvancılık alanlarında yaygın olarak görülmektedir (Barrow and Methner, 2013). *Salmonella* enfeksiyonunun en yaygın nedeni, çiğ veya az pişmiş yumurta veya yumurta ürünleri, et, kümes hayvanları, kontamine taze meyve ve

sebzeler ve pastörize edilmemiş süttten yapılmış yumuşak peynirler dahil kontamine gıdalar olarak bilinmektedir (OIE, 2018).

Salmonella ayrıca enfekte kuşlar, çiftlik hayvanları, sürüngenler, amfibiler, köpekler ve kedilerle temas yoluyla insanlara bulaşabilir. Bu hayvanlar, görünüşte sağlıklı olsalar bile bakterileri taşıyabilirler. *S. Choleraesuis* ve *S. Dublin* gibi konakçıya adapte olanlar da dahil olmak üzere birçok serovarin insanlarda ciddi hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir. Mezbaha çalışanları, hayvan bakıcıları ve veteriner hekimler, çalışmalarını sırasında enfekte hayvanlarla temas halindeyken doğrudan enfekte olabilirler. Güvenli çalışma ortamlarının sağlanamaması durumunda laboratuvar personeli de enfeksiyona yakalanabilir. (OIE, 2018).

2.1.4. Patogenez

Salmonella enfeksiyonları, sığır ve koyunlarda klinik enterokolit, sepsisemi ve abort ile karakterizedir (Holschbach and Peek, 2017). *Salmonella* enfeksiyonu yaygın olarak çiftlik hayvanlarından, kemirgenlerden ve kuşlardan fekal-oral kontaminasyon yoluyla veya kontamine protein kaynaklı hayvan yan ürünleri ile bulaşır. Ayrıca yapılan deneysel çalışmalar sonucunda oral maruziyetin de faringeal lenfoid doku (bademcikler) yoluyla enfeksiyona ve sistemik yayılmaya yol açabileceği gösterilmiştir (Wray and Davies, 2000; Holschbach and Peek, 2017).

Salmonella enfeksiyonlarının klinik ve patolojik özellikleri son derece değişkendir. Enfeksiyonun şiddeti, mikroorganizmanın virulansı, serotipi, vücuda giriş dozu ve giriş yolu ve konağın bağışıklık durumu ile ilişkilidir (Hardman et al., 1991; Mohler et al., 2009; Wathes et al., 1988). *Salmonella* etkenleri için 200'den fazla virülans faktörü ilişkilendirilmiştir, ancak çok azı tamamen karakterize edilmiştir. Genel olarak, patojenik *Salmonella*'larda virülansı destekleyen faktörler, adezyon, invazyon, sitotoksinite ve hücre içi sağkalım ile ilgilidir ve genellikle hastalığın ortaya çıkmasında hepsinin kombinasyonu önemli rol oynamaktadır. Hastalık, bağırsak peristaltığında bozukluk, bağırsak florasındaki değişiklikler ve mide pH'sının yükselmesi gibi faktörlerle ortaya çıkar (Clarke and Gyles, 1993). Mikroorganizma vücuda girdiğinde, mukozal hücrelere yapışır ve enterositleri yok etme yeteneğine sahiptir. Organizma enterositler yoluyla distal ince bağırsağın ve kolonun lamina propriasına nüfuz eder, burada bir inflamatuvar yanıt oluşturur veya makrofaj ya da nötrofiller tarafından yutulurlar (Smith, 2009). *Salmonella*'lar mononükleer fagositlerin içine girdikten sonra, vücutta hızla yayılırlar.

Salmonella'nın lenfoid dokulara invazyon eğilimi vardır. *Salmonella* etkenlerinin invazyon yeteneği, patogenezi için bir gerekliliktir ve bu özellikleri serotipe özgü bir plazmit tarafından kodlanır (Helmuth et al., 1985). Bu plazmidin çıkarılması, mikroorganizmanın istila etme yeteneğinin kaybolmasına neden olur, ancak etkenlerin murin makrofajları tarafından yutulması veya öldürülmesi, LPS üretimi veya serum direnci üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Gulig and Curtiss 1987). İnvazyon süreci sırasında, hücre içi hayatta kalmayı artıran yeni proteinlerin sentezinin indüksiyonu artar (Finlay et al., 1989). Birçok epitel hücre tipi (enterositler, M hücreleri, goblet hücreleri) jejunum ve ileum istila edilebilir ve mikroorganizmaların submukozaya girişinde en önemli basamağı Peyer plakları oluşturur (Meyerholz et al., 2002; Meyerholz ve Stabel, 2003; Schausser et al., 2004). *Salmonella*'ların lenfoid dokulara eğilimi vardır ve tercihen kolonda Peyer plakları ve mezenterik lenf düğümlerine yerleşir (Pospischil et al., 1990). Buradan organizma sıklıkla lenfatiklere girer ve sonunda bakteriyemiye yol açar (Wray and Davies, 2000). Bakterilerin epitel reseptörlerine bağlanması, vakuol oluşumunu, hücre sitoplazmasında vakuol taşınmasını ve bazal membrandan ekzositoz yoluyla lamina propriaya girişi tetikler. Epitelden geçiş, hafif ve geçici enterosit hasarına neden olur. *Salmonella*, makrofajların enfeksiyonu sırasında seçici olarak indüklenen 30'dan fazla protein sentezler, bu da onların fakültatif hücre içi bakteriler (*Brucella*, *Mycobacterium* ve *Listeria* türlerine benzer) gibi lamina propriada makrofajlar ve nötrofiller içinde hayatta kalmasını sağlar (Holschbach and Peek, 2017). Bu nedenle, *Salmonella*'nın virülans mekanizması içerisinde, bağırsak mukozasını istila etme, lenfoid dokulara yerleşip çoğalma ve konak savunma mekanizmalarından kaçma gibi önemli rolleri bulunmaktadır. *Salmonella*'nın neden olduğu enterokolit, salgı mekanizmalarının bozulması sonucu yetersiz sindirim ve malabsorpsiyona bağlı olarak gerçekleşir. Kolondaki iltihaplanma, hem yetişkinlerin hem de yeni doğanların dışkısında yaygın olarak gözlenen taze kana yol açar. *Salmonella*'nın neden olduğu ishalin, enfeksiyona karşı konakçı inflamatuvar reaksiyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Wray and Davies, 2000).

Salmonella enfeksiyonunun üreme kaybına ve aborta neden olabileceği mekanizmalar hakkında yeterli veriler bulunmamaktadır. Klinik olarak abortlar, B, C veya D serotipleri söz konusu olduğunda yaygın olarak görülmekte ve *Salmonella* ile enfekte olmuş sığırlarda abortun birkaç farklı mekanizma yoluyla ortaya çıkabileceği tahmin edilmektedir. Septisemi, fetüsün ve rahmin fetal enfeksiyonuna ve fetüsün

ölümüne neden olabilir (Wray and Davies, 2000). Aborte fetüslerin tanı amaçlı yapılan nekropsi incelemeleri sonucunda mikroorganizmanın sıklıkla fetal örneklerden elde edilmesi bu olasılığı desteklemektedir. İnflamatuar mediatör salınımına yol açan endotoksemi, prostaglandin salınımına ve sekonder luteolize de neden olabilir. Yüksek ateş veya hipertermi ayrıca prostaglandin salınımında rol oynayabilir veya fetal yaralanma yoluyla abortlara neden olabilir. İnekler, gebeliğin herhangi bir aşamasında abort yapabilir, ancak abort en yaygın olarak 5 ile 9 aylık gebeliklerde görülür. (Wray and Davies, 2000; Holschbach and Peek, 2017).

2.1.5. Tanı

Tanı, mikroorganizmanın, nekropsi materyalleri, dışkı, rektal svap veya çevresel örnekler, gıda ve yem maddelerinden izolasyonuna dayanır. Ayrıca hayvanların bazı serovarlar ile enfeksiyonu, serolojik olarak da teşhis edilebilir. Reprodüktif sistemin enfeksiyonu veya abort meydana geldiğinde, fetal mide içeriğinden, plasenta ve vajinal sürüntülerden, kümes hayvanlarının enfeksiyonunda ise embriyolu tavuk yumurtalarından izolasyon yapılması gerekir (Carrique Mass and Davies, 2008; OIE, 2018).

Salmonella etkenleri, mikroorganizmayı canlandırmak ve çoğaltmak için ön zenginleştirme besiyerleri (Tetrasyonat buyyon), rekabetçi organizmaları baskılamak için inhibitör maddeler içeren zenginleştirme besiyerleri ve *Salmonella* 'ları diğer enterobakterilerden ayırt etmek için seçici özellikteki besi yerlerini (*Salmonella* shigella agar, MC agar, EMB agar et al.) içeren çeşitli teknikler kullanılarak izole edilir. Polimeraz zincir reaksiyonu ve *Salmonella* antijenlerinin immünolojik yöntemler ile tespiti gibi alternatif yöntemler de kullanılabilir (OIE, 2018).

İzole edilmiş bir bakterinin kesin olarak tanımlanması saf kültürün çeşitli biyokimyasal, serolojik ve moleküler yöntemler ile gerçekleştirilir (Tablo 2.2). *Salmonella* etkenleri somatik (O), flagellar (H) ve virülans (Vi) olarak adlandırılan antijenlere sahiptir ve bunlar spesifik tiplendirme serumlarıyla tanımlanır. Aynı zamanda bu serovarlar White-Kauffmann-LeMinor şemasındaki antijenik formüllerle belirlenir. Birçok laboratuvarın izolatları referans laboratuvara göndermesi gerekebilir. Tüm genom dizilimine dayalı MLST dahil olmak üzere alternatif serotiplendirme yöntemleri giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bazı serovarlar için faj tiplendirme şemaları da mevcuttur. (OIE, 2018).

Salmonellozis hastalığına yakalanmış genç kuşlardaki belirtiler, Pullorum hastalığı, kanatlı tifosu ve *Escherichia coli* dahil olmak üzere çok çeşitli bakterilerin neden olduğu diğer akut septisemik hastalıklarda görülenlere çok benzer. Tüm kuş türlerinde, *Salmonella*'ların neden olduğu artrit, diğer enfeksiyöz etkenlerin neden olduğu sinovit veya bursit ile karıştırılabilir. Domuzlarda *S. Choleraesuis*'in neden olduğu septisemik salmonellozis, domuz kolerasıyla karıştırılabilir. Buzağılarda septisemik salmonellozis, kolibasilloz ile karıştırılabilir, ancak kolibasilloz genellikle daha genç yaşta ortaya çıkar. Buzağılarda akut enterik salmonellozis formu koksidiyozise benzeyebilir. Koyunlarda abortlara sadece *S. Abortusovis* değil, aynı zamanda *Coxiella burnetii*, *Chlamydophila abortus*, *Brucella ovis* veya diğer patojenler neden olabilir (OIE, 2018).

Tablo 2.2. Salmonellozisin teşhisi için mevcut test yöntemleri ve kullanım amaçları (OIE, 2018).

Metod	Amaç					
	Enfeksiyondan ari popülasyon	Hayvan hareketleri öncesi bireysel enfeksiyonun kontrolü	Eradikasyon programlarına katkı	Klinik vakaların doğrulanması	Enfeksiyon prevalansı / sürveyans	Aşılama sonrası bağışıklık durumu
Etken İdentifikasyonu						
Salmonella İdentifikasyonu	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Hızlı alternatif metodlar (örn: PCR)	+	+	+	+	+	n/a
İmmun Yanıtın Belirlenmesi						
SAT	++	-	++	-	+	++
ELISA	++	-	+++	+	++	++

Anahtar sözcükler: +++ = önerilen yöntem; ++ = uygun yöntem; + = bazı durumlarda kullanılabilir, ancak maliyet, güvenilirlik veya diğer faktörler, uygulamasını ciddi şekilde sınırlandırır; - = bu amaç için uygun değil; n/a = geçerli değil. +++ veya ++ kategorisi olarak listelenen testlerin tümü resmi doğrulamadan geçmemiş olsa da, rutin yapıları ve tatmin edici sonuçlarla yaygın olarak kullanılmalı, bazı durumlarda tekrarlanan testlerin gerekli olabilmesine rağmen, onları kabul edilebilir kılmaktadır. PCR = polimeraz zincir reaksiyonu bazlı testler; SAT = serum aglütinasyon testi; ELISA = enzime bağlı immüno-sorbent tahlili

Serolojik testler, popülasyonun istatistiksel olarak temsili bir örneği üzerinde yapılmalıdır, ancak sonuçlar her zaman aktif enfeksiyonun göstergesi değildir. Laboratuvarında, tüp aglütinasyon testi, tüm çiftlik hayvanlarından alınan numuneler

için ihracat ve teşhis amaçlı tercih edilen yöntemdir. Bazı serovarlar için enzime bağlı immünosorbent testleri mevcuttur ve özellikle kümes hayvanları ve domuzlarda serolojik tanı ve gözetim için kullanılır. *Salmonella* aşısı, serolojik testlerin tanısal değerini olumsuz etkileyebilmektedir (OIE, 2018).

2.1.5.1. Bakteri Kültürü

Bakteriyolojik testler için numuneler mümkün olduğunca aseptik koşullarda ve klinik hastalık veya rutin izleme durumunda ise herhangi bir antibiyotik tedavisine başlamadan önce alınmalıdır. Klinik numuneler tercihen hastalığın akut fazı sırasında veya ölümden sonra mümkün olan en kısa sürede alınmalıdır. Kümes hayvanları veya diğer kanatlı türleri söz konusu olduğunda, doğal olarak biraraya gelmiş dışkı, çöp, toz veya zemin yüzeylerinden sürüklenen veya çizme sürüntüleri gibi çevresel örnekler enfekte sürüleri tanımlamak için en uygun seçenekleri oluşturur (Carrique-Mas and Davies, 2008). Daha küçük hayvan türleri için, temsili sayıda hasta veya yakın zamanda ölmüş hayvanların numunelerinin laboratuvara gönderilmesi tercih edilir (WHO, 1994). Konakçı spesifik serovarların dışkıdan izolasyonu genellikle daha zordur, bu nedenle mümkünse enfekte dokulardan kültür yapılmalıdır.

Subklinik enfekte hayvanlar bakterileri aralıklı olarak ve az sayıda etrafa saçtıklarından etken izolasyonuna özen gösterilmelidir. Numune miktarının fazla olması, daha fazla bireyi temsil edeceğinden, tanısal hassasiyetin artmasına yardımcı olabilir. Bakteriler genellikle dışkı örneklerinde kümelendiği için, kültürden önce iyice karıştırılması işlemin duyarlılığını artırabilir (Cannon and Nicholls, 2002). Bakteriyolojik ve serolojik yöntemler, bireysel enfekte hayvanları tanımlama yerine enfekte sürüleri tanımlamak için de kullanılabilir.

Salmonella'nın izolasyonu ve tespiti için çok sayıda yöntem vardır (Fricker, 1987; Harvey and Price, 1974; Reissbrodt, 1995; Lee et al 2015; Park et al., 2014). Belirli bir tanı için, en iyi şekilde çalışabilecek kültür teknikleri ve besiyeri, *Salmonella* serovarı, örneklerin kaynağı ve türü, menşei hayvan türleri, seçici zenginleştirme besi yerleri ve çeşitli faktörlere bağlıdır.

Salmonella'nın teşhisi için standart bir yöntem yayınlanmıştır ve buna göre International Standartization Organization (ISO) yöntemi benimsenmiştir (ISO, 2007). Standart yöntemin temeli, tamponlu peptonlu su içinde ön zenginleştirme, ardından modifiye yarı katı Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) besi yeri üzerinde zenginleştirme ve ksiloz-lisin-deoksikolat (XLD) agar ve tercih

edilen ek bir besi yeri üzerinde izolasyondur. Bu yöntemin ayrıca hayvan yemi ve et ürünleri için oldukça etkili olduğu ve tam ISO yönteminden daha basit ve daha ucuz olduğu gösterilmiştir. Asemptomatik hayvanlardan elde edilen dışkıda *Salmonella* sayısı, çevresel örnekler, hayvan yemi ve yiyecekleri genellikle düşüktür ve izolasyona yardımcı olmak için genellikle tamponlu peptonlu su gibi ön zenginleştirme ortamlarının kullanılması gerekir. Bu, aksi takdirde seçici zenginleştirme ortamının toksik etkisi ile öldürülebilecek az sayıdaki *Salmonella*'nın çoğalmasına izin verebilir (örn. dondurularak, ısıtılarak, kurutularak veya biyositlere veya organik asitlere maruz bırakılarak) (Harvey and Price, 1974).

Zenginleştirme ortamları, diğer bakterilerin üremesini engellerken, seçici olarak *Salmonella*'nın üremesine izin veren katkı maddeleri içeren sıvı veya yarı katı agar ortamlarıdır. Seçici zenginleştirme ortamı örnekleri, Müller–Kauffmann broth, selenit sistin, Brilliant Green broth, Rappaport–Vassiliadis broth ve modifiye yarı katı MRSV agarda olduğu gibi tetrasyonattır. Bununla birlikte, bazı katkı maddeleri ayrıca belirli *Salmonella* serovarları için nispeten toksiktir; örn. selenit, *S. Choleraesuis*'i inhibe ederken, *S. Dublin*'in birçok türü için toksiktir. Seçiciliği artırmak için yüksek sıcaklıklar da kullanılmıştır; bazı laboratuvarlarda 43°C'lik bir sıcaklık kullanılmaktadır, ancak bu bazı ortamlarda engelleyici olabilir; örn. tetrasyonatlı Rappaport–Vassiliadis 43°C'de özellikle *S. Dublin*'i inhibe eder bu nedenle, Rappaport–Vassiliadis broth bazlı besiyerinin inkübasyonu için 41,5°C önerilir. Ferrioksamin E gibi katkı maddeleri, *Salmonella*'nın yumurta, su veya toprak gibi sınırlı örneklerden veya demirden izolasyonunu arttırmak için seçici zenginleştirme ortamına eklenebilir (Reissbrodt, 1995) veya çoğu Gram pozitif organizmayı veya diğer Gram negatif bakterileri bastırmak için novobiyosin gibi antibiyotikler eklenebilir. Antimikrobiyal dirençli *Salmonella* suşlarının izolasyonunu arttırmak için spesifik antibiyotikler eklenebilir.

Salmonella spp.'nin izolasyonunda selektif besiyerleri de kullanılmaktadır. Bunlar, değişen derecelerde üremeye izin veren katı ve seçici agarlardır. *Salmonella* dışındaki bakterilerin üremesini engellerler ve genellikle laktoz negatif fermantasyon ve hidrojen sülfür (H₂S) üretimi gibi bazı temel farklı biyokimyasal özellikler hakkında bilgi verirler. Sonuçlar, 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra okunur. *Salmonella*'lar, bu tür besiyerlerinde, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* ve *Hafnia* gibi genellikle besi yerindeki diğer bakterilerin kolonilerinden ayırt edilebilen karakteristik koloniler oluşturur. Bu ortamların seçiciliği organizmanın

hareketliliğine, malaşit yeşili boya ve novobiyosin varlığına ve yüksek konsantrasyonda magnezyum klorüre bağlıdır. Örneğin *S. Abortusovis* yavaş üreyen bir serovar olduğu için besiyerlerini 72 saate kadar inkübe etmek ve seçici olmayan kanlı agar kullanmak daha doğrudur. Bununla birlikte, Brilliance veya Rapid gibi belirli kromojenik agar besiyerleri, biyokimyasal olarak atipik *Salmonella*'nın saptanması için daha verimli olabilir (OIE, 2018).

Şüpheli kolonilerin, *Proteus* spp. gibi olası istilacıların bulunmadığından emin olmak için seçici ve seçici olmayan agarlar üzerinde subkültürleri yapılır. Bol miktarda saf büyüme varsa, şüpheli koloniler polivalan *Salmonella* tiplere antiserumları ile aglütinasyon testine tabi tutulabilir (Ellis et al., 1976). Şüpheli kolonilerin aglütine olmadığı durumlarda biyokimyasal testlerin kullanılması gereklidir. Bu testler peptonlu şekerli su besiyerleri veya kompozit ortamlar (üçlü şekerli demir agar, triple sugar iron agar [TSI] gibi) kullanılarak gerçekleştirilebilir (Ewing, 1986).

2.1.5.2. İmmünolojik Ve Nükleik Asit Tabanlı Tanı Yöntemleri

Salmonella'lar için çok sayıda alternatif teşhis yöntemi kullanılmaktadır ve bazıları ticari olarak mevcuttur. Bunlar arasında immünomanyetik ayırma (IMS) (Park et al., 2011), reverse transkriptaz real time (RT)-PCR (Park et al., 2014), enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) (Barrow, 1992; Wang et al., 2015), gerçek zamanlı PCR (Malorny et al., 2004), kantitatif PCR (Piknova et al., 2005) ve mikrodizi analizi (Porwollik et al., 2004; Rasooly and Herold, 2008) bulunmaktadır. Bu yöntemler, spesifik *Salmonella* serovarlarını tanımlamak (Maurischat et al., 2015a) veya canlı aşı suşlarını sürü veya sürüyü enfekte eden *Salmonella* serovarlarından ayırt etmek için kullanılabilir (Maurischat et al., 2015b). Bu yöntemlerin birçoğu, dışkı ve çevresel numuneler için tam olarak doğrulanmamıştır (Eriksson and Aspan, 2007; Malorny and Hoorfar, 2005).

2.1.5.3. Serolojik Tanı Yöntemleri

Hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının teşhisi için bir takım serolojik testler geliştirilmiştir. Kümes hayvanlarında, boya ile işaretli bir antijen kullanılarak uygulanan tam kan testi ve serum aglütinasyon testi (SAT), *S. Pullorum* / *Gallinarum* ile enfekte sürülerin tanımlanması için 50 yılı aşkın süredir başarıyla kullanılmaktadır. *S. Enteritidis*, *S. Pullorum*/*Gallinarum* ile aynı D grubu somatik

antijene sahip olduğundan (Thomson et al., 2008), *S. Enteritidis* tanısında duyarlılığı düşük olmasına rağmen tam kan testi ve ilgili testler kullanılabilir. Son yıllarda kümes hayvanlarında *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* enfeksiyonlarının ve çiftlik hayvanlarında diğer serovarların teşhisi için ELISA (Barrow, 1994) gibi başka testler geliştirilmiştir. ELISA, *S. Dublin* ile enfekte sığırları serolojik olarak tanımlamak ve süt sürülerinin taranması için etkili bir şekilde kullanılmıştır.

Serolojik yöntemler kronik taşıyıcı hayvanların seçici itlafını sağlamak amacıyla sürü testi olarak kullanılmasının yanı sıra, enfekte olmuş sürüleri tanımlamak için de kullanılmalıdır. Serolojik testler normalde sınırlı bir *Salmonella* serovar veya serogrup aralığını tespit etmek için tasarlanmıştır. Yeni doğan hayvanlar immünolojik olarak olgunlaşmamıştır ve 2-3 haftalık olana kadar somatik LPS antijenine serolojik olarak yanıt vermezler. Bununla birlikte, flagellar protein antijenlerine karşı serolojik bir yanıt üretirler. Çoğu serolojik test IgG yanıtına göre geliştirilir ve yüksek antikor seviyeleri tipik olarak enfeksiyondan 1-3 hafta sonra pik yapar ve bu durum 2-3 ay boyunca devam eder (OIE, 2018).

Tam kan testi, çiftlikte kullanılacak kanatlı tifo ve Pullorum hastalığı için hızlı bir tanı sağlar. Tam kan testinin duyarlılığı düşüktür ve deneyimsiz ellerde yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar kaydedilebilir (OIE, 2018).

Hızlı aglutinasyon testinde serum, çok değerlikli kristal-mor boyalı antijen ile karıştırılır. Karo 2 dakika hafifçe sallanır, ardından test okunur. Test bileşenleri 4°C'de saklanır ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına ulaşmış olmalıdır. Test serumları kontaminasyon ve hemoliz içermemelidir. Herhangi bir süre boyunca saklanan serum numunelerini santrifüjlemek faydalı olabilir. Spesifik olmayan yanlış pozitif reaksiyonlardan şüpheleniliyorsa, pozitif/şüpheli serumlar 56°C'de 30 dakika süreyle ısıyla inaktivasyondan sonra tekrar test edilebilir (OIE, 2018).

SAT, duyarlılığı yüksek bir test değildir ve birçok yaşlı hayvanın serumlarında *Salmonella* dışındaki enterobakterilerin neden olduğu düşük aglutinin seviyeleri vardır. Test nispeten ucuzdur; antijenler kolaylıkla hazırlanabilir ve pahalı ekipman gerekli değildir. SAT, mikrotitre formatına uyarlanabilir ve somatik ve flagellar titreleri belirlemek için kolaylıkla kullanılabilir. Bu yöntem, çeşitli *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, hindilerde *S. diarizonae* ve *S. Abortusequi*) serovarlarına maruziyetin belirlenmesi için kullanılmaktadır (OIE, 2018).

S. Enteritidis'e özgü IgG'nin (IgY) saptanması için iki test mevcuttur: İndirek ELISA ve 'Sandviç Tipi' ELISA (Barrow, 1994). Her iki sistemin de avantajları ve

dezavantajları vardır. İndirek ELISA testi daha basittir ve tavukların, hindilerin, ördeklerin ve memeli konakçıların tüm *Salmonella* serovaryaları için reaktifler mevcuttur. Sandviç ELISA testi ise tüm hayvan türlerine uygulanabilir ve genel olarak daha yüksek özgüllük gösterir. Ancak reaktifler tüm serovaryalar için ticari olarak mevcut değildir. Testin ayrıca bazı affinite sorunları da vardır ve indirek testlerden daha az duyarlı olabilir. Sahada, her iki sistem de yanlış pozitif reaksiyonlar üretmiştir ve bazı durumlarda indirek bir LPS ELISA ile taramayı, flagellar sandviç bir ELISA ile doğrulama takip edebilir (OIE, 2018).

2.1.6. Koruma ve Kontrol

Salmonellozis, birçok ülkede endemik hale gelmiştir. Hastalık, daha çok ateş, normalden daha sulu dışkılama ve hafif üretim kaybı ile karakterizedir. Hastalık, geçiş dönemlerinde, yeni enfeksiyonların kazanılıp kazanılmadığında önemli bir faktör haline gelir. Daha sonra sığırların hastalığa en duyarlı olduğu geç kuru ve erken laktasyon döneminde klinik döneme girilmiş olur (Peek et al., 2017).

Fekal-oral yolla yayılan herhangi bir mikroorganizmada olduğu gibi, kontrol stratejilerinin genel olarak tanımlanması gerekmektedir, ancak birçok mandıra için uygulanması o kadar kolay değildir. Enfeksiyonun ana kaynağı, mikroorganizmayı dışkılarıyla saçan diğer sığırlardır. Dışkının *Salmonella* etkenleri ile kontamine olma olasılığının yüksek olması, gübrenin kaba yemler için kullanılacak tarlalara veya gübre işleme ve yem dağıtımı için ortak kullanım ekipmanlarına yayılmasını artırmaktadır. Gübrenin havalandırılması ve 3 günden fazla süreyle 45°C'nin üzerine ısıtılmasının, *Salmonella* sayısını belirgin ve önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Ancak bu yöntemin modern teknolojiye sahip daha büyük mandıralar için ne kadar pratik olduğu belirsizdir (Millner et al., 2014). Süt çiftliklerinde *Salmonella* izolatları arasında artan antimikrobiyal direnç için risk faktörlerini inceleyen bir çalışma, kompost kullanımının önemini ortaya koymuştur. Modern gübre işleme sistemleri ve *Salmonella*'ların laboratuvar koşullarından ziyade doğal koşullarda hayatta kalmasıyla ilgili en doğrudan uygulanabilir araştırma, çoklu ilaca dirençli bir *Salmonella* suşunun bir kompostta 24 saatten daha az hayatta kaldığını göstermiştir (Habing et al., 2012).

Bazı hayvanlar *Salmonella*'yı subklinik olarak taşırsa da, ne kadar süre taşıyıcı olarak kalabilecekleri netlik kazanmamıştır. Etkilenen hayvanlardaki antikor seviyeleri hızla düşebileceğinden potansiyel taşıyıcıları tespit etmek zor olabilir.

Salmonella etkenleri, abortlar meydana gelene ve hastalık teşhis edilene kadar etrafa yayılabilir, ancak kontaminasyonu azaltmak için, yavru atmış hayvanlar organizmayı saçarken izole edilmeli, abort materyali ve kontamine altlıklar imha edilmeli, fomitler dezenfekte edilmelidir. Özel bir yavrulama alanı oluşturmak, temizlik ve dezenfeksiyon çalışmalarına yardımcı olur. *Salmonella* taşıyabilecek şüpheli hayvanların ülkeye girişlerinde karantinalar ve hareketlerinin kontrolleri salgının kontrol altına alınmasına yardımcı olabilir. Aşılar, endemik bölgelerde klinik belirtilerin kontrol edilmesine yardımcı olur (Wray and Linklater, 2000).

Enfeksiyonun zamanlaması, hayvanların abort yapma olasılığını etkileyebilir. Bir çalışmada, gebeliğin çeşitli dönemlerinde aşılanan koyunların tümünün gebeliğin son birkaç haftasında abort yaptığı; bununla birlikte, üçüncü ayda enfekte olan hayvanların, gebeliğin ilk ayında aşı yapılan hayvanlara kıyasla, abort olasılıklarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çiftleşmeden bir ay önce aşılanan hayvanların ise normal gebeliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Wray and Linklater, 2000). Antibiyotikler, gebe koyunların yavru atmasını engelleyebilir, ancak bazı çalışmalar etkisiz olduklarını ve şu anda yararlarının belirsiz olduğunu bildirmiştir. Antibiyotikler ayrıca plasentadan kaynaklanan komplikasyonları tedavi etmek veya önlemek için ve aynı zamanda septisemik hayvanlarda kullanılır.

Salmonella etkenleri, duyarlı bir gebe koyun sürüsüne girdiğinde genellikle çok sayıda hayvanı etkiler. Abort oranı, endemik bölgelerdeki salgınlara göre genellikle %30-50 aralığındadır, ancak %90'a varan oranlar da bildirilmiştir. Bu sürülerdeki pek çok canlı kuzu septisemik ve zayıf doğar ve doğumdan hemen sonra ölür. Koyunlardaki ölümler genellikle metritis gibi komplikasyonlarla ilişkilidir ve bildirilen ölüm oranları değişkenlik gösterir. *S. Abortusovis* bir sürüde endemik hale geldiğinde ise, yalnızca genç veya sürüye yeni katılan koyunlar etkilenme eğilimi gösterir ve abortuslar genellikle sporadiktir (Wray and Linklater, 2000).

2.1.7. İnsanlarda *Salmonella* Enfeksiyonları

Salmonella spp. dünya çapında önemi olan bir bakteridir ve non-tifoid *Salmonella* etkenleri insanlarda gıda kaynaklı hastalıkların önde gelen nedenleri arasında olduğu için ciddi bir tıbbi ve veterinerlik sorunu olarak karşımıza çıkar ve bu da Salmonellozisi gıda ve yem güvenliği için önemli bir endişe haline getirir (Mastroeni et al., 2000; Farrell et al., 2005; Filioussis et al., 2008; Pullinger et al., 2010; Yang et al., 2016; Silva et al., 2019). İnsanlarda tifo ateşine konak tarafından

adapte edilen ve sıklıkla sistemik enfeksiyonla sonuçlanan *S. enterica serovar Typhi* (*S. Typhi*) neden olur (Villarreal-Ramos et al., 2000). Gelişmekte olan birçok ülkede, fekal içerik ile bulaşmış su tüketimi nedeniyle insanlarda halen endemiktir (Mastroeni et al., 2000).

İnsanlar, birçok ülkede *Salmonella* spp., *Campylobacter coli* ve *Escherichia coli* gibi gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu gastroenterite karşı oldukça duyarlıdır. Ayrıca kontamine gıdalar, hayvanlarda ve insanlarda ciddi hastalıkların yanı sıra gıda bozulmalarını da hızlandırabilir (Eng et al., 2015; Felix and Angnes, 2018). Akut salmonellozisli bireylerde ateş, kusma, ishal ve karın krampları gelişebilir (Felix and Angnes, 2018; Wang et al., 2018). *Salmonella* etkenleri, bağışıklığı baskılanmış duyarlı insanlarda ciddi invaziv enfeksiyonlara neden olmakta ve hastaneye yatışla sonlanabilen ciddi durumlara yol açabilmektedir (Nielsen et al., 2004; Mateus et al., 2008; Wang et al., 2018). Costa vd. (2012) yılında yaptıkları bir çalışmada, sığırların insan salmonellozisinde en yaygın enfeksiyon kaynaklarından biri olduğunu öne sürmüşlerdir. İnsanlarda salmonellozis genellikle gıda kaynaklı bulaşma ile ilişkilendirilmektedir. Cummings vd. (2012), süt sığırlarıyla yakın temasta bulunan insanların salmonellozise daha fazla yakalandıklarını göstermişlerdir. Hoszowski ve Wasyl (2000), insandaki çoğu salmonellozis vakasının, *Salmonella* ile enfekte olmuş çiftlik hayvanlarıyla ilişkili olduğunu öne sürmektedir. Salmonellozisin zoonoz bir hastalık olması nedeniyle, sığırlarla yakın temasta çalışanların, uygun şekilde kontrol edilmedikleri takdirde ek ekonomik ve refah sorunlarına yol açabilecek *Salmonella* bulaşması için daha büyük bir potansiyel risk altında oldukları tespit edilmiştir (Cummings et al., 2012; Switt et al., 2009). Yang vd. (2016), *Salmonella* salgınlarını azaltmak için çiftlikten sofraya çok yönlü bir yaklaşımın gerekli olduğunu belirtmektedirler.

2.1.8. Sığırlarda *Salmonella* Enfeksiyonları

Salmonella spp. genellikle hayvansal üretimde kayıplara neden olan enfeksiyonlarla ve zoonotik özellikte olmaları nedeniyle potansiyel insan sağlığı sorunlarıyla da ilişkilidir (Mateus et al., 2008). Brumel vd. (2002), enfeksiyonun sonucunun, hem konağın hem de enfekte eden *Salmonella* serovarının birbiriyle uyumuna, mikroorganizmanın enfekte etme kabiliyetine ve konağın enfeksiyona karşı savunma yeteneğine bağlı olduğunu belirtmiştir. Sürüye bağlı olarak sığırlar,

enfeksiyonun hem enterik hem de sistemik fazlarına yenik düşebilir (Wallis et al., 1995).

Birkaç farklı *Salmonella* serotipinin sığır salmonellozisi ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Bunlardan *S. Dublin* ve *S. Typhimurium* yaygın olarak rapor edilmektedir (Zhang et al., 2003; Nielsen et al., 2004; Costa et al., 2012; Nielsen, 2012; Ruby et al., 2012). Bu iki serotip ile sığır enfeksiyonlarında farklılıklar görülmektedir. *S. Dublin* ile enfekte olan gebe düveler genel olarak sınırlı klinik belirtiler gösterirken abort yapma olasılıkları daha yüksektir (Santos et al., 2001). *S. Dublin*, yetişkin sığırlarda önemli morbiditeye neden olurken, buzağılarda yüksek morbidite ve mortalite görülmektedir (Mitchell, 2019).

Buzağılardaki en önemli klinik bulgu, *S. Typhimurium*'un neden olduğu ishal bulgusudur (Wray and Sojka, 1981; Santos et al., 2001). Ancak Santos vd. (2001), buzağılarda *S. Dublin* ile poliartrit, osteomyelit, meningoensefalit ve pnömoni gibi çeşitli patolojik sonuçlara yol açabilen daha invaziv bir enfeksiyonun gözlemlendiğini de bildirmişlerdir.

Potansiyel olarak, *S. Dublin*'in prevalansının, klinik belirtilerin olmadığı sürülerde, enfeksiyon latent kaldığı için daha düşük olduğu tahmin edilmektedir (Wray and Davies, 2000). Abort, asemptomatik gebe sığırlarda gözlemlenen tek klinik belirti olabileceğinden, abort araştırmaları sırasında yapıcı etkenler arasında *S. Dublin* düşünülmelidir (Mateus et al., 2008).

2.1.9. Koyunlarda *Salmonella* Enfeksiyonları

Salmonellozis, ruminantlarda en yaygın görülen hastalıklardan biri olarak ele alınmaktadır (Ferrerias et al., 2007). *Salmonella* enfeksiyonu, çoğunlukla klinik ve subklinik formları olan enterik bir enfeksiyondur. Salmonellozis, bazı hayvanlarda klinik belirti göstermeksizin persiste enfeksiyona neden olabilir ve lenf düğümlerine yerleşerek yıllarca dışkıyla saçılabilir. Bu nedenle, *Salmonella* sürüde var olabilir, ancak hayvanlar stres faktörleri veya başka nedenlere maruz kaldıklarında enfeksiyon aktif hale gelerek salgına sebep olabilir (Acha and Szyfres, 2001; Veterinary Record, 2017). Salmonellozisin en yaygın klinik belirtisi, ishale veya ölümcül olabilen septisemiye neden olan enterittir. Daha az yaygın olarak, süperatif epididimo-orşit, artrit, solunum sistemi enfeksiyonları, menenjit, abort ve ölü doğuma da neden olabilir (Ferrerias et al., 2007; Veterinary Record, 2017).

Salmonellozis, ishal, ölümler ve veteriner maliyetleri nedeniyle koyun ve keçi yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olan en ciddi sorunlardan biridir. *Salmonella* enfeksiyonu, koyun ve keçi sürülerinde ishallerin en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Shabana et al., 2017). *Salmonella* enfeksiyonunun şiddeti, serovar, virülans ve antimikrobiyal duyarlılığı da içeren çeşitli bakteriyel faktörlere bağlıdır. Ancak küresel olarak tanımlanmış 2600'den fazla *Salmonella* serovarı vardır ve son serovarlar her yıl literatüre eklenmektedir (Jajere, 2019).

Koyun patojeni *S. enterica* serovar Abortusovis, konakçı olarak koyunlara adapte olmuş bir patojendir ve enfekte sürülerde yüksek oranda abortlara sebep olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Amagliani et al., 2022).

S. Abortusovis, konakçı spesifik bir serovardır, bu nedenle koyunlar için oldukça spesifiktir ve hiçbir insan enfeksiyonu bildirilmemiştir. Diğer *Salmonella* enfeksiyonlarının aksine, *S. Abortusovis* enfeksiyonu nadiren de olsa gastrointestinal hastalıkla sonuçlanmış ve *S. Abortusovis* DNA'sı dışkıda tespit edilmiştir (Belloy, 2009). Diğer bazı konakçıya özgü serovarlar gibi, *S. Abortusovis* da sıklıkla lenfatik organlara tropizm gösterir ve septisemik hastalığa ve abortlara neden olur (Singh, 2013). Enfekte naif sürülerdeki başlıca klinik belirtiler, diğer klinik semptomların yokluğunda gebe koyunların %30-50'sinde son trimesterde meydana gelen abortlardır. *S. Abortusovis* ayrıca bir aylıktan küçük kuzuların ölümlerine de neden olabilir. Bununla birlikte, birçok hayvan klinik belirtiler göstermeden enfekte olabilir (Uzzau, 2013). Bu hayvanlar, hastalığın yayılmasında önemli bir epidemiyolojik role sahiptir. Enfeksiyon genellikle taşıyıcı koyunlar tarafından sürüye sokulur. Kuzulama mevsimi boyunca ana enfeksiyon kaynağı, aborte fetüs, plasenta ve vajinal akıntılardır (Belloy, 2009). Bulaşma fekal-oral yolla gerçekleşirken solunum salgıları da enfeksiyonu yayabilir (Uzzau, 2013). Endemik bölgelerde, abort, enfekte bir sürüdeki koyunlarının %30-%50'sini etkileyebilir, ancak koyunculüğün yaygın olarak yapıldığı bölgelerde %90'a varan oranlarda ciddi hasara neden olduğu bildirilmiştir (Schiaffino et al., 1996; Spickler, 2017).

Hastalığın teşhisinde, bazı enfekte hayvanların asemptomatik davranışları nedeniyle sürveyans bazen zor olabilir (Uzzau, 2013). Bu nedenle, *S. Abortusovis* enfeksiyonları bazı bölgelerde yetersiz teşhis ile sonuçlanabilir (Wirz-Dittus et al., 2010). Hastalığın sağaltımında antibiyotik tedavisi uygulanırken kontrol amaçlı ve

paratifoya bağlı abortları önlemek amacıyla da canlı ve inaktif aşular geliştirilmiştir (Cagiola et al., 2007). Bu nedenle, özellikle canlı hayvan hareketi ve ihracatı durumunda, enfeksiyonun yayılmasını önlemek için sürveyans konusunda tedbirli olmanın önemi ortaya çıkmaktadır.

2.2. Salmonellozisin Tanısında Kullanılan DNA-RNA Tabanlı Yöntemler

Moleküler tanı yöntemleri, nükleik asit dizilerine karşılık gelen genomik yapıların analizine dayanmaktadır. Bakterilerin taksonomisi ve filogenetiği, korunmuş genlerin, özellikle ribozomal ribonükleik asitleri (rRNA) kodlayan gen dizilerine bağlıdır. Bu gen dizileri her yerde bulunabildiğinden ve çeşitli mutasyon oranlarına sahip kısımlar (bazıları yüksek oranda korunmuş, diğerleri oldukça değişken) içerdiğinden, bir saatin kollarına benzer şekilde evrensel moleküler kronometreler olarak kullanılırlar. 1960'lardan itibaren ortaya çıkan moleküler teknikler, mikroorganizmaların cinsi, türü, antibiyotik duyarlılığı ve canlılığı hakkında klinik olarak gerekli bilgileri sağlayan parmak izi ve karakterizasyonuna izin vermektedir. Moleküler tekniklerle teşhis, çoğunlukla rRNA'nın doğrudan karakterizasyonu, genlerin amplifikasyonu, amplikonların karakterizasyonu veya ribozomal genlerin doğrudan sekanslanması yoluyla elde edilmektedir (Varadi et al., 2017).

1990'ların başında, PCR saf bakteri kültürlerinin veya agar plakalarındaki kolonilerin basit tanımlanması amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. O yıllardan günümüze kadar, Salmonellozisin teşhisinde uygun örneklerden mikroorganizmanın tespit edilmesi amacıyla; nested PCR, reverse transcription (RT)-PCR tabanlı teknikler, kantitatif PCR ve nükleik asit dizisi bazlı amplifikasyon (NASBA) yöntemleri gibi alternatif amplifikasyon teknikleri geliştirilmiştir. En son gelişmeler, canlı bakteri patojenlerinin haberci RNA (mRNA) tabanlı tespiti, gerçek zamanlı PCR (rt-PCR) ve amplifiye fragman uzunluk polimorfizmi (AFLP) gibi gelişmiş tiplendirme tekniklerini içermektedir (Rupens and Herman, 2002).

2.1.1. Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH)

Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) teknikleri, morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, doku veya hücrelerde bulunan spesifik nükleik asit dizilerinin saptanmasına dayalı bir yöntemdir. Bu teknik ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce geliştirildiğinde, sadece nükleik asitler için radyoizotop etiketleri mevcutken

günümüzde doğrudan veya dolaylı radyoaktif olmayan hibridizasyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kim et al., 2017).

Dolaylı yöntemler, bir nükleik asit probunun, sırasıyla spesifik bir antikor ve streptavidin kullanılarak belirlenmesi sonucu oluşan digoksisinin (DIG) ve biyotini içermektedir.

Direkt yöntemlerde, bir haberci molekül (örneğin floresin veya florokrom) doğrudan nükleik asit probuna bağlanır, böylece prob-hedef hibritleri hibridizasyonunun hemen ardından mikroskopi ile görselleştirilebilir. FISH, bir ucunda bir floresan boya ile kovalent olarak etiketlenmiş DNA veya RNA problemlerine bağlanarak belirli bir organizmanın belirli bir dizisini tanımak için tasarlanmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi, FISH, çeşitli örneklerde mikroorganizmaların eşzamanlı doğrudan görselleştirilmesine, tanımlanmasına ve histolojik lokalizasyonuna izin vermektedir. Bu teknik aynı zamanda floresan mikroskobu ile mikroorganizmaların sayımını ve/veya miktarını belirlemeyi de kolaylaştırmaktadır. Bu şekilde FISH, enfeksiyon ile mevcut histopatolojik değişiklikler arasındaki korelasyonların da ortaya çıkmasına izin vermektedir (Kim et al., 2017).

Bu basit tekniğin birçok avantajı olmasına rağmen, kullanımdan önce farklı numuneler ve problemler için optimize edilmesi gerekmektedir. Örneğin, Gram pozitif bakterilerde, bakteri hücrelerine prob penetrasyonunu engelleyen peptidoglikan tabakasının çıkarılması amacıyla lizozim veya lizostafin ile muamele edilmesi gerekmektedir (Cai et al., 2014). FISH'in klinik tanıdaki bir diğer dezavantajı da, çoğu rutin tanı laboratuvarında bulunmayan floresan mikroskopisine ihtiyaç duyulmasıdır.

2.2.2. DNA Mikroarray

DNA mikroarray, mikroskop lamı gibi cam, plastik veya silyondan daha katı düzlemsel bir yüzey üzerine spesifikliği bilinen yapıların (DNA, protein vb) sabitlenmesi ile elde edilen mikroarraylerin kullanıldığı bir test yöntemidir ve mikroorganizmaların tespiti ve tanımlanması için kullanılmaktadır (Fukushima et al., 2003). Mikroarraylerin üzerinde bulunan farklı spesifiklikteki noktaların her birine prob adı verilmektedir. Problemlerin her biri birbirinden farklıdır. DNA Mikroarray ile hücre ve dokulardaki tüm gen ekspresyonları incelenebilmektedir. Bir mikroorganizmanın tüm genleri mikroskop lamı ölçeğinde bir alana spotlanabilir (yazdırılabilir) ve çok sayıda genin ekspresyon seviyeleri tek seferde eş zamanlı

olarak analiz edilebilir. Küçük miktarlarda örneklerle çalışıldığında bile çok sayıda genin ekspresyonu sağlanabildiği için yüksek verimli teknoloji olarak da kabul edilmektedir (Schena et al., 1995; Yoltaş and Karaboz, 2010).

Bir DNA mikroarrayı genellikle tek sarmallı DNA oligonükleotid problemlerinden oluşur. Bu teknik, kullanılan prob sayısına göre düşük ve yüksek yoğunluklu DNA mikrodizileri olmak üzere iki tipe ayrılabilir. Genel olarak, ilgilenilen bir patojenden ekstrakte edilen toplam DNA etiketlenir (kimyasal olarak veya bir enzimatik reaksiyonla) ve daha sonra bir DNA mikrodizisi üzerindeki aynı kökenli tanıma probuyla hibridize edilir. Spesifik olmayan hedef DNA, farklı yıkama aşamaları sırasında çıkarılır. Başarılı hibridizasyon sonucu oluşan pozitif sinyaller bir tarayıcı tarafından otomatik olarak ölçülür. Patojen çeşitliliği, dahil edilen yazılım kullanılarak analiz edilir (Kim et al., 2017).

DNA mikroarray teknolojisi, genlerin ve gen polimorfizmlerinin araştırılması, ekspresyon ve mutasyon analizleri, evrimsel çalışmalar ve sekans analizleri gibi birçok alanda kullanılabilir (Bal ve Budak, 2012).

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR)

Mikrobiyal tanıda umut verici gelişmeler, ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA) problemlerinin kullanımıyla başlamıştır. Moleküler tanı testleri, antikorların kullanımına bağlı özgüllük sorunlarının, bir organizmanın nükleik asidini doğrudan hedef alan RNA veya DNA problemlerinin kullanılarak aşılabilirliğini göstermiştir. Bu nedenle, pozitif bir hibridizasyon sinyali organizmanın mevcudiyeti ile ilişkilidir. Klonlanmış problemler kullanılabilir de, şu anda kullanılan problemlerin çoğu sentetik oligonükleotidlerdir (Rupens and Herman, 2002).

PCR, mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan nükleik asit amplifikasyon teknolojisidir. PCR tabanlı teknikler, küçük miktarlardaki genomik DNA'lardan veya çeşitli örneklerden hazırlanan RNA'lardan türetilen cDNA'lara özgü spesifik dizilerin amplifikasyonuna dayalı birçok çalışma alanında devrim yaratmıştır. Bu nedenle PCR, in vitro koşullar altında izole edilmesi veya kültüre edilmesi çoğu zaman imkansız olan enfeksiyöz ajanları kolaylıkla saptayabilir. PCR, patojenleri tespit etmek için oldukça spesifik ve hassas bir yöntem olmasına rağmen, karmaşıklığı, yetersiz PCR ürün verimi ve karışımdaki primerler ve diğer DNA'lar arasındaki spesifik olmayan bağlanmalar kullanımını kısıtlar. Bu sorunların

üstesinden gelmek için de çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Bu amaçla Hot-start PCR ve touch-down PCR gibi yöntemler, istenen hedef dizilerin amplifikasyonunu geliştirmek ve spesifik olmayan bağlanmaları ve diğer PCR artefaktlarını azaltmak için kullanılmaktadır. Diğer bir seçenek Nested PCR ile, DNA amplifikasyonunun özgüllüğü ve duyarlılığı iki ardışık PCR reaksiyonunda iki farklı primer seti kullanılarak artırılmaktadır. Bu yöntemde, birinci reaksiyonda üretilen ürünler, ikinci bir PCR reaksiyonuna tabi tutulur (ikinci reaksiyonun primer seti, birinci reaksiyon ürünü içindeki bir DNA dizisini çoğaltır) (Kim et al., 2017).

RNA virüsleri gibi RNA'nın hedef alındığı testlerde, bir ters primer veya rastgele primerler kullanılarak ve tamamlayıcı DNA zincirinin (cDNA) sentezlendiği bir adımından oluşan ters transkriptaz PCR (RT-PCR) kullanılarak da ampikon tespit edilebilir (Kim et al., 2017).

Multiplex PCR, birden fazla primer çifti kullanılarak, birden fazla hedefin amplifikasyonuna ve hedef organizmalar için farklı boyutlarda spesifik ampikonların oluşmasını sağlayan moleküler bir yöntemdir. Multipleks PCR testi, aynı anda birkaç patojeni tanımlayabilse de, problemler ve hedef DNA arasındaki çapraz reaksiyonlar ve geleneksel elektroforez ile PCR ürünleri arasında boyut farklarının oluşabilmesinden kaynaklanabilecek zorluklar nedeniyle altıdan fazla hedef patojenin dahil edilmesi sorunlara yol açabilmektedir (Warsen et al., 2004).

Gerçek zamanlı RT-PCR, DNA'nın PCR tekniğiyle çoğaltılmasını ve ekranda gerçek zamanlı olarak görüntülenmesini sağlayan ve floresan işaretli problemlerin veya boyaların kullanıldığı bir çoğaltma yöntemidir. Bu yöntem ile, geleneksel PCR deneylerine göre, PCR'in erken aşamalarında reaksiyon kinetiğinin ölçülmesi sayesinde reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre değerlendirildiği tekniğe göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Real time PCR'da ampikon varlığının belirlenmesinde, SYBR®Green ve Eva Green® gibi, DNA'ya bağlandıktan sonra floresan yayan ve spesifik olmayan DNA bağlayıcı boyalar kullanılmaktadır (Kim et al., 2017).

Gerçek zamanlı PCR'da üç tip etiketli prob kullanılmaktadır. Bunlar; bölünme tabanlı problemler, moleküler işaretçiler ve FRET (Forster rezonans enerji transferi) problemleridir. TaqMan® problemleri olarak da bilinen bölünme bazlı problemler en yaygın şekilde kullanılanlardır ve sıklıkla 5' ucunda yüksek enerjili bir boyayı ve 3' ucunda ise düşük enerjili bir molekülü (örn. TAMRA) içerir. Taq DNA polimerazın 5' ile 3' ucu eksonükleaz aktivitesi ile bölündüğünde, başlangıç ile bitiş arasındaki mesafe

artar, bu da enerji transferinin durmasına neden olur. Böylece, başlangıç noktasının floresansı artar ve bitiş noktasının floresansı azalır. Yüksek maliyetine rağmen, gerçek zamanlı PCR'ın avantajları, şüpheli örneklerde veya dokularda etiyolojik etkenlerin saptanmasını ve miktar tayini için kullanımını mümkün kılar. Gerçek zamanlı PCR, çok çeşitli örnek türlerinde çok düşük nükleik asit seviyelerini tespit edebildiğinden, bu alanda önemli bir teşhis yöntemi olarak varlığını sürdürecektir (Kim et al., 2017).

2.2.4. İlmige Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)

LAMP teknolojisi, izotermal koşullar altında gerçekleşen bir sarmal yer değiştirme prensibine dayalı, yenilikçi, PCR tabanlı olmayan bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Örnekler, primerler ve DNA polimeraz karışımının sabit bir sıcaklıkta inkübe edilmesiyle nükleik asit dizilerinin hem amplifikasyonunu hem de tespitini sağlayan, basit ve uygun maliyetli bir yöntemdir (Notomi et al., 2000).

LAMP'ın amplifikasyon verimliliği oldukça yüksektir ve DNA'nın ilk ısı denatürasyonuna veya termal döngüye gerek olmadığından reaksiyon hızla ilerler.

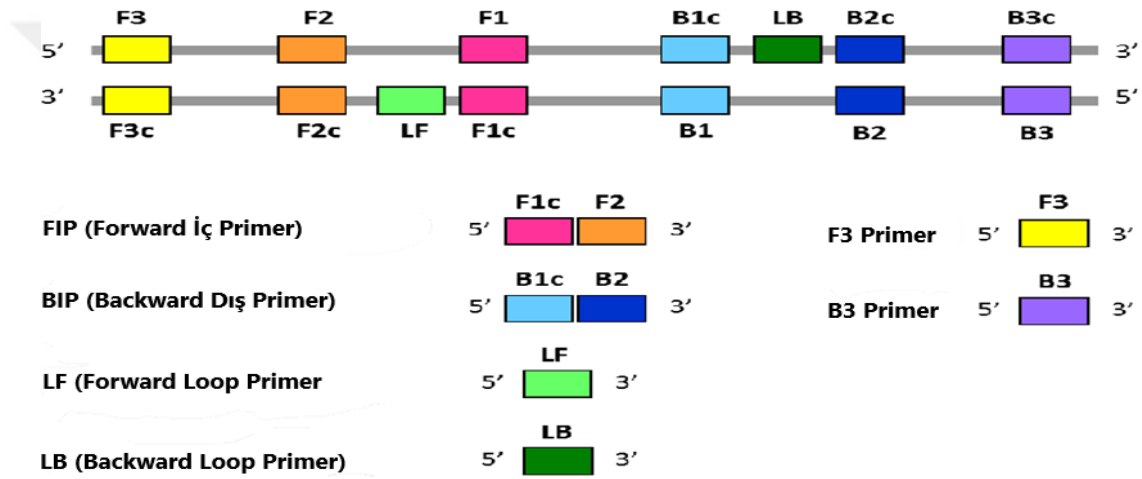
LAMP şimdiye kadar, bakteriler (Nakao et al., 2010; Yang et al., 2009; Aryan et al., 2009), virüsler (Kaneko et al., 2005), mantarlar (Sun et al., 2009; Uemura et al., 2008), parazitler (Chen et al., 2009; Zhang et al., 2009; Nkouawa et al., 2009) ve insan DNA'sı (Minnucci et al., 2012) gibi birçok farklı organizmanın DNA'sının tespiti için yüzlerce makalede araştırılmıştır. LAMP, kendine özgü özellikleri sayesinde, moleküler tıpta kolay ve hızlı bir teşhis aracı olarak kabul görmüştür.

Bununla birlikte, bu yöntemin uygulama alanlarını genişleterek, reaksiyon karışımına bir ters transkriptaz eklenmiş ve RNA'nın saptanması ve amplifikasyonu için de bir Ters Transkripsiyon (RT) LAMP geliştirilmiştir (Parida et al., 2004; Ushio et al., 2005).

Bu nedenle, LAMP, PCR ile kıyaslanabilir bir hassasiyet ve niceliksel performansı ile sekans tespiti için PCR'a bir alternatif oluşturur. Hızlı, kolay ve potansiyel olarak ucuz bir moleküler teşhis platformunda farklı tespit yöntemlerine, simpleks ve multipleks reaksiyon uygulamalarına da imkan sağlar (Parida et al., 2008).

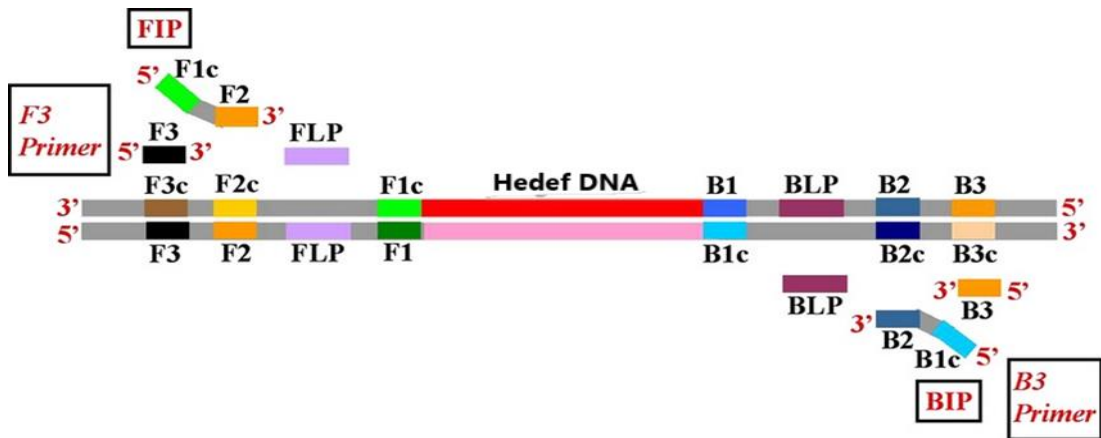
2.2.4.1. LAMP Prensibi

LAMP, sürekli döngülü iplikçik yer değiştirme aktivitesine sahip *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA polimeraz enzimi sayesinde DNA sentezini gerçekleştiren nükleik asit temelli bir yöntemdir. Bu DNA sentezinde dört tanesi zorunlu diğer iki tanesi reaksiyonu hızlandırıcı etkiye sahip toplamda altı primer kullanılmaktadır. İç primerler; forward inner primer (FIP) ve backward inner primer (BIP), dış primerler; forward outer primer (F3) ve backward outer primer (B3) ve ilmik primerler; loop forward (LoopF) ve loop backward (LoopB) olarak tanımlanır. Üçüncü primer çifti, genellikle testin hızını ve özgüllüğünü arttırmak için kullanılmaktadır (Hassan et al., 2022).



Şekil 2.2. LAMP primerlerinin tasarımı (Montrasio, 2016).

Her iki iç primer, hedef DNA'nın komplementer dizilerine karşılık gelen iki farklı diziyi (FIP primeri için F1c + F2 ve BIP primeri için B1c+B2) içerir (Şekil 2.2).



Şekil 2.3: LAMP reaksiyonu için gerekli olan, hedef gen üzerindeki altı farklı nükleotid dizisini tanıyan dört primerin şematik gösterimi: iki dahili primer (FIP, BIP) ve iki harici primer (F3, B3) (Xu et al., 2013).

LAMP amplifikasyon mekanizması üç adımı içerir (Şekil 2.4):

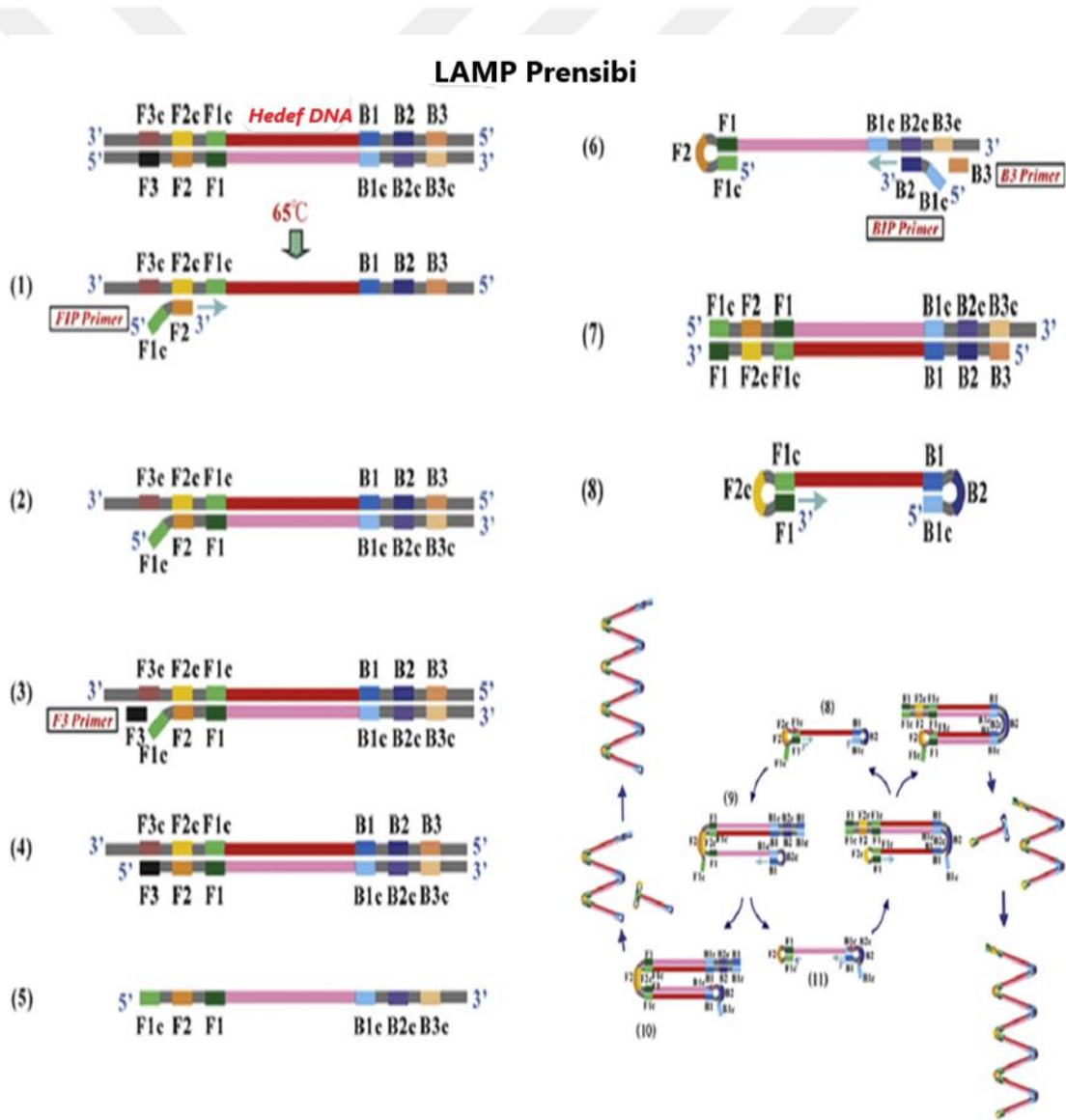
- I. başlangıç yapısının üretimi;
- II. dögüsel büyütme;
- III. uzama ve geri dönüşüm.

Dört primerin hepsi, reaksiyonun ilk aşamalarında çalışır, sonraki dögü aşamalarında, sarmal yer değiştirme için yalnızca iç primerler gereklidir.

Primer tasarımı göz önüne alındığında, FIP ve BIP'in LAMP reaksiyonunda ana rolü oynadığı görölmektedir. Bu iki primer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) saflığında olmalıdır. FIP, F1c ve F2 dizilerinden, BIP ise B1c ve B2 dizilerinden oluşan hibrid primerlerdir. Primerlerin dizaynı gen üzerindeki sekiz hedef bölgeye göre yapılmaktadır. Buna göre; F3c, F2c, F1c ve FLP primerleri 3' yönünden, B1, B2, B3 ve BLP primerler ise 5' yönünden seçilmelidir (Şekil 2.3). Başlangıç yapının üretimi sırasında, DNA sentezi FIP'den başlatılır. Daha sonra F2 bölgesi hedef DNA'nın F2c bölgesiyle bağlanır ve uzamayı başlatır. BIP ile DNA amplifikasyonu da benzer şekilde devam eder. Dış primer F3, hedef DNA'nın F3c bölgesiyle kaynaşır ve iplikçik uzaklaştırma işlemi gerçekleşir. FIP'den gelen uzamış DNA iplikçığı yer değiştirerek serbest bırakılır. Serbest kalan tek iplikçikli yapılar 5' ucunda ilmiğe benzer bir yapı oluşturur (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008). Daha sonra, tek iplikçikli DNA, BIP ve B3 primerleri şablon kullanarak her iki uçta dumbel benzeri ilmik yapıyı oluşturarak DNA sentezini devam ettirir. Bu şekilde ilmik yapıların oluşumu LAMP reaksiyonu için başlangıcı oluşturur ve bu durumda denatürasyon basamakları da ortadan kalkar. Oysaki, PCR işlemlerinde farklı denatürasyon sıcaklık uygulamaları, tek iplikçikli DNA elde edilebilmesi için gerekli işlemlerdir (Notomi et al., 2000).

Sabit bir reaksiyon sıcaklığında, iç primer FIP, hedef DNA'da F2c'ye hibritleşir (yapı 1,2) ve tamamlayıcı iplik sentezi başlar (Şekil 2.4). Dış primer F3, hedefte F3c'ye hibridize olur ve yeni DNA zincirinin (yapı 3) zincir yer değiştirmesini başlatarak, bir uçta ilmekli bir yapı oluşturan FIP-bağlı tamamlayıcı bir zinciri serbest bırakır (yapı 4). Bu tek sarmallı DNA, BIP ile başlatılan DNA sentezi için şablon görevi görür (yapı 5) ve ardından, hızla bir kök-ilmek DNA'sına dönüştürülen bir dambıl formundaki DNA'nın üretimine yol açan dış primer B3, B3c'ye hibridize olur ve sarmal yer değiştirme DNA sentezi gerçekleşir (yapı 6,7). Dambıl, LAMP reaksiyonunun ikinci adımı olan LAMP üstel amplifikasyonu için başlangıç yapısı olarak hizmet eder. Kök dögü DNA yapısı, bir 3' terminalinden ve bir dahili

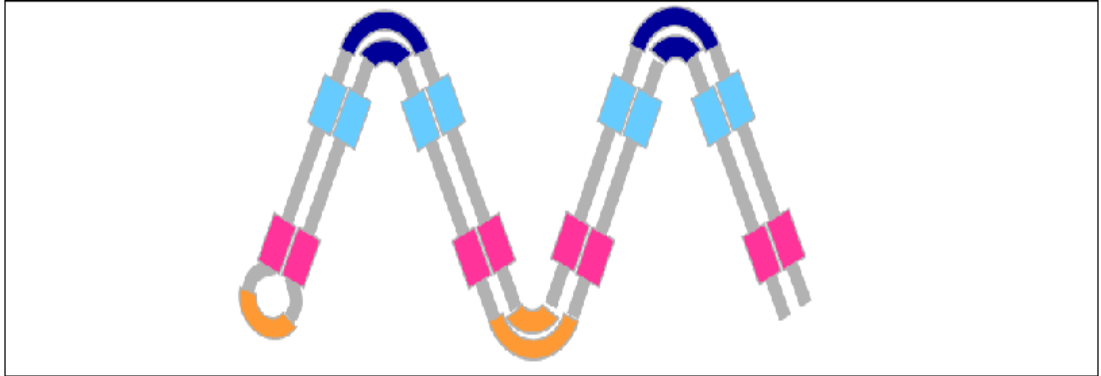
primerden (FIP veya BIP) oluşan bir amplifikasyonu desteklediğinden, tüm LAMP amplifikasyon sürecinin başlangıç noktası olan bir çift kök döngü içerir (yapı 8). Amplifikasyon sırasında, FIP, kök-ilmek DNA'sındaki ilmeğe hibridleşir ve BIP sekansı yoluyla karşı uçta oluşturulan diğer bir ilmeğe doğru sarmal yer değiştirme DNA sentezini başlatır (yapı 8). İplikçik yer değiştirme DNA sentezi sonucunda oluşan ürünler, orijinal kök ilmek DNA'sının bir tamamlayıcı yapısını ve karşı uçtaki (yapı 9) kök ilmek DNA'sını (yapı 10) içerir. Bu ürünlerin her ikisi daha sonra sonraki döngülerde ve uzama ve geri dönüşüm adımında BIP ile iplikçik yer değiştirme reaksiyonu için şablon görevi görür (yapı 11). Böylece, LAMP'de hedef dizi, her yarım döngüde 3 kat büyütülür. Amplifikasyon, kendini geliştirerek ilerler, her bir iplik, oluşan yeni ilmeklerin uzamasıyla yer değiştirir (Notomi et al., 2000).



Şekil 2.4: LAMP reaksiyonunun aşamalarının şematik gösterimi. Bu şekil, primer FIP'den başlayan süreci gösterir. DNA sentezi ayrıca primer BIP'den de başlayabilir (Sahni et al., 2012).

Özet olarak, hedef amplifikasyon, iç primerlerden birinin (FIP) hedef diziyeye bağlanması ve tamamlayıcı ipliği polimerize etmesiyle başlar. Yukarı yöndeki dış primer (F3) daha sonra yeni oluşturulan ipliği değiştirerek ve iplik uçlarından birinde (3' uç) ilk ilmek yapısını oluşturarak iplik amplifikasyonunu başlatır. Aynı işlem diğer ip ucunda da gerçekleşir ve LAMP dambıl yapısının oluşmasına yol açar. LAMP dambıl yapısı ve diğer oluşturulmuş şeritler, izotermal amplifikasyonun hızlı bir zincirleme reaksiyonuna izin veren çoklu amplifikasyon başlatma bölgeleri içerir. Amplifiye edilmiş hedef sDNA'daki artış, magnezyum pirofosfat oluşumu nedeniyle türbidimetrik olarak, SYBR Green veya kalsein gibi sDNA'ya özgü boyalar tarafından floresan olarak ya da fenol kırmızısı veya nötr kırmızı gibi pH'ya duyarlı bir boya kullanılarak kolorimetrik olarak tespit edilebilir (Hassan et al., 2022).

Son ürün, aynı iplikçikteki hedef dizinin dönüşümlü olarak tersine çevrilmiş tekrarları arasında oluşturulan, dambıl benzeri yapıya sahip kök-halka DNA'nın bir karışımıdır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. LAMP reaksiyonunun ana amplifikasyon ürünleri olan tersine çevrilmiş tekrarlı konkatamerlerin şematik gösterimi (Montrasio, 2016).

2.2.4.2. Loop Primerler

LAMP reaksiyonunu hızlandırmak için Loop Primer adı verilen ek primerler eklemek mümkündür. Loop Primer LF (Loop Primer Forward) veya LB (Loop Primer Backward), dambıl benzeri yapının 5' ucundaki tek iplikli ilmek bölgesine (F1 ve F2 bölgeleri arasında veya B1 ve B2 bölgeleri arasında) tamamlayıcı diziler içerir ve aynı zamanda DNA sentezi için artan sayıda başlangıç noktası sağlar.

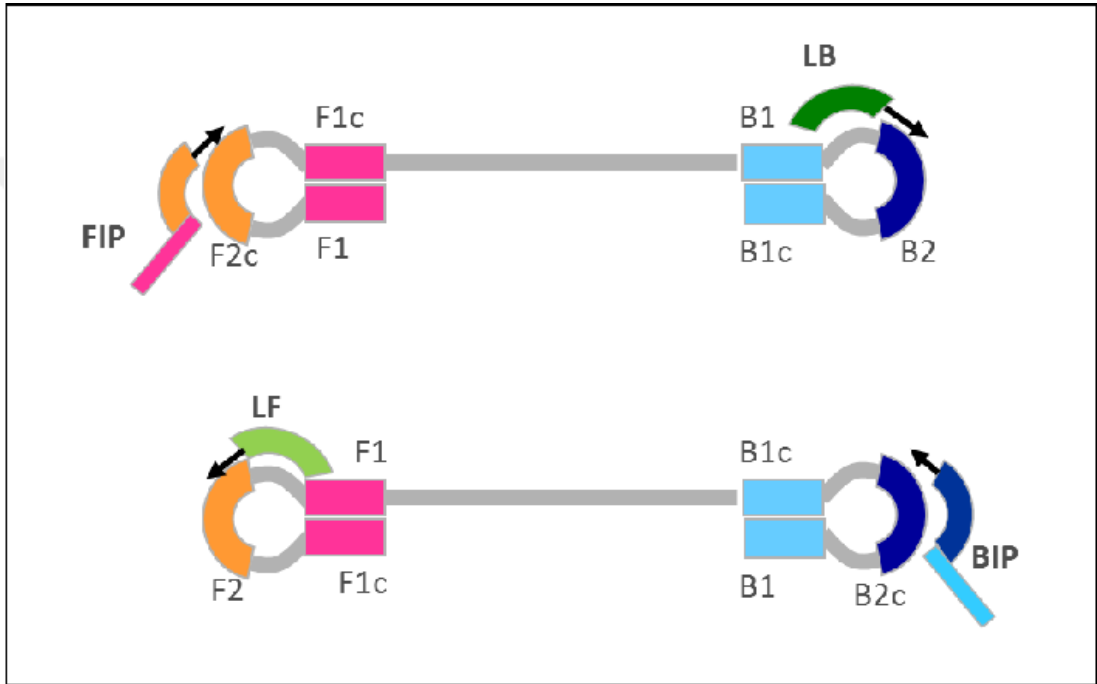
Özellikle, bir LAMP reaksiyonu sırasında iki farklı tür (Şekil 2.6) dambıl benzeri yapı üretilir:

1.FIP primeri ve LB primerinin (varsa) hibritlendiği dambıl: LB primeri, BIP primerinin kendi kendine uzamasıyla oluşturulan kök-ilmek yapısı üzerinde uzarken,

FIP primeri dambıl benzeri yapının ikinci kök-ilmek yapısı üzerindeki tamamlayıcı diziye hibritleşir.

2.BIP primeri ve LF primerinin (varsa) hibritleştiği bir dambıl: LF primeri, FIP primerinin kendi kendine uzaması ile oluşturulan kök-ilmek yapısı üzerinde uzarken, BIP primeri, dambıl benzeri yapının ikinci kök-ilmek yapısı üzerindeki tamamlayıcı diziye hibritleşir.

Sonuç olarak, her ilmek primeri, iç primer tarafından hibridize edilmeyen kök ilmeğe hibritleşecek ve iplik değiştirme DNA sentezini başlatacaktır.



Şekil 2.6. Bir LAMP reaksiyonu sırasında oluşturulan iki kök halka yapısının (“dambıl” yapıları olarak da adlandırılır) şematik gösterimi: FIP ve LB primerleri bir dambıl tipinde hibritleşirken, BIP ve LF primerleri diğer dambıl tipinde hibritleşir (Montrasio, 2016).

Loop primerleri, amplifikasyon reaksiyonunun katalizörleri olarak işlev görür, çünkü onların varlığı DNA üretim hızını ve dolayısıyla yöntemin duyarlılığını artırır, orijinal LAMP yönteminin reaksiyon süresini önemli ölçüde azaltır (Nagamine et al., 2002).

Bu özel amplifikasyon yöntemleri ile denatürasyon adımlarına ihtiyaç duymadan DNA ipliklerinin *Bst* polimeraz tarafından sürekli yer değiştirmesinden faydalanılarak, başlangıç DNA miktarını 60 dakikadan daha kısa bir sürede 1010 kata kadar yükseltmek mümkündür.

2.2.4.3. LAMP Reaksiyonunda Kullanılan Enzimler (*Bst*–*Bsm* DNA polimeraz)

LAMP reaksiyonunda kullanılan DNA polimeraz enzimi, diğer PCR testlerinde kullanılan enzimden farklı özelliklere sahiptir. Bu enzimler, hem DNA'yı polimerize ederler hem de LAMP reaksiyonunda iplikçik yer değiştirme özelliğine sahiptirler (Tablo 2.3).

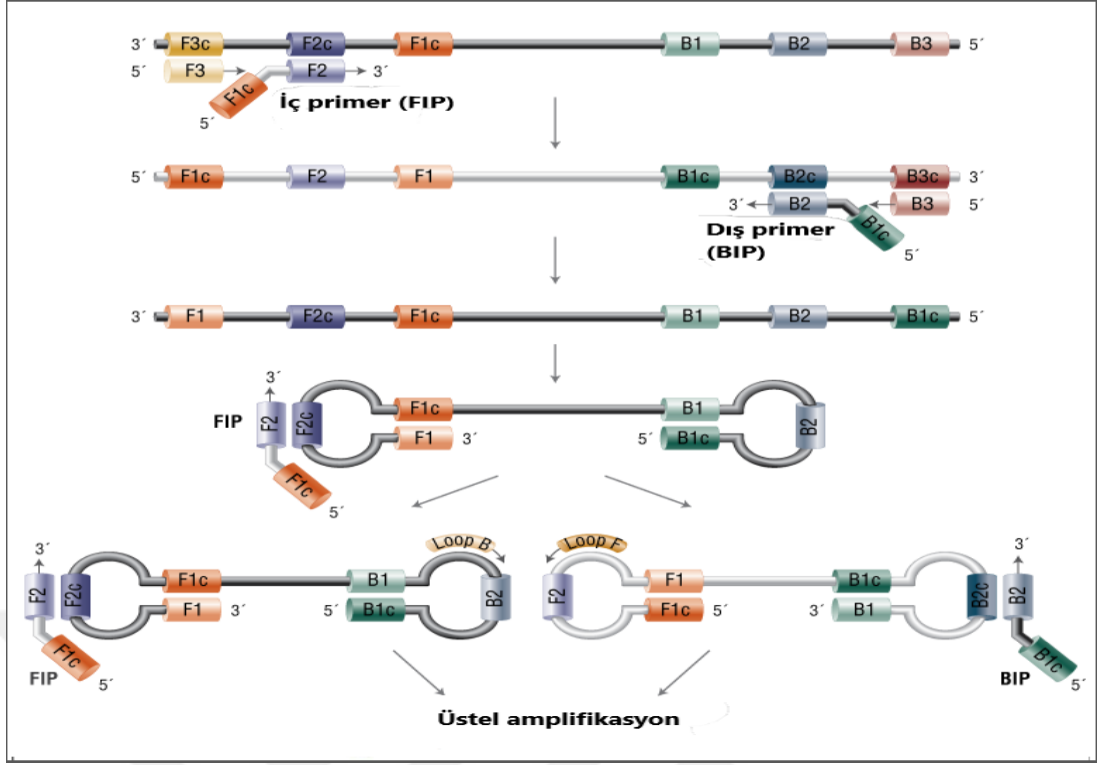
Tablo 2.3. LAMP için kullanılan polimeraz enzimleri ve özellikleri (Yüksel, 2018).

Enzim	Kaynak	Rekombinant kaynak	Çalışma sıcaklığı	Aktivite
<i>Bst</i> DNA polimeraz	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>E.coli</i>	30-65°C (Optimum 65°C)	İplikçik yer değiştirme ve DNA polimerizasyon
<i>Bsm</i> DNA polimeraz	<i>Bacillus smithii</i>	<i>E.coli</i>	30-63°C (Optimum 63°C)	İplikçik yer değiştirme ve DNA polimerizasyon

Bst polimeraz enzimi, *Bacillus stearothermophilus* bakterisinden, *Bsm* polimeraz ise *Bacillus smithii*'den elde edilmiştir. Her iki enzim de 5'-3' DNA polimerizasyonunu katalizleyebilir. Her iki enzim de genetik çalışmalarda kullanılmak üzere rekombinant olarak elde edilmektedir. *Bst* enzimi *Bacillus stearothermophilus*'a ait DNA polimeraz geninin *E.coli* bakterisinin maltoz bağlayan protein (*MBP*) genine aktarılması sonucu elde edilmektedir. *Bsm* enzimi ise *Bacillus smithii*'ye ait *polA* geninin *E.coli*'ye klonlanması sonucu rekombinant olarak elde edilmektedir. Her iki enzim de 80°C'de 10dk bekletildiğinde inaktive olur. Bu enzimler ekzonükleaz aktivitesi göstermedikleri için klasik PCR testlerinde kullanılmamaktadırlar (Chander et al., 2014; Fischbach et al., 2015).

2.2.4.4. LAMP Reaksiyonu Aşamaları

LAMP reaksiyonunda, dumbel benzeri yapıların oluşması izotermal amplifikasyonun gerçekleşmesi için en önemli basamaktır (Şekil 2.7). Çünkü ilmik yapıları genellikle tek iplikçiktir ve bu yapılar çoğunlukla FIP/BIP tarafından oluşturulmaktadır. Bu şekilde ilmik yapıların oluşması da denatürasyon basamaklarını ortadan kaldırmaktadır. İlk dumbel benzeri yapılar oluşuktan sonra devamında bu yapılar ve iç primerlerle döngüler devam eder. Sonuç olarak elde edilen ürünler farklı uzunluktaki temel ilmiklerden ve çoklu ilmiklerle birlikte karnabahar benzeri yapılardan oluşur (Montrasio, 2016).



Şekil 2.7. LAMP Reaksiyonu (Montrasio, 2016).

LAMP ile hedef DNA'nın çoklu kopyalarını içeren yüksek miktarlarda DNA iplikçikleri meydana gelir. Bu reaksiyon sırasında magnezyum pirofosfatlar meydana gelir ve bunlar bulanık çözelti şeklinde presipitatlar oluştururlar. Reaksiyon sonlandığında ise bu presipitatlar gözle görülebilir hale gelir. LAMP sonucunda amplifikasyonun meydana gelip gelmediğini anlayabilmek için çok çeşitli yöntemler vardır (Montrasio, 2016).

2.2.4.5. LAMP Amplifikasyon Ürünlerinin Tespiti

LAMP ürünleri amplifikasyon gerçekleştikten sonra doğrudan veya dolaylı olarak belirlenebilmektedir. Bunlardan geleneksel jel elektroforez, ELISA ve moleküler floresansa dayalı testler doğrudan; bulanıklık (turbidity), DNA interkalasyon boyaları gibi teknikler ise dolaylı belirleme yöntemleridir. LAMP amplifikasyon ürünlerini saptamak, pozitif ve negatif numuneleri ayırt etmek için yaygın olarak iki temel yöntem (türbidimetri ve floresan) kullanılmaktadır (Montrasio, 2016).

Bulanıklığın oluşması, LAMP reaksiyonunun yüksek amplifikasyon verimliliği ile mümkün olmaktadır (Mori et al., 2004; Mori et al., 2001). Bu saptama yöntemi, magnezyum pirofosfatın çökmesine bağlı olarak reaksiyon karışımının bulanıklığının ölçülmesinden oluşur. Bu çözünmeyen tuz, çözeltide bulunan Mg^{2+}

ile dNTP'lerin dahil edilmesi sonucu üretilen inorganik pirofosfatlar arasındaki etkileşim ile oluşturulur. Bu nedenle magnezyum pirofosfat miktarı, amplifiye DNA miktarı ile orantılıdır. Bulanıklık çıplak gözle görülebilir ve bir türbidimetre üzerinde bir geçirgenlik sinyali olarak ölçülebilir, nitel bir analiz için uç noktada veya gerçek zamanlı olarak kantitatif uygulamalara izin verir (Montrasio, 2016).

LAMP reaksiyon ürünlerinin tespitinde, çift sarmallı DNA'yı bağlayan floresan interkalasyon boya da kullanılmaktadır. Bunlar, LAMP amplikonlarının sentezi sırasında, reaksiyon boyunca floresandaki artışı ölçerek izotermal amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak doğrudan görselleştirilmesine izin verir. Bununla birlikte, türbidimetri ve floresan interkalasyon boya, spesifik ve spesifik olmayan ürünler arasında kolay ve hızlı bir ayırım yapmadan çift sarmallı DNA'yı tespit etmeye izin verdikleri için çok spesifik tespit yöntemleri değildir. Floresan etiketli hedefe özgü problemlerin kullanımı, özgüllük ve duyarlılığın artması ile sonuçlanır. Ek olarak, farklı hedeflere özgü farklı floroforların kullanımı, birçok diziyi aynı anda potansiyel olarak amplifiye etmeye izin verir (Montrasio, 2016).

2.2.4.6. LAMP Primer Dizayını

Doğru ve güvenilir bir niceleme, verimli primerler ve problemlerin kullanılmasına bağlı olduğundan, primerlerin ve problemlerin tasarımı, özellikle kantitatif testler için moleküler tanı tekniklerinin başarısını ve kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

LAMP'in yaygın olarak kullanılan uygulaması, toplam altı primer gerektirdiğinden (her biri iki primer bağlama bölgesini kapsayan FIP ve BIP primerleri ile), LAMP tekniği için primer tasarımı, bir hedef nükleik asit dizisinin sekiz farklı bölgesinin seçimini gerektirir. Buna ek olarak, LF ve LB, sırasıyla FIP primerinin F2 ve F1 bölgeleri ile BIP primerinin B2 ve B1 bölgeleri arasında kesinlikle konumlandırılması gerektiğinden, döngü primerlerinin konumlandırmalarında önemli kısıtlamalara sahiptir. Bu nedenle, LAMP primer tasarımı, özellikle polimorfik belirteçleri, karmaşık ikincil yapı içeren dizileri hedeflerken ve aynı zamanda translokasyonları veya mutasyonları tespit etmek için belirli bir bölge üzerinde tasarım yaparken son derece zor olabilir (Gandelman et al., 2011).

Ayrıca, her biri belirli bir reaksiyon sıcaklığında gerçekleşen üç farklı adımın (denatürasyon, bağlanma, uzama) tekrarlanan döngüleri ile meydana gelen PCR'ın aksine, LAMP deneylerinin sabit bir sıcaklıkta gerçekleştiği de dikkate alınmalıdır. Bu özellik, primer tasarımı aşamasında daha fazla karmaşıklığa sebep olur. Primerlerin erime sıcaklıklarının (T_m) doğru bir şekilde seçilmesi başarılı reaksiyonlar için önemlidir ve çok sayıda primerin hedef üzerinde bağlanmasının uygun reaksiyon sıcaklığında hassas bir şekilde düzenlenebilmesi için önemlidir. Ayrıca, reaksiyonda kullanılan primerler arasında, özellikle genellikle yaklaşık 40 nükleotid uzunluğundaki FIP ve BIP primerleri arasında dimer oluşumunu önlemek için önemli özen gösterilmelidir. Bunu yapmak için, primer tasarım yazılımının, LAMP deneysel koşullarına mümkün olan en kesin ve en yakın olan ikincil yapıların oluşumu hakkında tahminlerde bulunması gerekebilir (Montrasio, 2016).

LAMP primerlerinin tasarımı, 5' ucundan F3, F2, F1, B1, B2 ve B3 olarak belirlenen hedef dizideki altı bölgeye dayanmaktadır. FIP, F2c bölgesini tamamlayan F2 dizisinden (3' ucunda) ve 5' ucundaki F1c bölgesi ile aynı diziden oluşur. BIP, B2c bölgesini tamamlayan B2 dizisinden (3' ucunda) ve 5' ucundaki B1c bölgesi ile aynı diziden oluşur. LF, F1 ve F2 arasındaki bölgeye karşılık gelen tamamlayıcı iplik kullanılarak tasarlanırken, LB, B1 ve B2 arasındaki bölgeye karşılık gelen tamamlayıcı iplik kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 5) (Notomi et al., 2000).

Yüksek verimle spesifik amplifikasyon sağlayan en iyi primerleri potansiyel olarak seçmek için tasarım aşamasında dikkate alınması gereken birkaç önemli tasarım kriteri vardır (Alvarez-Fernandez, 2013; Hillier and Green, 1991; Hyndman et al., 1996; Rodriguez et al., 2015; Rychlik and Rhoads, 1989). Seçim süreci, ilk önce her bir primer için ve daha sonra primerlerin kombinasyonu (astar seti) için gerçekleştirilmelidir, çünkü tüm primerler, sanki bir 'senkronize ekip'miş gibi hedef üzerinde birlikte iyi çalışmak zorundadır.

Primerlerin optimal uzunluğunun 18-22 baz çifti (bp) olduğu genel olarak kabul edilir. Bu uzunluk yeterli özgüllük için yeterince uzun ve primerlerin bağlanma sıcaklığında kalıp DNA'ya kolayca bağlanması için yeterince kısadır. Primer uzunluğu, primerin erime sıcaklığını doğrudan etkiler. Bu nedenle, hedef dizinin baz çiftleri bileşimine bağlı olarak, bir LAMP reaksiyonunun sıcaklığıyla (genellikle 63-65°C) uyumlu T_m değerleri elde etmek için primerin uzunluğu optimal olandan daha

kısa (GC zengin bölge varlığında) veya daha uzun (AT zengin bölge varlığında) olabilir (Gandelman et al., 2011, Rychlik and Rhoads, 1989).

Primer guanin sitozin (GC) içeriği, toplam bazların yüzdesi olarak primerdeki G'ler ve C'ler nükleotidlerinin sayısına karşılık gelir ve %40-60 arasında olmalıdır. Özellikle, %50 ile %60 arasında GC içeriğine sahip primerler, nispeten iyi primerler olma eğilimindedir. GC içeriği, primer Erime Sıcaklığı (T_m) hesaplamasını ve primer uzunluğu aralığını doğrudan etkiler. GC içeriği ile ilişkilendirilebilecek başka bir parametre, GC kısılacıdır, yani primerlerin 3' ucundan itibaren son altı baz içinde ardışık G veya C bazlarının varlığıdır. GC kelepçesi, G ve C bazlarının daha güçlü bağı nedeniyle 3' uçta spesifik bağlanmayı kolaylaştırır. Ancak, primerin 3' ucunda 3'ten fazla ardışık G veya C'den kaçınılmalıdır (Gandelman et al., 2011; Peyret, 1999; Rychlik and Rhoads, 1989).

Optimal primerler, reaksiyonun özgüllüğünü tehlikeye atabilecek alternatif amplifikasyon ürünlerinin oluşumundan kaçınarak yalnızca hedef diziye hibridize edilmelidir. Bu nedenle tasarım aşamasında homoloji bölgelerinden kaçınmak gerekir. Spesifikliği test etmek için, primerler yaygın olarak tasarlanır ve daha sonra ilgili genomun tamamı BLAST'a yüklü primerler ile karşılaştırılır. Ayrıca, primerin spesifik olmayan bağlanma riskini potansiyel olarak azaltmak için primerin 3' ucu ile şablon arasındaki kısmi homoloji bölgelerini belirlemek ve bunlardan kaçınmak da önemlidir (Gandelman et al., 2011).

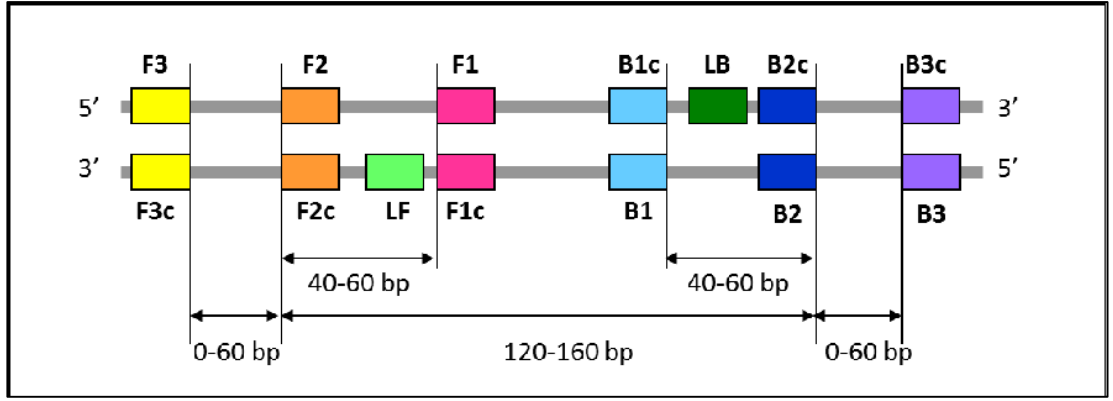
Primerlerin sonu (terminal kısmın son 6bp'si olarak düşünülmüştür) DNA sentezinin başlangıç noktası olarak hizmet eder ve bu nedenle belirli bir stabilite derecesine sahip olmalıdır. F2/B2, F3/B3 ve LF/LB'nin 3'uçları ve F1c/B1c'nin 5'ucu (F1/B1'in 3'ucuna karşılık gelir) serbest enerjideki değişim (ΔG değeri) -4kcal/mol veya daha az olacak şekilde tasarlanmıştır. Negatif ΔG değerleri, primer bağlanma bölgesinin daha yüksek termodinamik stabilitesini sağlar ve 3' uçlardan primer bağlanmasını ve DNA polimerizasyonunu destekler. Bununla birlikte, ΔG ne kadar negatif olursa, primer şablona o kadar sık bağlanır ve bu durum yanlış bağlanma riskini artırır (Gandelman et al., 2011; Montrasio, 2016).

Primerlerin, özellikle FIP ve BIP iç primerlerinin, ikincil yapıların oluşumunu önlemek için tasarlanmış olması önemlidir. Aslında, moleküller arası veya moleküller arası etkileşimler tarafından üretilen primer ikincil yapıların mevcudiyeti,

ürün veriminin düşük olmasına veya hiç olmamasına neden olabilir, bu da primerlerin bağlanmasını ve amplifikasyonunu olumsuz etkiler ve reaksiyon için primerlerin mevcudiyetini büyük ölçüde azaltır (Gandelman et al., 2011; Montrasio, 2016).

Primer Erime Sıcaklığı tanımı gereği, DNA dupleksinin bir yarısının tek iplikli hale gelmek üzere ayrışacağı sıcaklıktır. Bir primerin Tm'si, bir primer-kalıp DNA dupleksinin stabilitesinin bir indeksidir ve amplifikasyonun duyarlılığını ve özgülüğünü etkiler. Tm, gerçeğe en yakın değeri veren yaklaşıklık yöntemi olarak kabul edilen ve En Yakın-Komşu yöntemi kullanılarak hesaplanan hem primer uzunluğundan hem de GC içeriğinden, ayrıca tuz ve oligo konsantrasyonları gibi deneysel koşullardan da etkilenen bir yöntemdir. Bu nedenle, Tm'nin en doğru tahminleri, bir LAMP reaksiyonunun deneysel koşulları da dikkate alınarak hesaplanmaktadır. Primer Explorer V4 kılavuzuna (https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/) göre, her LAMP bölgesi için Tm, F1c ve B1c için yaklaşık 65°C (64-66°C); F2, B2, F3 ve B3 için yaklaşık 60°C (59-61°C); ve döngü primerleri için yaklaşık 65°C (64-66°C) olacak şekilde tasarlanmıştır. Daha yüksek erime sıcaklıklarına (66°C'nin üzerinde) sahip olan primerler, ikincil bağlanma eğilimine sahiptir (Gandelman et al., 2011; Montrasio, 2016).

Primerler, F2'nin sonundan B2'nin sonuna kadar olan mesafe 120 ile 160 baz arasında olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu bölge LAMP amplikonuna (LAMP yöntemiyle amplifiye edilen bölge) karşılık gelir ve dambıl yapısının boyutuyla yakından ilişkilidir. Primerler ayrıca F2'nin 5'ucundan F1'in 5'ucuna (ve B2'nin 5'ucundan B1'in 5'ucuna) olan mesafe 40 ila 60 baz arasında olacak şekilde tasarlanmıştır. Bunlar da ilmek primerlerinin hibritleştiği ilmekleri oluşturan bölgelerdir. F2 ile F3 arasındaki mesafe 0 ile 60 baz arasında olmalıdır (Şekil 2.8) (https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/). (SantaLucia, 1998).



Şekil 2.8. Bir LAMP primer tasarımında primerler arasındaki mesafe (Montrasio, 2016).

Genellikle bir LAMP reaksiyonunda hedef gen miktarına kıyasla büyük miktarda primer kullanılır. Primerler moleküller arası dimerleri, hedef DNA'ya hibridize etmekten daha kolay bir şekilde oluşturduklarında, ürün verimini düşürürler. Bu, özellikle primerin 3' ucunda meydana geldiğinde problemlidir. 3' uç, primer dimer artefaktlarına yol açacak şekilde kolayca uzayacaktır. Bu nedenle, primerlerin, özellikle FIP ve BIP iç primerlerinin ikincil yapılar oluşturmaması ve primer 3' uçlarının tamamlayıcı olmaması önemlidir. İkincil yapı oluşumunu üretebilen iki tür moleküller arası etkileşim vardır: self dimerler ve çapraz dimerler. Self dimerler, primerin iki kopyası birbirine bağlandığında oluşur, burada primer kendi kendine homologdur. ΔG 'si -5 kcal/mol olan bir 3'uçlu self dimer ve ΔG 'si -6 kcal/mol olan bir dahili self dimer genellikle tolere edilir. Çapraz dimerler, homolog oldukları farklı primerler arasındaki moleküller arası etkileşim ile oluşturulur. ΔG 'si -5 kcal/mol olan bir 3' uçlu çapraz dimer ve ΔG 'si -6 kcal/mol olan bir dahili çapraz dimer genellikle tolere edilir (Gandelman et al., 2011; Montrasio, 2016).

T_m , primer tasarımı için önemli bir parametredir. Bir primer seti düşünüldüğünde, T_m dengesi de esastır: özellikle, her primer çiftinin (F3/B3, F2/B2, F1c/B1c, LF/LB gibi) iki primeri, LAMP'in ürün verimini maksimize etmek için T_m ile yakından uyumlu olmalıdır (Gandelman et al., 2011; Montrasio, 2016).

2.2.4.7. Reverse Transcriptase-Qualitative LAMP (RT-Q-LAMP)

Başlangıçta Notomi tarafından açıklanan 'geleneksel' LAMP tekniği, DNA'nın hızlı amplifikasyonu için PCR'a alternatif bir izotermal yöntemdi ve 4 ila 6 primer ve iplik yer değiştirme aktivitesine sahip bir DNA polimeraz kullanımına dayalıydı (Notomi et al., 2000). Amplifikasyon reaksiyonu, araya giren boyaların bulanıklığı veya floresansı ölçülerek izlenebilirdi ancak her iki durumda da, reaksiyon

karışımında genellikle ilgili tek bir gen saptanabiliyordu. Yıllar içinde bu yöntemle ilgili değişiklikler yapılmış ve uygulanmaya çalışılmıştır. DiaSorin tarafından geliştirilen RT-Q-LAMP (“Reverse Transcriptase-Qualitative-LAMP”) tekniği, 'geleneksel' LAMP reaksiyonunun daha da geliştirilmesini temsil etmiştir (Spinelli et al., 2014). Floresan problemlerine, hem ters transkriptaz hem de DNA polimeraz aktivitelerine sahip yeni bir polimerazın eklenmesi, tek bir tüpte, tek bir enzimle, tek bir sıcaklıkta çoklu hedef genlerin amplifikasyonuna ve gerçek zamanlı tespitine olanak sağlamıştır. Bu uygulamalar, "geleneksel" LAMP yöntemi ile karşılaştırıldığında çeşitli avantajlar sağlar.

Birincisi, hem ters transkriptaz hem de DNA polimeraz aktivitelerine sahip bir polimerazın kullanılması, reaksiyon karışımına dahil edilen hedef RNA'nın tek aşamalı bir prosedürde hızlı ve doğrudan amplifikasyonuna izin vererek, genellikle uzun ve zahmetli olan daha fazla ters transkripsiyon adımından kaçınılmış olur. Ayrıca, ilgili transkriptlere özel etiketli oligonükleotit problemlerinin kullanımı, aynı reaksiyon tüpü içinde çok yüksek verimlilikle birden fazla hedef genin amplifiye edildiği bir LAMP multipleks teknolojisinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, özel flüoresans kanalları tarafından ortaya çıkarılan farklı dalga boylarında floroforların kullanılmasıyla, iki veya üç genin aynı anda amplifiye edildiği ve gerçek zamanlı olarak izlendiği dupleks ve tripleks reaksiyonları gerçekleştirilmenin mümkün olabileceği tespit edilmiştir (Gandelman et al., 2011; Montrasio, 2016; Spinelli et al., 2014;).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Referans Suşlar

Çalışmada kullanılan bakteri suşları (*Salmonella* Thyphimurium (NCTC74) ve *Salmonella* Enteritidis (NC4444) izolatları) ile *Eschericia coli* (ATCC35218), *Yersinia pseudotuberculosis* (ATCC29833), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Klebsiella pneumonia* (NCTC13465), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji ABD'den *S.Gallinarum* ve *S.Pullorum* saha suşları Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edildi.

3.1.2. Primerler

Salmonella'nın cins düzeyinde tanımlanması amacıyla *invA* geni tercih edildi. LAMP testi için primer tasarımı <https://primerexplorer.jp/e/> web sayfasından PrimerExplorer V5 software'i kullanılarak gerçekleştirildi. Araştırmada her bir gen için 1 dış ve 1 iç olmak üzere 2 çift primer (forward ve reverse olarak), seçimi National Center for Biotechnology Information NCBI genbankdaki nükleotid dizilimi temel alınarak belirlendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. *S. Enteritidis* LAMP optimizasyonu için planlanan primerler

Primerler(5'-3')	Primer lokalizasyonu	Primer uzunluğu	Primer dizisi
F3	600-618	19	GCGAAGCGTACTGGAAAGG
B3	808-826	19	TCAACAATGCGGGGATCTG
FIP		42	ATGATGCCGGCAATAGCGTCAC- AAAGCCAGCTTTACGGTTCC
BIP		39	GTGGGGATGACTCGCCATGG- ACCATCACCAATGGTCAGC

Tablo 3.1. de, belirtilen primerlerle yapılan optimizasyon denemelerinde beklenen sonuç elde edilemediğinden, Yang vd. (2018)'nin önerdiği primerler ile optimizasyon çalışmalarına devam edildi. Yang vd. (2018)'nin tasarladığı primerler Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. *S. Enteritidis* LAMP optimizasyonu için kullanılan primerler (Yang vd., 2018)

Hedef / Referans	Primer	Sekans (5'-3')
<i>Salmonella</i> spp. Yang vd. (2018)	FIP	FIP (F1c+F2): GCGCGGCATCCGCATCAATA- TCTGGATGGTATGCCCGG
	BIP	BIP (F1c+F2): GCGAACGGCGAAGCGTACTG- TCGCACCGTCAAAGGAAC
	F3	F3: GAACGTGTCGCGGAAGTC
	B3	B3: CGGCAATAGCGTCACCTT
	LF	LF (5'-3'): TCAAATCGGCATCAATACTCATCTG
	LB	LB (5'-3'):AAAGGGAAAGCCAGCTTTACG

F3: Forward inner primer; B3: Backward inner primer; FIP: Forward inner primer; BIP: Backward inner primer; LF: Loop forward primer; LB: Loop Backward primer

Tablo 3.3' de Yang vd. (2018), tarafından önerilen dış primerler ile PCR ve real-time PCR test sonuçlarının karşılaştırılması yapıldı.

Tablo 3.3. *S. Enteritidis* PCR, Q-RT PCR uygulamaları için kullanılan primerler (Yang vd., 2018)

Hedef / Referans	Primer	Sekans (5'-3')
<i>Salmonella</i> spp. Yang vd. (2018)	F3	F3 (5'-3'): GAACGTGTCGCGGAAGTC
	B3	B3 (5'-3'):CGGCAATAGCGTCACCTT

3.1.3. qRT-PCR Reaktifleri

qRT-PCR uygulamaları için iTaq universal SYBR[®]Green reaction mix (2x) (SİGMA, S9430-5ml) qRT-PCR karışımı kullanıldı.

3.1.4. Konvansiyonel PCR Bileşenleri

Konvansiyonel PCR karışımında, Taq DNA polymerase (5u/μl), MgCl₂ (25μM), 10X Taq (Mg-free) reaksiyon tamponu, dNTP (deoksinükleotid trifosfat) (2Mm), 100pmol Forward Primer, 100pmol Reverse Primer karışımı yer almaktadır (Tablo 3.3).

3.1.5. Jel Yükleme Tamponu

10X TBE Buffer (Tris-borat-EDTA) 1X kullanımlık hazırlanarak elektroforezde kullanıldı.

3.1.6. Agaroz Jel

PCR ürünlerinin belirlenmesi amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, 40ml 1X TBE içerisine 0.40g agaroz ilave edildi ve mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar eritildi. Daha sonra agaroz soğumaya bırakıldı, ılıdıktan sonra etidium bromide (0,5 µg/ml) ilave edildi. Elektroforez tankına yerleştirildi ve amplifiye ürünlerin elektroforezi amacıyla kullanıldı.

3.1.7. Örnek Yükleme Boyası (DNA gel Loading Dye)

PCR ürünlerinin, agaroz jele yüklenmesi amacıyla kullanıldı. Bu amaçla 6ul PCR ürünü 1 ul yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jeldeki ilgili kuyucuklara aktarıldı.

3.1.8. Belirteçler (DNA Ladder)

Oluşan ampikonların boyutlarını belirlemeye yönelik, Gene Ruler (100bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, SM0241) kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri Standart Suşlarının Canlandırılması

LAMP, PCR ve real time PCR testlerinde test tespit limitlerinin belirlenmesi amacıyla *S. Thyphimurium* ve *S. Enteritidis* referans suşlarının kanlı agara ekimleri yapıldı. Kanlı agarda üreyen suşların konfirmasyonu için MacConkey ve EMB agarda da değerlendirilmesi yapıldı. İnkubasyondan sonra *Salmonella* referans suşları fenotipik olarak incelendi. Kültürden yapılan Gram boyama ile bakterilerin mikroskopik morfolojileri incelendi ve saf olarak üreyen Gram negatif bakteri kültürlerinden McFarland standartlarına göre dilüsyonlar hazırlandı. Bakteri dilüsyonları, McFarland No:7 yoğunluğuna denk gelecek şekilde hazırlandı.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA eldesi için *Salmonella* kültürleri, kuru blok ısıtıcıda 100°C'de 10dk kaynatıldıktan sonra 10000 devirde 10dk santrifüj edildi. Süpernatant toplandı ve PCR, RT-PCR ve LAMP'te kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.3. Konvansiyonel PCR Optimizasyonu

Yang vd. (2018) tarafından tasarlanan primerler kullanılarak konvansiyonel PCR optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon sonrası *S. Enteritidis*'in saptanabilir limiti

belirlendi. Bununla birlikte testin spesifitesinin belirlenmesi amacıyla *Eschericia coli* (ATCC35218), *Yersinia pseudotuberculosis* (ATCC29833), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Klebsiella pneumonia* (NCTC13465), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) bakteri suşlarından DNA ekstraksiyonları hazırlandı.

3.2.3.1. Konvansiyonel PCR Uygulaması

PCR karışımı, 10X Taq buffer (1X), 2mM dNTPs (200 µM), 25mM MgCL₂ (1,5-2 mM), Forward ve Reverse primerler (20pmol), Taq DNA Polimeraz (1 ünite), distile su, kalıp DNA reaksiyon hacmi ve final konsantrasyonu Tablo 3.4’te belirtilen şekilde ilave hazırlandı. Hedef gen *invA* için Tablo 3.4’deki miktarlarda karışım hazırlandı ve PCR cihazına (Bio-rad/T100) yerleştirildi.

Tablo 3.4. Konvansiyonel PCR Bileşenleri ve Konsantrasyonları

PCR Bileşenleri	Reaksiyon hacmi	Final konsantrasyon
10X Standart Taq (Mg-free) reaksiyon buffer	2,5 µl	1X
25 µM MgCl ₂	2 µl	1,5-2 mM
2 mM dNTPs	2,5 µl	200 µM
100 pmol Forward (F) Primer	1 µl	20pmol
100 pmol Reverz (R) Primer	1 µl	20pmol
Taq DNA Polimeraz 5u/µl	0,5 µl	1 unite
Distile su	20 µl	
Kalıp DNA	3 µl	< 1µg

Hedef DNA’ların çoğaltılması amacıyla aşağıda belirtilen koşullarda test uygulandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Konvansiyonel PCR Protokolü

Adım	Süre	Sıcaklık	Açıklama
Başlangıç PCR aktivasyonu	95°C	10 dakika	Taq DNA polimeraz aktivasyonu
Döngü			
Denatürasyon	95°C	15 saniye	Toplam 35 döngü
Bağlanma	57°C	1 dakika 30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika 40 saniye	

3.2.3.2. PCR Ürünlerinin Analizi

Amplifiye ürünlerin analizi %1'lik agaroz jel elektroforeze uygulanarak incelendi. İlk olarak etidyum bromid ile boyanmış %1'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla 40ml 1X TBE içerisine 0,40gr agaroz ve 2µl etidyum bromür eklendi. Yatay elektroforez tankına kuyucukların oluşması için baş kısmında tarak olacak şekilde hazırlanan agaroz jel döküldü. Agaroz jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılarak jelin üzeri tamamen kaplanana kadar 1X TBE solüsyonu döküldü. Her bir örneğe ait PCR ürünü 1µl boya (6X Loading Dye; Thermo Scientific) ile boyandı. Her örnek 7 µl miktarında, 1 µl loading dye içerecek şekilde yüklenip elektroforezde 120 voltta 30 dakika süreyle yürütüldü. Bu işlem sonunda oluşan ampikonlar, UV-transilluminatör yardımıyla görüntülenerek fotoğraflandı.

3.2.4. Real Time (RT)-PCR Uygulaması

qRT-PCR ile hedef DNA'ların saptama limitleri belirlendi. Bu amaçla referans *Salmonella* Enteritidis serotipinin koloni sayımı ile KOB değeri hesaplanarak 10 katlı dilüsyonları hazırlandı. Elde edilen genomik DNA'lar kalıp DNA olarak kullanılarak qRT-PCR ile hedef genleri çoğaltıldı. qRT-PCR'da elde edilen son dilüsyondaki Threshold Cycle (Ct) değeri minimum KOB olarak tespit edildi.

3.2.5. LAMP Optimizasyon Denemeleri

3.2.5.1. Primer Seçimi ve Hazırlığı

Çalışmada primer tasarımı PrimerExplorer V5 programı kullanılarak gerçekleştirildi. İlk hedef olarak seçilen primerlerin *Salmonella*'yı tespit etmeye yönelik optimizasyonu planlandı. Aşağıda özetlenen işlemlerde açıklandığı üzere hedeflenen optimizasyon sonuçları elde edilemediğinden benzer işlemler Yang vd. (2018)'nin bildirdiği primerler (Tablo 3.2) referans alınarak değerlendirildi.

LAMP yönteminde mastermiks için kullanılan primer karışım oranları Tablo 3.6'da belirtildi. Primer konsantrasyonu toplam reaksiyon hacmi 25µl olacak şekilde optimize edildi. 25µl reaksiyon hacminde *S. Enteritidis* için son hacim 1.1µl olacak şekilde primer karışımı hazırlandı.

Tablo 3.6. LAMP Reaksiyonu İçin Primer Karışım Oranları

Primer	Hacim (µl)	Hazırlama
FIP	0.4	

BIP	0.4	Her primerden (100µmol/l) belirtilen hacimlerde alınıp LAMP reaksiyon başına primer karışım 1.1µl olacak şekilde optimizasyon yapılmıştır.
F3	0.05	
B3	0.05	
LoopF	0.1	
LoopB	0.1	
Toplam	1.1µl	

3.2.5.2 LAMP İçin Mastermiks Hazırlanması

LAMP testi için mastermiks hazırlanması işlemleri Parida vd. (2004; 2005) bildirdikleri yöntemler modifiye edilerek yapıldı. Bu amaçla;

- Testin sensitivitesinin tespiti
- Spesifitesinin tespiti
- Florometrik ve turbidimetrik yöntemlerin duyarlılıklarının belirlenmesi işlemleri gerçekleştirildi (Tomlinson and Boonham 2008; Parida et al., 2008).

Salmonella'nın cins düzeyinde tanımlanması amacıyla *invA* geni tercih edildi. LAMP testi için primer tasarımı <https://primerexplorer.jp/e/> web sayfasından PrimerExplorer V5 software'i kullanılarak gerçekleştirildi. Araştırmada her bir gen için 1 dış ve 1 iç olmak üzere 2 çift primer (forward ve reverse olarak), ve reaksiyonu hızlandırmak amacıyla loop primerler (LF/LB) NCBI genbankdaki nükleotid dizilimi temel alınarak tasarlandı. Bu primerlerden dış primer olarak adlandırılanlar, test duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla PCR ve real-time PCR testlerinden yararlandı. Tez çalışmasında kullanılan primerlerin tamamı PrimerExplorer V5'e göre online olarak belirlendi. LAMP test sonuçlarının konvansiyonel PCR ve real time PCR yöntemleriyle karşılaştırması yapıldı. LAMP analizi sonucunda elde edilen ürünlerin belirlenmesi amacıyla elektroforez ve florometrik olarak SYBR Green I boyası kullanıldı.

LAMP reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları Tablo 3.7'de gösterildi.

Tablo 3.7. LAMP protokolü, bileşenler ve konsantrasyonları

Bileşen	Hacim (25µl/Reaksiyon)
1X DNA Buffer	2.5µl
100mM MgSO ₄	1.5µl (6µM)
10mM dNTPs	3.5µl (1.4µM)

Primer mix	2.5µl(1.6µM FIP/BIP,0.2µM F3/B3,0.4µM LF/LB)
Betain (5M)	5 µl (0.5M)
Bst DNA polimeraz (8,000 U/ml)	1µl
Template DNA	5µl
Distile su	Distile su ile 25µl'ye tamamlanmıştır



3. BULGULAR

4.1. Genomik DNA Konsantrasyon Tayini

Testlerin spesifitelerinin belirlenmesi amacıyla referans suşlara ait DNA konsantrasyonu nanodrop spektrofotometrede ng/µl olarak aşağıda belirtilen miktarlarda hesaplandı. Buna göre, *Eschericia coli* (ATCC35218) için 5.7, *Yersinia pseudotuberculosis* (ATCC29833) 9.6, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) 0.8, *Klebsiella pneumonia* (NCTC13465) 1.2, *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) 0.3 ve *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) 35.3 olarak belirlendi. PCR, real-time PCR ve LAMP test duyarlılığının belirlenmesi amacıyla *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* referans serotiplerinin kob değerleri sırasıyla 3.66×10^{10} ve 5.37×10^{10} olarak belirlenerek tespit limitleri belirlendi.

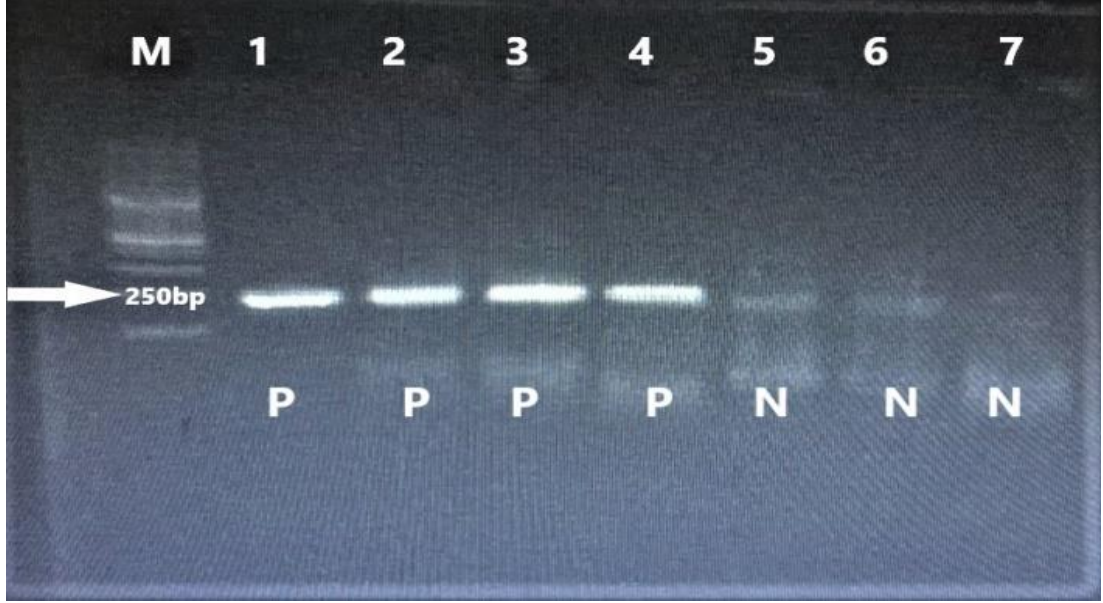
4.2. Referans *Salmonella invA* Geninin Konvansiyonel PCR ile Saptanması

Salmonella referans suşları (*S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*) ile klinik *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* suşlarının PCR test duyarlılığı %100 olarak belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *invA* geninin amplifikasyonunu hedefleyen PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 100-1200bp. 1: No DNA 2: Staph.aureus (ATCC29213) 3: *S. Typhimurium* (NCTC74) 5.37×10^{10} 4: *S. Enteritidis* (NC4444) 3.66×10^{10} 5: *S. Pullorum*, 6: *S. Gallinarum*

Konvansiyonel PCR testinde Salmonellanın tespit limiti, *S. Enteritidis*'in 3.66×10^{10} kob/ml kültüründen 10 katlı dilüsyonlar yapılarak Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 3.66×10^4 olarak tespit edildi. Bu değer, *S. Typhimurium* için de 5.37×10^4 olarak belirlendi.



Şekil 4.2. *S. Enteritidis* identifikasyonunda Konvansiyonel PCR testinin duyarlılığının belirlenmesi (cfu/ml) M: marker 1: *S. Enteritidis* 3.66×10^7 2: *S. Enteritidis* 3.66×10^6 3: *S. Enteritidis* 3.66×10^5 4: *S. Enteritidis* 3.66×10^4 5: *S. Enteritidis* 3.66×10^3 6: *S. Enteritidis* 3.66×10^2 7: *S. Enteritidis* 3.66×10^1

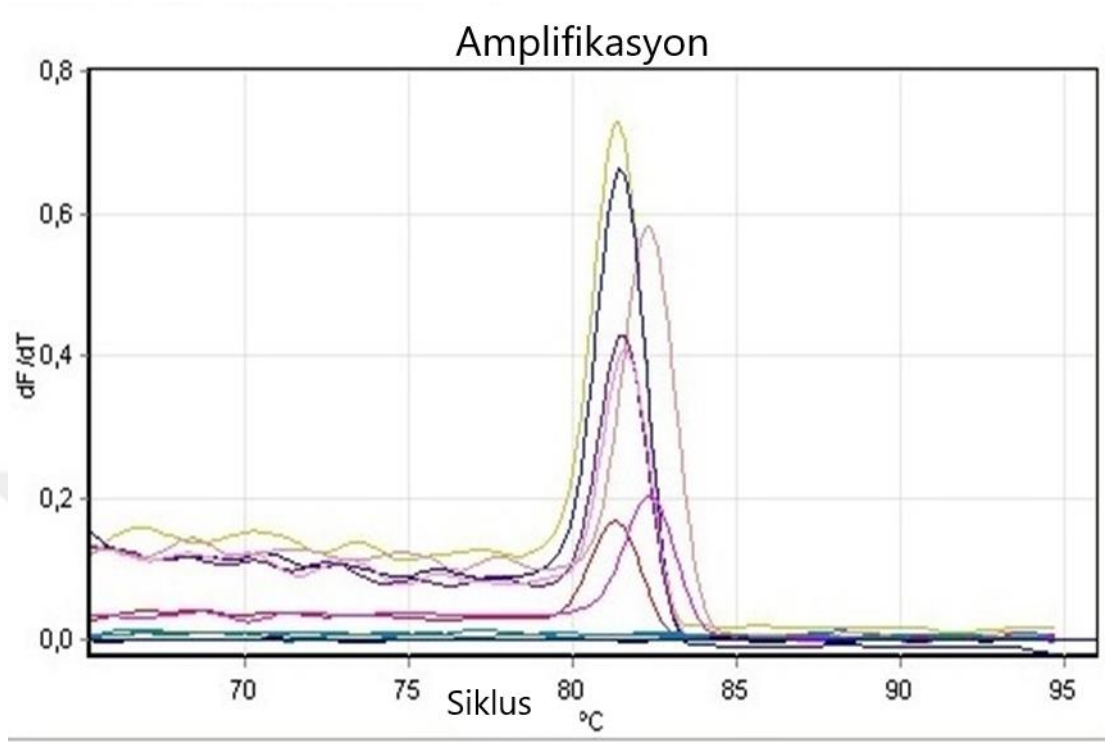
4.3. Real Time (RT)-PCR İle Duyarlılığın Belirlenmesi

Referans suşların (*S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*) koloni sayısı temelinde real-time PCR ile test optimizasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla referans *S. Enteritidis* serotipinin koloni sayım yöntemi ile koloni sayısı 3.66×10^{10} kob/ml olarak belirlendi. 10 katlı dilüsyonları hazırlanan kültürlerden DNA'lar hazırlanarak kalıp DNA olarak qRT-PCR ile hedef genleri çoğaltıldı. Tablo 4.1 de gösterilen qRT-PCR'da belirlenen 3.66×10^3 bakteri konsantrasyonu testin tespit limiti olarak hesaplandı.

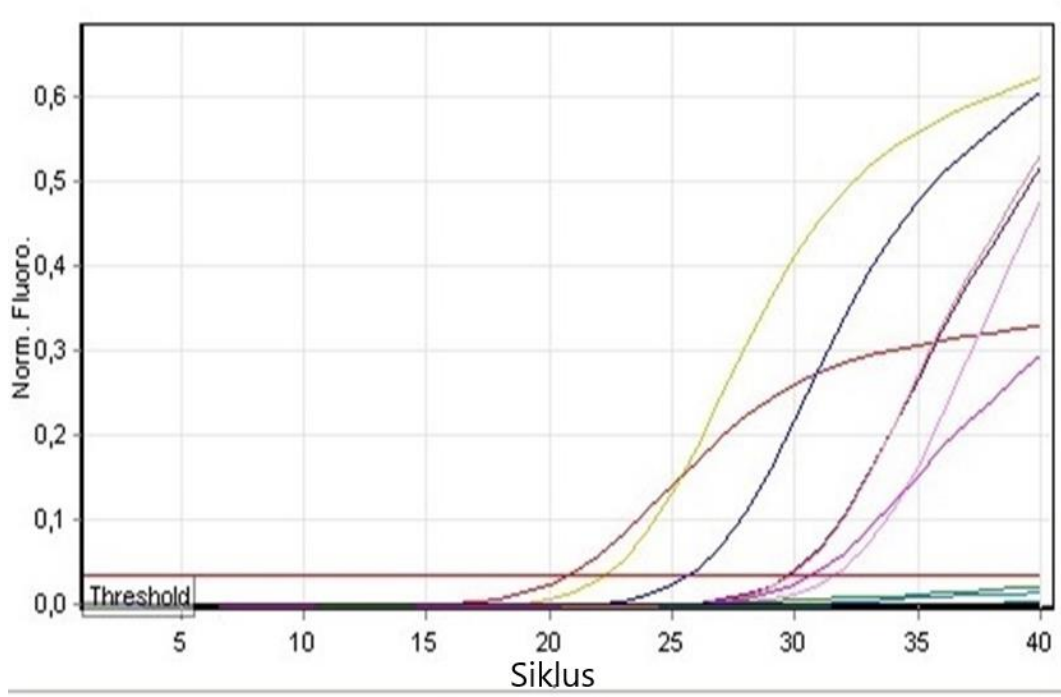
Tablo 4.1. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. Enteritidis* referans suşunun 10 katlı alt dilüsyonlarına göre DNA konsantrasyonları ve *invA* genine göre SYBR Green CT değerleri

Dilüsyonlar	cfu	SyberGreen CT
<i>S. Enteritidis</i>		
1	3.66×10^{10}	20,73
10^{-1}	3.66×10^9	20,26
10^{-2}	3.66×10^8	25,65
10^{-3}	3.66×10^7	29,75
10^{-4}	3.66×10^6	31,63
10^{-5}	3.66×10^5	30,56
10^{-6}	3.66×10^4	30,25
10^{-7}	3.66×10^3	29,86
10^{-8}	3.66×10^2	N/A
10^{-9}	3.66×10^1	N/A

Testin spesifikliğini belirlemek amacıyla erime eğrisi (melting curve) analizi ile CT değerlendirmesi yapıldı ve sonuçlar grafikte ifade edildi.



Şekil 4.3. *Salmonella* primerlerinin erime ısı düzeylerinin tespiti

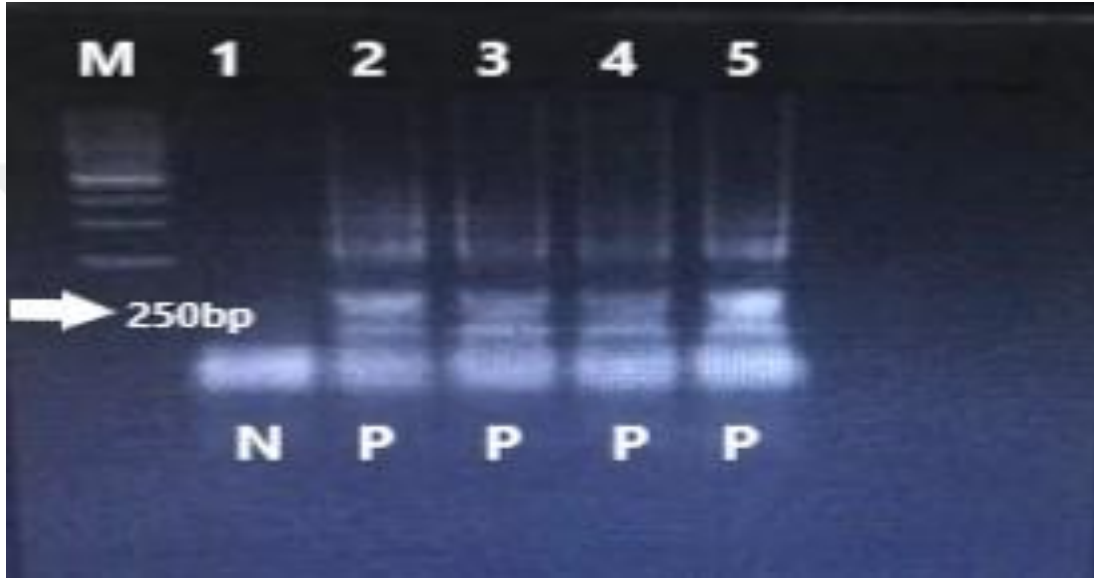


Şekil 4.4. *Salmonella* CT değerlerinin belirlenmesi

4.4. *Salmonella* Enteritidis *invA* Geni LAMP Optimizasyonu

S. Enteritidis *invA* genine dayalı LAMP optimizasyonu için Yang vd. (2018)'nin kullandığı primerler ile optimizasyonlar yapıldı.

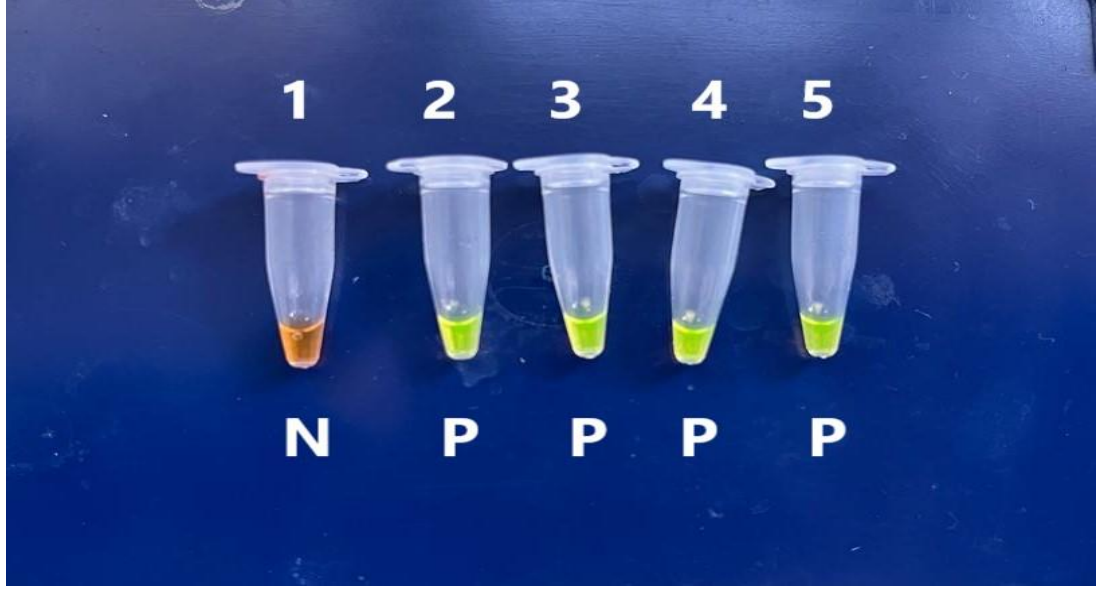
S. Enteritidis'in *invA* genine dayalı LAMP optimizasyonu için hazırlanan mastermikslere thermalcycler'da, 65°C'de 60dk boyunca amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Son olarak reaksiyonun durdurulması için 80°C'de 2dk bekletildi. Sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. LAMP testinin *S. Enteritidis* identifikasyonu için duyarlılığının belirlenmesi M: marker 1: No DNA 2: *S. Typhimurium* (NCTC74) 3: *S. Enteritidis* (NC4444) 4: *S. Gallinarum* 5: *S. Pullorum*

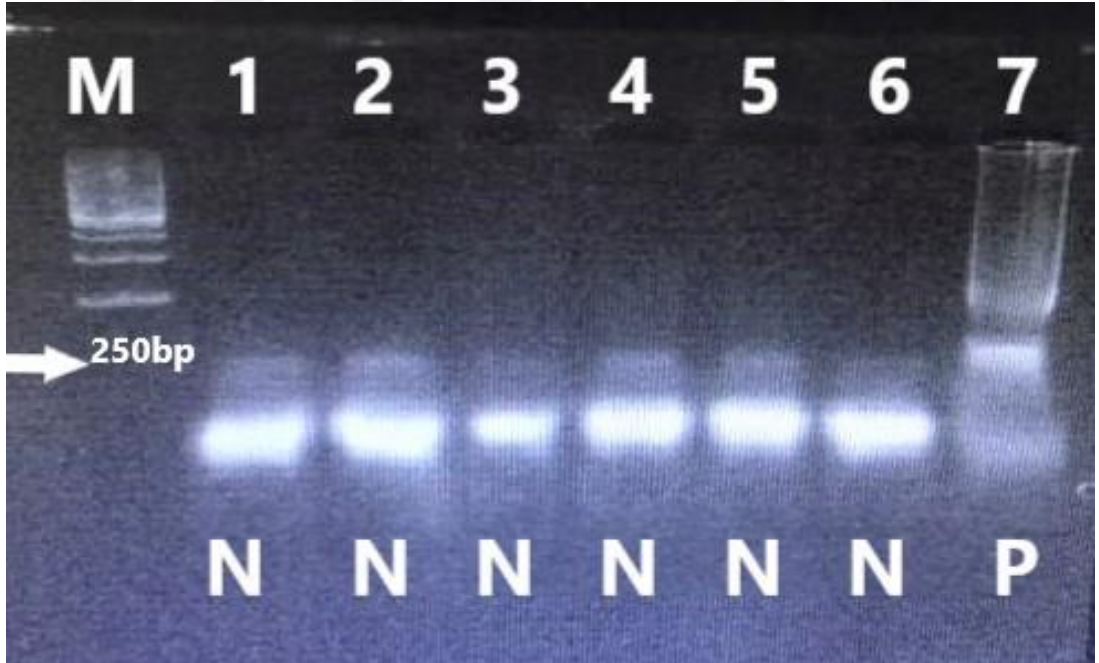
Optimizasyon işleminde, daha önceki optimizasyon çalışmalarında yaşanan aksaklıklar nedeniyle enzim değişikliği dikkate alınarak başlandı. Daha sonra mastermikse 1M ilave edilen betain'in konsantrasyonu 0.5M'a indirildi. Son olarak da Template DNA miktarı 2µl'den 5µl'ye çıkarıldı. Sonuç olarak Şekil 4.5'te görüldüğü gibi istenilen spesifite sağlanmış oldu.

Mastermikslere amplifikasyon işleminden sonra %0.1 oranında sulandırılan SYBR Green I ile muamele edilerek Şekil 4.6'daki sonuçlar elde edildi. SYBR Green I ile ışığa rengi boyanın orijinal rengi olan turuncu renkte kalırsa sonuç negatif olarak değerlendirildi. Amplifikasyon sonucunda SYBR Green I boyası floresan yeşil ışık verdiğinde ise sonuç pozitif olarak yorumlandı.

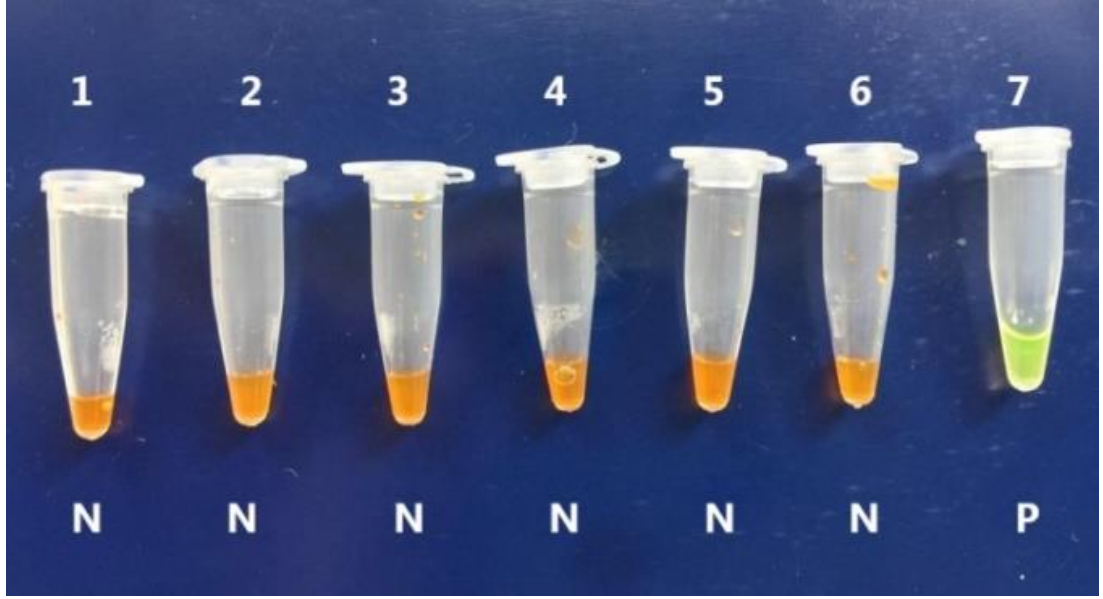


Şekil 4.6. LAMP testinin *S. Enteritidis* identifikasyonu için duyarlılığının SYBR Green I ile belirlenmesi. 1: No DNA 2: *S. Typhimurium* (NCTC74) 3: *S. Enteritidis* (NC4444) 4: *S. Gallinarum* 5: *S. Pullorum*

LAMP testinin özgüllüğünü belirlemek amacıyla 5 farklı mikroorganizma (*Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.

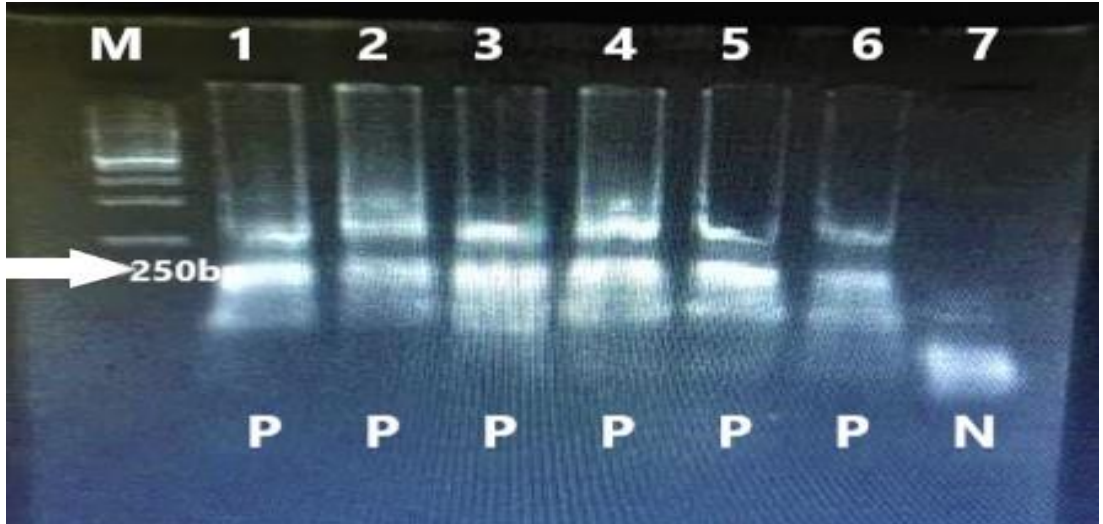


Şekil 4.7. LAMP testinin *S. Enteritidis* identifikasyonu için özgüllüğünün belirlenmesi. M: marker 1: No DNA 2: *Escherichia coli* (ATCC35218) 3: *Yersinia pseudotuberculosis* (ATCC29833) 4: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) 5: *Klebsiella pneumoniae* (NCTC13465) 6: *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) 7: *Salmonella Enteritidis* (NC4444)

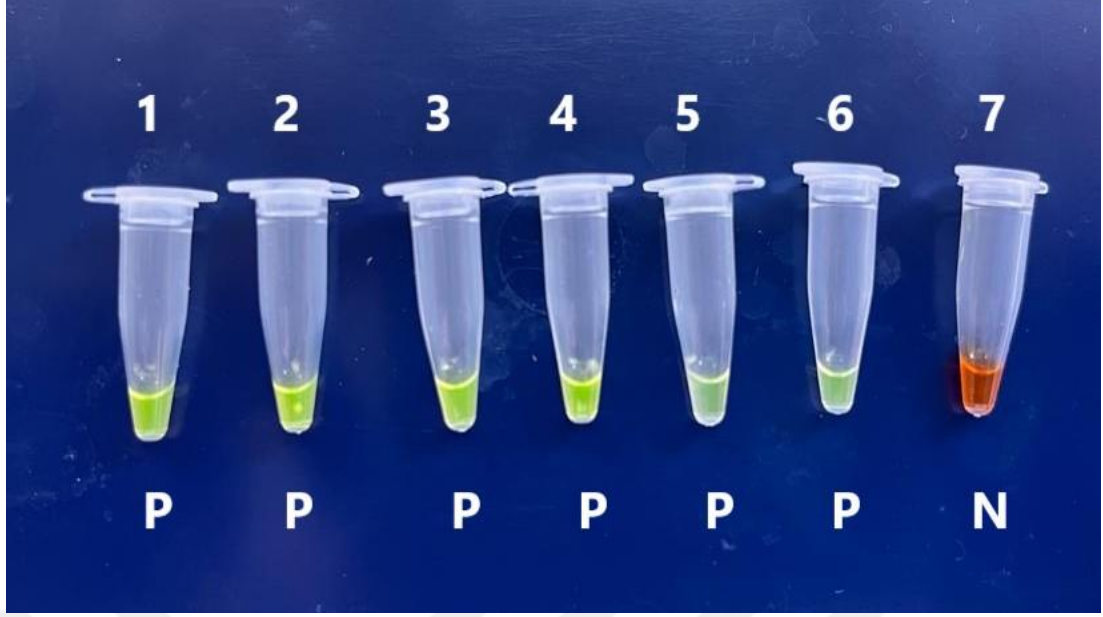


Şekil 4.8. LAMP testinin *S. Enteritidis* identifikasyonu için özgülüğünün SYBR Green I ile belirlenmesi. 1: No DNA 2: *Escherichia coli* (ATCC35218) 3: *Yersinia pseudotuberculosis* (ATCC29833) 4: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) 5: *Klebsiella pneumonia* (NCTC13465) 6: *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) 7: *Salmonella Enteritidis* (NC4444)

LAMP testinin duyarlılığını tespit etmek amacıyla *S. Enteritidis* suşları 1/10 alt dilüsyonları yapılarak değerlendirilmeye alındı. *S. Enteritidis*'in klasik kültürel metotla elde edilmiş suşunun koloni oluşturan birim, (coloni forming unit, cfu) sayısı 3.66×10^{10} olarak hesaplanmıştır. Yapılan alt dilüsyonlar sonucunda LAMP testinin duyarlılığı 3.66×10^2 olarak tespit edildi. Sonuçlar Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *S. Enteritidis*'in LAMP testi ile 1/10 alt dilüsyonu yapılarak duyarlılığının belirlenmesi (cfu/ml) M: marker 1: *S. Enteritidis* 3.66×10^7 2: *S. Enteritidis* 3.66×10^6 3: *S. Enteritidis* 3.66×10^5 4: *S. Enteritidis* 3.66×10^4 5: *S. Enteritidis* 3.66×10^3 6: *S. Enteritidis* 3.66×10^2 7: *S. Enteritidis* 3.66×10^1



Şekil 4.10. *S. Enteritidis* LAMP testi sonucunun 1/10 alt dilüsyonu yapılarak SYBR Green I ile duyarlılığının belirlenmesi. 1: *S. Enteritidis* 3.66×10^7 2: *S. Enteritidis* 3.66×10^6 3: *S. Enteritidis* 3.66×10^5 4: *S. Enteritidis* 3.66×10^4 5: *S. Enteritidis* 3.66×10^3 6: *S. Enteritidis* 3.66×10^2 7: *S. Enteritidis* 3.66×10^1

5. TARTIŞMA

Salmonellozis bilindiği üzere kanatlılar, yabancı ve memeli hayvanlar, sürüngenler, soğuk-kanlı hayvanları içeren birçok hayvan türünde intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olan zoonotik bir enfeksiyondur. Enfeksiyonun direkt teşhisi amacıyla altın standart yöntem olan kültür ile birlikte veya bağımsız olarak PCR, RT-PCR, PCR-ELISA gibi moleküler yöntemler teşhisin doğruluğunu artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak son 15 yılda LAMP ve uygulamaları hızlı ve ekipman gerektirmeyen yöntemler olması sebebiyle tercih edilmektedir. LAMP, sabit sıcaklıkta (izotermal reaksiyon), iplikçik yer değiştirme polimeraz enzimi yardımıyla, 4-6 farklı primerin kullanılmasından oluşan PCR'ye alternatif yenilikçi bir gen amplifikasyon tekniğidir (Montrasio, 2016). Salmonellozisin teşhisi amacıyla LAMP ilk kez Notomi vd. (2000), tarafından kullanılmış ve müteakip dönemlerde qLAMP, RT-LAMP, multipleks LAMP gibi farklı uygulamaları ile mikroorganizmaların tespiti amacıyla çeşitli alanlarda birçok çalışmalar yapılmıştır. LAMP amplifikasyonu, hedef DNA üzerindeki iç primerlerin (FIP ve BIP) bağlanması ve uzatılması ile başlar; yeni sentezlenmiş iplikçik daha sonra dış primerlerin (F3 ve B3) bağlanması ve uzatılması ile yer değiştirir. Yer değiştiren ürün, LAMP amplifikasyonu için başlangıç yapısını temsil eden dambıl adı verilen bir "kök-ilmek yapısı" oluşturur. Döngü Primerleri (LF ve LB) olarak adlandırılan iki ilave primer ile DNA sentezi için artan sayıda başlangıç noktası oluşur, böylece amplifikasyonun verimi artar. LAMP'in yaygın olarak kullanılan uygulaması, toplam altı primer gerektirdiğinden (her biri iki primer bağlama bölgesini kapsayan FIP ve BIP primerleri ile), LAMP yöntemi için primer tasarımı, bir hedef nükleik asit dizisinin sekiz farklı bölgesinin seçimini gerektirir. Ayrıca, üç farklı sıcaklıktaki tekrarlanan döngülerle meydana gelen PCR'ın aksine, LAMP yönteminin sabit bir sıcaklıkta gerçekleştiği de dikkate alınmalıdır. Bu özellik, primer tasarımı aşamasında daha fazla karmaşıklık meydana getirmektedir. Primerlerin erime sıcaklıkları (T_m), hedef üzerindeki çok sayıda primerin uygun reaksiyon sıcaklığında senkronize bağlanmasını teşvik etmek için doğru bir şekilde seçilmelidir. Tüm bu nedenlerden dolayı, primer tasarım aşamasının bir LAMP yöntemi geliştirmede çok önemli bir adım olduğu ve doğru bir primer tasarım yazılımı uygulamasının kullanılmasının son derece önemli olduğu sonucuna varılmaktadır. LAMP geliştirmekte olan bir amplifikasyon tekniği olduğundan, LAMP primer tasarım

sistemleri oldukça sınırlıdır (Aryan et al., 2009; Montrasio, 2016). LAMP yönteminde konvansiyonel PCR'da olduğu gibi çok sayıda geni içeren uygulamalar çok sınırlıdır. En fazla 2 geni içeren uygulamalar mevcuttur. Bu sebeple çok farklı ajanları veya farklı genleri aynı anda tanımlamak mümkün olamamaktadır. Ancak endemik veya epidemik seyirli olguların saha koşullarında izlenmesi, kanatlı işletmelerinde veya çiftliklerde takibin gerekli olduğu durumlar için önerilebilmesi, kullanımını kısıtlı çevreler için ön plana çıkarır. Salmonellozis teşhisi amacıyla gerek konvansiyonel PCR uygulamalarında gerekse LAMP uygulamalarında patojen suşların belirlenmesi amacıyla en çok invazini kodlayan *invA* geni (Wang and ark. 2008;2022; Wang and Wang 2013; Kreitlow et al., 2021; Ou et al., 2021), ender olarak da *bcfD*, *phoP*, *siiA*, *hilA*, *62181533* ve *ttrRSB* genleri (Mei et al., 2019; Kreitlow et al., 2021) tercih edilmiştir.

Bu çalışmada *invA* geni baz alınarak çalışmalar yürütülmüştür. Testin, tespit limitinin bakteri konsantrasyonuna göre >2.2-4.8-6.0 cfu/ml, DNA konsantrasyonuna göre 13.5fg-1pg-1.4pg/ul olduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir (Hara Kudo et al., 2005; Mei et al., 2019; Ou et al., 2021; Tang et al., 2012; Wang et al., 2008). Bu çalışmada testin saptanabilir limiti 10^2 cfu/ml olarak belirlenmiştir. Şekil 4.8'de bu birimin *S. Enteritidis* için 3.66×10^2 kob/ml olduğu gösterilmektedir. Bu sonuçlar tespit limitinin diğer çalışmalara benzer hatta daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Konvansiyonel PCR ve Real time PCR karşılaştırmalarında sırasıyla 3.66×10^4 cfu/ml, 3.66×10^3 cfu/ml ile tespit yapıldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar LAMP'in diğer yöntemlerden daha hassas olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar hem konvansiyonel hem de qRT-PCR çalışmalarında elde edilmiştir. Ancak tespit limitleri saha koşullarında değişiklik arz edebilmektedir (Kreitlow et al., 2021; Ou et al., 2021; Tang et al., 2012; Wang et al., 2022; Yüksel, 2018).

Örneğin Tang vd. (2012), *Salmonella spp.*'yi tespit etmek için enfekte olduğundan şüphelenilen ördeklerde, LAMP yöntemini değerlendirdikleri bir çalışmada, saf kültür koşullarında, 0,01 g ördek karaciğeri veya dalak varlığında sırasıyla 6.0 cfu/test ve 4.8 cfu/test *S. Enteritidis* ve *S. Anatis*'i saptayabildiklerini bildirmişlerdir. Yine klinik örneklerin tespiti amacıyla toplam 115 Salmonella şüpheli örnek, geleneksel kültür yöntemi, LAMP ve PCR ile analiz edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, LAMP ve kültür yöntemleri ile 11 örneğin, konvansiyonel PCR ile sadece 8 örneğin pozitif olduğu gösterilmiştir. Klinik örneklerdeki yüksek

duyarlılık ve hızlı tarama hızı göz önüne alındığında, LAMP yönteminin saha uygulamaları ve epidemiyolojik araştırmalar yönünden daha uygun olduğu belirtilmiştir.

Mei vd. (2019), LAMP testinin saptama limitini 13,5 fg/ μ l ve 6,7 cfu/mL olarak tespit etmişler ve bunun geleneksel PCR'dan 1000 kat ve gerçek zamanlı PCR'dan ise 100 kat daha hassas olduğu kanısına varmışlardır. Mei vd. (2019)'nin sonuçları tespit edilebilir koloni sayısının bizim elde ettiğimiz sonuçlardan daha az duyarlı ve konvansiyonel PCR ve RT-PCR sonuçları ile 10 kat bir uyumsuzluğu göstermektedir. Bu durum araştırcıların saha ve klinik örnekler ile ilgili çalışmalarından kaynaklanabilir. Benzer olarak yapılan bir çalışmada, Wang ve Wang (2013), gıda kaynaklı olgularda *Salmonella* tespiti için LAMP yönteminin performansını değerlendirmişler ve konvansiyonel PCR'dan 10 kat daha duyarlı sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Testin spesifitesi, *Salmonella* içeren materyalin *Salmonella* ile aynı ailya içerisinde yer alan ve benzer ortamlarda bulunan mikroorganizmaların diğer *Salmonella* suşları veya serotipleri ile kontamine edildiği durumlarda test sonuçlarının ölçümü ile belirlenebilmektedir. LAMP sonuçları testin spesifitesinin konvansiyonel PCR ile benzer olduğunu göstermiştir. Hara-Kudo vd. (2005), 39 *Salmonella* serotipini (32' *Salmonella* supsp. *enterica*, 7 *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*) ve 62 *Salmonella* olmayan bakteri suşunu değerlendirdikleri bir çalışmada, testin duyarlılığının klasik PCR testinden daha yüksek (>2.2 cfu/test tüpü), özgülüğünün ise klasik PCR yöntemiyle benzer olduğunu belirlemişlerdir.

Kreitlow vd. (2021), LAMP tekniği ile identifikasyon için *Salmonella*'ya özđu altı hedef diziyi (*invA*, *bcfD*, *phoP*, *siiA*, *62181533* genleri ve *ttrRSBCA* lokusu içinde bir bölge) kullanmışlardır. Tek nükleotid polimorfizmini içeren primerler, dejenere primerler olarak tespit edilmiş ve tasarlanan primer setlerinin özgülüğü, 46 *Salmonella* ve 32 gıda ve su kaynaklı bakteri referans suşları ile belirlenmiştir. *ttrRSBCA* lokusunu hedefleyen primerler ile bu testin %100 duyarlı bulunduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar primer seçiminin testin spesifikliğini belirlemede önemli olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada 4 adet referans *Salmonella* suşu ve krosreaksiyon potansiyeli yüksek *E.coli*, *Y.pseudotuberculosis*, *P. aeruginosa*, *K.pneumonia* ve *E.faecalis* referans bakteri suşları LAMP testinin spesifitesinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. İncelenen suşların tamamının LAMP testi ile

negatif sonuç verdiği hem elektroforez (Şekil 4.7) hem de SYBR Green 1 boyası uygulanarak (Şekil 4.8) gösterildi. Araştırmada sensitivite ve spesifite mastermiks bileşimine ilaveler yapılarak %100 olarak belirlendi.

Bu çalışmada primer seçimi PrimerExplorer V5 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Ancak optimizasyon işlemlerinde başarılı sonuç elde edilemedi. Bunun üzerine FIP ve BIP primerleri poli T linker ile birleştirilerek çalışmalar sürdürüldü. Ancak yine beklenen performansda amplikon (ürün) elde edilememesi üzerine Yang vd. (2018), tarafından bildirilen primerler temin edilerek çalışmalara devam edildi. Mastermiks bileşimi Tablo 3.7’de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanarak test optimizasyonları gerçekleştirildi. Optimizasyon işlemiyle ilgili olarak Tablo 3.7’deki oranlara erişim için çok sayıda parametre değişikliği gerçekleştirildi. Bu işlemlerden bazıları, primer değişikliği, FIP ve BIP primerlerine poli T linker ilavesi, primer konsantrasyonlarının tespiti, spesifiteyi artırmak amacıyla betain konsantrasyonunun ayarlanması, template DNA miktarının ayarlanması ve reaksiyon ısı ve süresinin ayarlanmasıdır. Mastermikslere amplifikasyon işleminden sonra ürün, %0.1 oranında SYBR Green I ile muamele edilerek Şekil 4.6’daki sonuçlar elde edildi. LAMP test sonuçları, elektroforez ve görsel olarak değerlendirildi. SYBR Green I ile ışımaya rengi boyanın orijinal rengi olan turuncu renkte olduğunda reaksiyon negatif, floresan yeşil ışık verdiğinde ise reaksiyon pozitif olarak yorumlandı (Şekil 4.6). *S. Enteritidis*’in *invA* genine dayalı LAMP optimizasyonu için hazırlanan mastermikslere thermalcycler’da, 65°C’de 60dk boyunca amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Son olarak reaksiyonun durdurulması için 80°C’de 2dk bekletildi. Test prensip olarak kolay görünmekle birlikte LAMP optimizasyonu için; primer seçimi, konsantrasyonu, reaksiyon bileşenleri, reaksiyon ısı ve süresi, tespit yöntemi gibi çok sayıda kritik parametre bulunmaktadır. Bu sebeple testde kullanılacak parametre sayısını azaltmaya yönelik mastermiks solüsyonlarının tercih edilmesi, farklı enzimlerin tercihi, en az 3 çift primer tercihi olası olumsuzlukları minimuma indirmede yardımcı olacaktır. Primer seçimi ile ilgili çok sınırlı software mevcut olup bunlar arasında WinEpiscope 5.0 en yaygın kullanılanıdır. Bu program ile National Center For Biotechnology Information (NCBI)’dan seçilen gen dizisi *txt* formatında WinEpiscope programına yüklenerek çok sayıda primer seçeneği oluşturulmaktadır. Primer seçiminde belirtilen kriterlere göre en uygun (ΔG) değerine sahip primerler seçilmektedir. Ancak burada da alternatifler mevcut olup en uygun olanlardan en az 3 adedinin seçilmesi test

geliştiriciler tarafından önerilmektedir. Bizim ilk uygulamada başarı elde edemememizin nedeninin programdan sadece bir çift primer seçimimizle ilgili olduğu anlaşıldı. Nitekim, Yang vd. (2018)'nin önerdiği primerin WinEpiscope.5 programında sunulan alternatiflerden olması bizi bu değerlendirmeye yöneltti. Brusella ve Leptospira çalışmalarında yeterli amplikon elde edilememesinin nedeni olarak; yeterli sayıda primer tercihinin ve testinin yapılmaması ve primerlerin (FIP-BIP) HPLC saflaştırılmasındaki yetersizlik sonucu olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada optimal ısı ve süre 65°C de 60 dakika olarak tespit edildi. Bu sonuçlar Mei vd. (2019) ile Zhang vd. (2019)'nin yaptıkları çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Diğer araştırmacıların bazıları da 60-65°C arasında benzer sürelerde 60 dakikaya kadar sürelerde bazıları da 30 dakika içerisinde LAMP testini optimize ettiklerini bildirmişlerdir. Bu testlerin kısa sürede tamamlanmasındaki en önemli özellik 2 çift primere ilave olarak 3'üncü çift primer olarak loop primerlerin kullanımınıdır. Bu faktörlere ilave olarak primer seçimi ve araştırmacıların DNA ekstraksiyon yöntemleri, süre ve ısı tercihi gibi birçok parametre testin spesifitesinde önemli rol oynamaktadır.

Mei vd. (2019), yaptıkları çalışmada, *Salmonella hila* geninin saptanması için döngü aracılı izotermal amplifikasyonu yanal akış ölçüm çubuğu (LAMP-LFD) ile birleştiren hızlı ve verimli bir yöntem geliştirmişlerdir. LAMP-LAFD yöntemini, PCR ve gerçek zamanlı PCR yöntemleriyle karşılaştırdıklarında, LAMP-LFD testi ile aynı özgüllüğe ancak daha yüksek duyarlılığa sahip olduğuna kanaat getirmişlerdir. LAMP yöntemi ile 65°C'de yalnızca 40 dakikada reaksiyon gerçekleşmiş ve 52 *Salmonella* suşunun tümü, LAMP-LFD testi ile pozitif sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak, *hila* genini hedefleyen geliştirilmiş LAMP-LFD yönteminin hızlı, spesifik, hassas olduğunu ve *Salmonella* tespiti için işlem kolaylığı sağladığını göstererek, bu yöntemin geleneksel test yöntemlerine alternatif olarak kullanılma potansiyeli olduğunu ve uygulanabileceğini göstermişlerdir.

Wang ve Wang (2013), yaptıkları çalışmada gıda kaynaklı patojen *Salmonella*'yı saptayabilen LAMP yönteminin performansını değerlendirmişlerdir. Üç çift primer, hedef *invA* genindeki sekiz farklı diziyi tanımak için özel olarak tasarlanmıştır. *Salmonella*'nın amplifikasyonu için zaman ve sıcaklık koşullarını, 61°C'de 40 dakika olacak şekilde optimize etmişler ve tespit limitini LAMP

yönteminde 142cfu/ml olarak tespit ederken, konvansiyonel PCR testinde ise 10^3 cfu/ml olarak belirlemişlerdir.

Ou vd. (2021), yaptıkları çalışmada, LAMP teknolojisine dayalı olarak *Salmonella* için hızlı bir tespit yöntemi oluşturmayı amaçlamışlardır. Primerleri, *Salmonella*'nın spesifik *invA* geni için tasarlayarak, primer tarama ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu yoluyla ve gerçek zamanlı floresan ve görsel gözlem sonuçlarıyla *Salmonella*'yı saptamak için bir LAMP yöntemi oluşturmuşlardır. Yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü değerlendirmek amacıyla kontamine ve kontamine olmayan klinik numuneleri test etmişlerdir. LAMP'in optimal reaksiyon sıcaklığı $60-65^{\circ}\text{C}$ ve optimal reaksiyon süresi 25-30 dakika olacak şekilde uygulamışlar ve sonuç olarak gerçek zamanlı floresan ve görsel gözlem ile $1,4 \text{ pg}/\mu\text{L}$ olduğunu belirlemişlerdir. *Salmonella* olmayan 22 türle çapraz reaksiyon gözlemlenmediğine ve testin özgüllüğünün %100 olduğuna kanaat getirmişlerdir. Ek olarak, *Salmonella* ile kontamine olmuş 30 numune, *Salmonella* ile kontamine olmayan 30 numune/bakteri kültürü ve mikrobiyal kütle spektrometrisi ile pozitif olarak tanımlanan 8 klinik numune test edilmiştir. Yöntemin pozitiflik oranı gerçek zamanlı floresan ile %97.4 ve görsel gözlem ile %89,5, negatiflik oranı %100 ve toplam oranları %98.5 ve %94.1 olarak belirlenmiştir.

Wang vd. (2022), gıdalarda *Salmonella*'nın hızlı tespiti amacıyla LAMP yöntemini geliştirmiş ve *Salmonella*'nın *invA* genini hedefleyen primerler tasarlamışlardır. Standart rekombinant *invA*-plazmit numuneleri ve 100 adet et numunesini LAMP ile test etmişler ve sırasıyla konvansiyonel PCR ve rutin (Çin Ulusal Gıda Güvenliği Standardı-Gıdaların Mikrobiyolojik İncelemesi) *Salmonella* incelemesi ile test edilen örnekleri karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak sekiz farklı serotipe ait *Salmonella* suşlarının, geliştirilen LAMP testi ile başarılı bir şekilde amplifiye edildiğini ve bu yöntemin standart *invA*-plazmit numunesinin μL 'si başına 8×10^2 kopya analitik hassasiyetle geleneksel PCR'dan 1000 kat daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Sonuçları, LAMP reaksiyon tüpüne kalsein ve MnCl_2 ekleyerek doğrudan görselleştirmişler ve pozitif olarak amplifiye edilen ürünlerin 2 dakikalık bir inkübasyondan sonra yeşile döndüğünü gözlemlemişlerdir. Paralel saptamada, LAMP testi ile pozitif *Salmonella* oranının, rutin Çin ulusal standart tanı yöntemiyle yüksek oranda benzer olduğuna kanaat getirmişlerdir. Geliştirilen LAMP

testinin *Salmonella*'nın tespiti için basit, hızlı, güçlü bir şekilde spesifik, oldukça hassas ve görsel bir tespit yöntemi olduğunu göstermişlerdir.

Abdullah vd. (2014), Malezya'da *S. Typhi* izolatlarının varlığını saptamak, testin duyarlılık ve özgüllüğünü belirlemek amacıyla LAMP yöntemini değerlendirmişlerdir. *S. Typhi* genlerinin şaperon *PapD STBHUCCB_38510* lokusuna dayalı olarak iki dış ve 4 içten oluşan üç primer seti tasarlamışlardır. Reaksiyon, şablon olarak *S. Typhi ATCC7251*'in genomik DNA'sı kullanılarak optimize edilmiş ve ürünler, reaksiyonun renk değişiklikleri ile doğrudan görselleştirilmiştir. Pozitif sonuçlar yeşil fluoresansla ve negatif sonuçlar turuncu renkle gösterilmiştir. Test, özgüllük, duyarlılık ve saha örneklerinde uygulama açısından ayrıca değerlendirilmiş ve sonuçlar, altın standart kültür yöntemi ve PCR ile elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. LAMP'in optimize edilmiş konvasiyonel PCR'a kıyasla *S. Typhi*'yi saptamada oldukça spesifik ve 10 kat daha hassas bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir.

Wang vd. (2008), gıda kaynaklı patojen *Salmonella*'nın *invA* geninin hızlı tespiti için döngü aracı izotermal amplifikasyon (LAMP) yönteminin özgüllüğünü ve duyarlılığını değerlendirmişler ve bu tespit sistemi ile 241bp'lik hedef DNA'yı amplifiye ederek, 65°C'de izotermal koşullar altında 60 dakika içinde agaroz jel üzerinde merdiven benzeri bantları görselleştirmişlerdir. LAMP testinin saptama limitinin reaksiyon hacminde 100fg DNA/tüp, klasik konvasiyonel PCR yönteminde ise 1pg/tüp olduğu tespit edilmiştir. Testin hassasiyeti göz önüne alındığında, 1pg *Salmonella* hedef DNA'sı için, LAMP reaksiyonunda 100ng *Salmonella* olmayan genomik DNA'nın mevcudiyetinin amplifikasyon verimliliğini olumsuz yönde etkilemediği belirtilmiştir. Ayrıca LAMP yönteminde izotermal koşulların gerçekleştirilebilmesi için su banyosu veya ısıtıcı bloğun yeterli olduğu ve testin özellikle hızlılığı, basitliği ve düşük maliyeti nedeniyle laboratuvar ortamında kolaylıkla uygulanabileceği vurgulanmıştır.

Yüksel (2018), yılında Türkiye'de yaptığı bir çalışmada tavuk etlerinde *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp.'nin teşhisinde klasik kültürel metod, LAMP ve Real time PCR'ı karşılaştırmış ve sonuç olarak LAMP testinin bu metodlarla uyumlu olduğunu, hızlı, spesifik, hassas ve düşük maliyetli olması gibi özellikleri sayesinde Real Time PCR'a alternatif olabileceğini belirlemişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Salmonella türleri başta enterik enfeksiyonlar olmak üzere sistemik septisemik enfeksiyonlara, sığır ve koyunlarda abortlara, kanatlılarda pullorum ve kanatlı tifosuna neden olan zoonotik etkenlerdir. *Salmonella* etkenlerinin geleneksel kültürel yöntemlerle teşhisi uzun sürmekte ve oldukça zahmetlidir. Günümüzde altın standart olarak kabul edilen kültürel yöntemler kadar güvenilir olan, hem zaman hem de ekonomik açıdan tasarruf sağlayan, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek yeni yöntemlerin önemi giderek artmaktadır. Bu nedenle, moleküler yöntemlerden klasik konvansiyonel PCR, Real Time PCR ve LAMP'in kullanımı daha fazla önem kazanmaktadır. Hızlı amplifikasyon, basit kullanım ve kolay tespit avantajları göz önüne alındığında LAMP, gelişmiş ekipman veya kalifiye personel gerektirmeden özellikle imkanların daha kısıtlı olduğu gelişmekte olan ülkelerde bulaşıcı hastalıkların izlenmesinin yanı sıra klinik teşhis için potansiyel uygulamalara sahiptir. Son yıllarda LAMP yöntemiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olup bu avantajlı diyagnostik özellikleri nedeniyle PCR'ye alternatif bir yöntem olarak gösterilmektedir.

Bu çalışmada, klasik konvansiyonel PCR, RT-PCR ve LAMP yöntemleriyle *invA* genine ait spesifik DNA sekansları ile *Salmonella* spp. varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Tez çalışması ile testin duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlı sayıda referans suşlar ile değerlendirilmiş olsa da, *Salmonella* spp. *invA* geninin varlığı yüksek özgüllük ve hassasiyetle tespit edilmiştir.

Salmonella spp.'nin kültür yöntemiyle tespitinde çok sayıda biyokimyasal ve serolojik testlerden kaynaklanan sarf malzeme maliyetleri ve zaman kaybına sebep olan durumlar, LAMP ve PCR testlerini ön plana çıkarmıştır. LAMP yöntemi için yüksek maliyetlere sahip termal siklus cihazına ihtiyaç duyulmaması, izotermal sıcaklıkta DNA ürünlerinin basit bir sıcak su banyosu ya da kuru blok ısıtıcılarda 60-65°C'de elde edilebilmesi, sonucun SYBR Green I boyası gibi indikatörlerle çıplak gözle bile görülebilir olması bu testin PCR'a alternatif bir yöntem haline geldiğini kanıtlar niteliktedir. Bu çalışmada, LAMP reaksiyonu 65°C sıcaklıkta 45dk'da gerçekleştirilmiş ve sonuçlar hem elektroforezle hem de SYBR Green I boyası kullanılarak görsel hale getirilmiştir.

Konvansiyonel PCR uygulamalarında hedef DNA'ya özgü 2 adet primer kullanılırken, Real-time PCR'da bunlara ilave olarak probler ve boyalar

kullanılmaktadır. LAMP'te ise hedef DNA'daki 8 bölgeyi tanıyan 6 adet primer kullanılır. Bu durum LAMP reaksiyonunun hedef mikroorganizmaya özgüllüğünün PCR'dan daha yüksek olmasını sağlar. Çalışmamızda da elde edilen sonuçlara bakıldığında LAMP reaksiyonunun özgüllüğü ve duyarlılığı %100 olarak belirlenirken, testin tespit limiti PCR ve real-time PCR ile karşılaştırıldığında en düşük 3.66×10^2 olarak belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda da tez çalışmasında tespit ettiğimiz oranlarla benzer limitler belirlenmiştir. Bu durum özellikle incelenen materyalde bulunan DNA miktarı düşük olduğunda önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, LAMP testin Salmonella'nın tespitine yönelik optimizasyonu ile ilgili ölçütler belirlenerek testin tanı performansının belirlenmesi aşamasına gelinmiştir. Bu aşamada LAMP'in prototip olarak kullanımını hedefleyen proje hazırlıkları ile tanı ve saha validasyonlarına yönelik çalışmaların sürdürülmesi hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdullah, J., Saffie, N., Sjasri, F.A.R., Husin, A., Abdul-Rahman, Z., Ismail, A., Aziah, I. and Mohamed, M. (2014). Rapid detection of *Salmonella* Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45 (4). 1385-1391.
- Acha, P.N. and Szyfres, B. (2001). Salmonellosis. In: Zoonosis and communicable disease common to man and animals, 3rd edition. Washington DC. *Pan American Health Organisation*. 233-246.
- Adhikari, B., Besser, T.E., Gay, J.M., Fox, L.K., Davis, M.A., Cobbold, R.N., Berge, A.C., McClanahan, R. and Hancock, D.D. (2009). Introduction of new multidrug-resistant *Salmonella* enterica strains into commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*. (92). 4218-4228.
- Alvarez-Fernandez, R. (2013). Explanatory chapter: PCR primer design. *Methods Enzymol*. (529). 1-21.
- Amagliani, Giulia., La Guardia, M.E., Dominici, S., Brandi, G. and Omiccioli, E. (2022). *Salmonella* Abortusovis: An Epidemiologically Relevant Pathogen. *Current Microbiology*. 79(3). 1-7.
- Aryan, E., Makvandi, M., Farajzadeh, A., Huygen, K., Bifani, P., Mousav,i SL., Fateh, A., Jelodar, A., Gouya, M.M. and Romano, M.(2009). A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of Mycobacterium tuberculosis complex. *Microbiology Research*. 165(3). 211-220.
- Bal, S.H. ve Budak, F. (2012). Mikroarray Teknolojisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 38 (3). 227-233.
- Barrow, P.A. and Neto, O.F. (2011). Pullorum Disease And Fowl Typhoid – New Thoughts On Old Diseases: A Review. *Avian Pathology*. (40). 1–13.
- Barrow, P.A. and Methner, U. (drl.). (2013). *Salmonella* In Domestic Animals. Cab International, Wallingford, Oxon, Uk.
- Barrow P.A. and Neto O.F. (2011). Pullorum Disease And Fowl Typhoid – New Thoughts On Old Diseases: A Review. *Avian Pathology*. (40). 1–13.
- Barrow, P.A. (1994). Serological diagnosis of *Salmonella* serotype Enteritidis infections in poultry by ELISA and other tests. *International Journal of Food Microbiology*. 21. 55–68.
- Barrow, P.A. (1992). ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* infections in poultry: a review. *Epidemiology & Infection*. (109). 361–369.
- Belloy, L., Decrausaz, L., Boujon, P., Hächler, H. and Waldvogel, A.S. (2009). Diagnosis by culture and PCR of *Salmonella* Abortusovis infection under clinical conditions in aborting sheep in Switzerland. *Veterinary Microbiology*. 138. 373–377.
- Biswas, R., Agarwal, R.K., Bhilegaonka, r K.N., Kumar, A., Nambiar, P., Rawat, S. and Singh, M. (2010). Cloning and sequencing of biofilm-associated protein (bapA) gene and its occurrence in different serotypes of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*. (52). 138-143.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. and Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal Of Clinical Microbiology*. 38(7). 2465–2467.
- Brumell, J.H., Perrin, A.J., Goosney, D.L. and Finlay, B.B. (2002). Microbial Pathogenesis: New Niches for *Salmonella*. *Current Biology*. 12(1). 15-17.

- Cagiola, M., Severi, G., Forti, K., Menichelli, M., Papa, P., De Giuseppe, A. and Pasquali, P. (2007). Abortion due to *Salmonella* enterica serovar Abortusovis (S. Abortusovis) in ewes is associated to a lack of production of IFN- γ and can be prevented by immunization with inactivated S. Abortusovis vaccine. *Veterinary Microbiology*. 121. 330-337.
- Cannon, R.M. and Nicholls, T.J. (2002). Relationship Between Sample Weight, Homogeneity, And Sensitivity Of Fecal Culture For *Salmonella* Enterica. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. (14). 60–62.
- Carrique-Mas, J.J. and Davies, R.H. (2008). Sampling And Bacteriological Detection Of *Salmonella* In Poultry And Poultry Premises: A Review. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. (27). 665–677.
- Cai, H.Y., Caswell, J.L. and Prescott, J.F. (2014). Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals a diagnostic laboratory perspective. *Veterinary Pathology*. 51(2). 341–350.
- Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M.J., Klingele, A.J., Liles, M.R. and Schoenfeld, T.W., 2014. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Frontiers in Microbiology*, (5). 395.
- Chattaway, M.A., Langridge, G.C. and Wain, J. (2021). *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. *Scientific Reports*. (11). 1-8.
- Chen, J.H., Lu, F., Lim, C.S., Kim, J.Y., Ahn, H.J., Suh, I.B., Takeo, S., Tsuboi, T., Sattabongkot, J. and Han, E.T. (2009). Detection of Plasmodium vivax infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Tropica*. 113(1). 61-65.
- Cheung, P.Y. and Kam, K.M. (2012). *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. *Food Research International*. (45). 802-808.
- Clarke, R.C. and Gyles, C.L. *Salmonella*. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (2nd ed.). (1993). Ames, IA: Iowa State Univ Press. 133–153.
- Costa, L.F., Paixao, T.A., Tsolis, R.M., Baumler, A.J. and Santos, R.L. (2012). Salmonellosis in cattle: advantages of being an experimental model. *Research in Veterinary Science*. (93). 1-6.
- Cummings, K.J., Warnick, L.D., Davis, M.A., Eckmann, K., Gröhn, Y.T., Hoelzer, K., MacDonald, K., Root, T.P., Siler, J.D., McGuire, S.M., Wiedmann, M., Wright, E.M., Zansky, S.M. and Besser, T.E. (2012). Farm animal contact as risk factor for transmission of bovine associated *Salmonella* subtypes. *Emerging Infectious Diseases*. 18 (12). 1929-1936.
- Ellis, E.M., Williams, J.E., Mallinson, E.T., Snoeyenbos, G.H. and Martin, W.J. (1976). Culture Methods for the Detection of Animal Salmonellosis and Arizonosis. Iowa State University Press, Ames, USA.
- Eng, S.K., Pusparajah, P., Mutalib, N.S.A., Ser, H.L., Chan, K.G. and Lee, L.H. (2015). *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 8(3). 284-293.
- Eriksson, E. and Aspan, A. (2007). Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research*. (3). 21–40.
- Ewing, W.H. (1986). Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, N.Y.

- Farmer, J.J. (1999). Enterobacteriaceae, p. 442–458. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Farrell, J.J., Doyle, L.J., Addison, R.M., Reller, L.B., Hall, G.S., and Procop, G.W. (2005). Broad-range (pan) *Salmonella* and *Salmonella* serotype Typhi-specific real-time PCR assays. *Microbiology and Infectious Disease*. (123). 339-345.
- Felix, F.S. ve Angnes, L. (2018). Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 102. 470-478.
- Ferrerias, M.C., Munioz, M., Perez, V., Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Aduriz, G. and Garcia-Marin, J.F. (2007). Unilateral orchitis and epididymitis caused by *Salmonella enterica diarizonae* subspecies infection in a ram. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*. 19. 194-197.
- Filioussis, G., Petridou, E., Johansson, A., Christodoulopoulos, G. and Kritas, S.K. (2008). Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. *African Journal of Microbiology Research*. (2). 313-315.
- Finlay, B.B., Heffron, F. and Falkow, S. (1989). Epithelial Cell Surfaces Induce *Salmonella* Proteins Required for Bacterial Adherence and Invasion. *Science*. 243. 940-943.
- Fischbach, J., Xander, N.C., Frohme, M. and Glökler, J.F. (2015). Shining a light on LAMP assays- A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques*. 58 (4). 189-194.
- Fricker, C.R. (1987). The isolation of *Salmonellas* and campylobacters. *Journal of Applied Bacteriology*. (63). 99–116.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., Hayashi, H., Nagai, H., Ito, K. and Kawaguchi, R.(2003). Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6). 2605–2615.
- Gandelman, O., Jackson, R., Kiddle, G. and Tisi, L. (2011). Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *International Journal of Molecular Science*. 12(12). 9108-24.
- Gıdalab. (2022). <https://gidalab.tarimorman.gov.tr/balikesir/Haber/32/Kullanma-Sularinda-Salmonella-Spp-Aranmasi-Ve-Enterokok-Fekal-Streptokok-membran-Filtrasyon-Tespiti-Ve-Sayimi-Analizinde-Numune-Kabulune-Baslanmistir-erisim-tarihi-23.06.2022>
- Griffith, R.W., Carlson, S.A. and Krull, A.C. (2019). Salmonellosis. Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson, ve Jianqiang Zhang (eds.). *Diseases of Swine*, Eleventh Edition. Section IV Bacterial Diseases.
- Grimont, P.A. and Weill, F.X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France: Institut Pasteur.
- Gulig, P.A. and Curtiss, R. (1987). Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium* *Infectious Immunology*. 55. 2891-2901.
- Habing, G.G., Lombard, J.E., Koprak, C.A., Dargatz, D.A. and Kaneene, J.B. (2012). Farm level associations with the shedding of *Salmonella* and antimicrobial resistant *Salmonella* in US dairy cattle. *Foodborne Pathogen Diseases*. 9(9). 815–21.
- Hara-Kudo, Y., Manabu, Yoshino M., Kojima, T. and Ikedo, M. (2005). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*. (253). 155–161.

- Hardman, P.M., Wathes, C.M. and Wray, C. (1991). Transmission of *Salmonellae* among calves penned individually. *Veterinary Records*. 129(15). 327–9.
- Hassan, M.M., Grist, L.F., Poirier, A.C., and Ragione, R.M. (2022). JMM profile: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): for the rapid detection of nucleic acid targets in resourcelimited settings. *Journal of Medical Microbiology*. (71). 1-6.
- Harvey, R.W.S. and Price, T.H. (1974). Isolation of *Salmonellas*. Public Health Laboratory Service. Monograph Series 8. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Helmuth, R., Stephan, R., Bunge, C., Hoog, B., Steinbeck, A. and Bulling, E. (1985). Epidemiology of virulence associated plasmids and outer membrane protein patterns with seven common *Salmonella* serovars. *Infectious Immunology*. 48. 175-182.
- Hillier, L. and Green, P. (1991). OSP: a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *PCR Methods Applications*. (1). 124–128.
- Holschbach, C.L. and Peek, S.F. (2017). *Salmonella* in dairy cattle. *Veterinary Clinical Food and Animal*. 34. 133-154.
- Hoszowski, A. and Wasyl, D. (2001). Typing of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Mbandaka isolates. *Veterinary Microbiology*. (80). 139-148.
- Hyndman, D., Cooper, A., Pruzinsky, S., Coad, D. and Mitsuhashi, M. (1996). Software to determine optimal oligonucleotide sequences based on hybridization simulation data. *Biotechniques*. (20). 1090–1097.
- International Organization For Standardization. (2007). Iso 6579:2002/Amd 1:2007 (Annex D). Detection Of *Salmonella* Spp. In Animal Faeces And In Samples Of The Primary Production Stage – Horizontal Method For The Detection Of *Salmonella* Spp., International Organization For Standardization, Geneva, Switzerland.
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Gurbourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I. and Weill, F.X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research Microbiology*. (165). 526-530.
- Jajere, S.M. (2019). A review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*. 12. 504–521.
- Kaneko, H., Iida, T. and Aoki, K. (2005). Sensitive And Rapid Detection Of Herpes Simplex Virus And Varicella-Zoster Virus Dna By Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(7). 3290-3296.
- Kauffmann, F. (1966). The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
- Kim, A., Nguyen, T.L. and Kim, D.H. (2017). Modern Methods of Diagnosis. *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*. 109-145.
- Kreitlow, A., Becker, A., Schotte, U., Malorny, B., Plötz, M. and Abdulmawjood, A. (2021). Evaluation of different target genes for the detection of *Salmonella* sp. by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*. (72). 420-426.
- Le Minor, L. and Popoff, M.Y. (1987). Request for an opinion. Designation of *Salmonella* enterica sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systemic Bacteriology*. (37).465–468.
- Lee, K.M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R. and Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*. (47). 264–276.

- Lomborg, S.R., Agerholm, J.S., Jensen, A.L. and Nielsen, L.R. (2007). Effects of experimental immunosuppression in cattle with persistently high antibody levels to *Salmonella* Dublin lipopolysaccharide O-antigens. *BMC Veterinary Research*. 3 (17).1-6.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A. and Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*. (70). 7046–7052.
- Malorny, B. and Hoorfar, J. (2005). Toward standardization of diagnostic pcr testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. (43). 3033–3037.
- Mastroeni, P., Chabalgoity, J.A., Dunstan, S.J., Maskell, D.J. and Dougan, G.(2000). *Salmonella*: immune responses and vaccines. *The Veterinary Journal*. (161). 132-164.
- Mateus, A., Taylor, D.J., Brown, D., Mellor, D.J., Bexiga, R. and Ellis, K. (2008). Looking for the unusual suspects: a *Salmonella* Dublin outbreak investigation. *Public Health*. (122). 1321-1323.
- Maurischat, S., Baumann, B., Martin, A. and Malorny, B. (2015a). Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella* enterica subsp. enterica Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:- by real-time multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*. (193). 8–14.
- Maurischat, S., Szabo, I., Baumann, B. and Malorny, B. (2015b). Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella* Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro *Salmonella* Vac E. *Journal of Microbiology Methods*. (112). 92–98.
- Meyerholz, D.K. and Stabel, T.J. (2003). Comparison of early ileal invasion by *Salmonella* enterica serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Veterinary Pathology*. 40(4). 371-375.
- Meyerholz, D.K., Stabel, T.J., Ackermann, M.R., Carlson, E.A., Jones, B.D. and Pohlenz, J. (2002). Early epithelial invasion by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Veterinary Pathology*. 39(6). 712-720.
- Millner, P., Ingram, D., Mulbry, W. and Arkan, O.A. (2014). Pathogen reduction in minimally managed composting of bovine manure. *Waste Manag*. 34(11). 1992–9.
- Minnucci, G., Amicarelli, G., Salmoiraghi, S., Spinelli, O., Guinea Montalvo, M.L., Giussani, U., Adlerstein, D. and Rambaldi, A. (2012). A novel, highly sensitive and rapid allele-specific loop-mediated amplification assay for the detection of the JAK2V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 97(9). 1394–1400.
- Mitchell, F.H.H. (2019). Development of Two Rapid Diagnostic Tests for The detection of Bovine Salmonellosis in calves with scour. Ph.D. Thesis, University of Kingston, London.
- Mohler, V.L., Izzo, M.M. and House, J.K. (2009). *Salmonella* in calves. *Veterinary Clinics North America Food Animal Practice*. 25(1). 37-54.
- Montrasio, C. (2016). Development of a Software Application for Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Primer Design. UNIVERSITY OF MILAN – BICOCCA Department of Biotechnology and Biosciences PhD in Industrial Biotechnology. Doctoral Thesis.
- Moore, M.M. and Feist, M.D. (2007). Real-time PCR method for *Salmonella* spp. targeting the stn gene. *Journal of Applied Microbiology*. (102). 516-530.

- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communities*. (289). 150-154.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N. and Notomi, T. (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 59(2). 145-57.
- Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular Cell Probes*. 16(3). 223-9.
- Nagamine, K., Kuzuhara, Y. and Notomi, T. (2002b). Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochemical and Biophysical Research Communities*. 290 (4). 1195-1198.
- Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2002a). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular Cell Probes*. 16(3). 223-229.
- Nakao, R., Stromdahl, E.Y., Magona, J.W., Faburay, B., Namangala, B., Malele, I., Inoue, N., Geysen, D., Kajino, K., Jongejan, F. and Sugimoto, C. (2010). Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. *BMC Microbiology*. 10(296).2-11.
- Nielsen, L.R., Schukken, Y.H., Grohn, Y.T. and Ersboll, A.K. (2004). *Salmonella* Dublin infection in dairy cattle: risk factors for becoming a carrier. *Preventive Veterinary Medicine*. (65). 47-62.
- Nielsen, L.R. (2012). Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Veterinary Microbiology*. (162). 1-9.
- Nkouawa, A., Sako, Y., Nakao, M. and Nakaya, K. (2009). Ito A Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(1). 168-74.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28(12). e63.
- OIE.(2016).Salmonellosis.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.08_SALMONELLOSIS.pdf.
- OIE.(2018).Salmonellosis.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.08_SALMONELLOSIS.pdf
- Ou, H., Wang, Y., Gao, J., Bai, J., Zhang, Q., Shi, L., Wang, X. and Wang, C. (2021). Rapid detection of *Salmonella* based on loop-mediated isothermal amplification. *Annals of Palliative Medicine*. 10(6). 6850-6858.
- Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. (2004). Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1). 257-63.
- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., et al. (2005). Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2895–2903.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V.L. and Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases.

Review Medical Virology. 18 (6). 407-421.

- Park, S.H., Aydın, M., Khatiwara, A., Dolan, M.C., Gilmore, D.F., Bouldin, J.L., Ahn, S. and Ricke, S.C. (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiology*. (38). 250–262.
- Park, S.H., Jarquin, R., Hanning, I., Almeida, G. and Ricke, S.C. (2011). Detection of *Salmonella* spp. survival and virulence in poultry feed by targeting the hilA gene. *Journal of Applied Microbiology*. (111). 426–432.
- Peek, S.F., Cummings, K.J., McGuirk, S.M., Sweeney, R.W. and Cummings, K.J. (2017). Infectious diseases of the gastrointestinal tract. In: Peek SF, Divers TJ, editors. *Diseases of dairy cattle* (3rd ed.). St. Louis, MO: Elsevier.
- Peyret, N., Seneviratne, P. A., Allawi, H. T. and SantaLucia, J., Jr. (1999). Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A-A, C-C, G-G, and T-T mismatches. *Biochemistry* (38). 3468–3477.
- Piknova, L., Kaclikova, E., Pangallo, D., Polek, B. and Kuchta, T. (2005). Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to fimC gene. *Current Microbiology*. (50). 38–42.
- Plym-Forsell, L. and Ekesbo, I. (1996). Survival of *Salmonellas* in urine and dry faeces from cattle – an experimental study. *Acta Veterinaria Scandinavica*. (37). 127-131.
- Popoff, M. Y., and L. Le Minor. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- Popoff, M. Y., J. Bockemühl, and F. W. Brenner. 2000. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. (151).63–65.
- Popoff, M.Y., Bockemühl, J. and Gheesling, L.L. (2003). Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research Microbiology*. 154(3). 173–174.
- Pospischil, A., Wood, R.L. and Anderson, T.D. (1990). Peroxidase-antiperoxidase and immunogold labeling of *Salmonella* typhimurium and *Salmonella* choleraesuis var kuzendorf in tissues of experimentally infected swine. *American Journal Veterinary Research*. 51. 619-624.
- Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. (2004). Characterization of *Salmonella* enterica subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology*. (186). 5883–5898.
- Pullinger, G.D., Van Diemen, P.M., Dziva, F. and Stevens, M.P. (2010). Role of two-component sensory systems of *Salmonella* enterica serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. *Microbiology*. (156). 3108-3122.
- Rasooly, A. and Herold, K.E. (2008). Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathology Disease*. (5). 531–550.
- Reissbrodt, R. (1995). Conventional and alternative methods for isolation and identification of *Salmonella* – an overview. *Biotest Bull*. 5. 143–156.
- Rodriguez, A., Rodriguez, M., Cordoba, J.J. and Andrade, M.J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods in Molecular Biology*. (1275). 31-56.
- Ruby, T., McLaughlin, L., Gopinath, S. and Monack. D. (2012). *Salmonella*'s long-term relationship with its host. *FEMS Microbiology Reviews*. 36 (3). 600-615.
- Rupens, N.P. and Herman, L.M.F. (2002). Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens. *Journal of AOAC International* . 85(4). 984-

- Rychlik, W. and Rhoads, E.R. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing, and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. (17). 8543–8551.
- Sahni, B.A.K., Grover, C.N., Sharma, B.A., Khan, M.I.D. and Kishore, J. (2012). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Medical Journal Armed Forces India*. 1-8.
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (95). 1460–1465.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsohis, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G. and Baumler, A.J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*. (3). 1335-1344.
- Schauser, K., Olsen, J.E. and Larsson, L.I. (2004). *Journal of Medical Microbiology*. 53(7). 691-695.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. (270). 467-70.
- Schiaffino, A., Beuzòn, C.R., Uzzau, S., Leori, G., Cappuccinelli, P., Casadesus, J. and Rubino, S. (1996). Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella* Abortusovis. *Applied Environmental Microbiology*. 62. 2375-2380.
- Shabana, I.I., Bouqellah, N.A. and Zaraket, H. (2017). Investigation of viral and bacterial enteropathogens of diarrheic sheep and goats in Medina, Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine*. 34. 1–12
- Silva, D.S.P., Canato, T, Magnani, M., Alves, J., Hirooka, E.Y. and Oliveira, T.C.R.M. (2019). Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. *International Journal of Food Science & Technology*. (46). 1502-1507.
- Singh, V. (2013). *Salmonella* serovars and their host specificity. *Journal of Veterinary Science Animal Husbandry*. 1. 1-4.
- Smith, B.P. Salmonellosis in ruminants. In: Smith BP (eds). In: *Large animal internal medicine*. (4th ed.). (2009). (s. 877–81).). St. Louis(MO): Mosby.
- Spickler, A.R. (2017). *Salmonella* Abortusovis. [https:// www. cfsph. iasta te. edu/ Facts heets/ pdfs/ salmo nella_ abort usovis. pdf](https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/salmonella_abortusovis.pdf) *The Center for Food Security and Public Health*. 1-4.
- Spinelli, O., Rambaldi, A., Rigo, F., Zanghi, P., D'Agostini, E., Amicarelli, G., Colotta, F., Divona, M., Ciardi, C., Coco, F.L. and Minnucci, G. (2014). Simple, rapid and accurate molecular diagnosis of acute promyelocytic leukemia by loop mediated amplification technology. *Oncoscience*. 2(1). 50-8.
- Sun, J., Najafzadeh, M.J., Vicente, V., Xi, L. and de Hoog, G.S. (2009). Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. *Journal of Microbiological Methods*. 80(1). 19-24.
- Switt, A.M., Soyer, Y., Warnick, L.D. and Wiedmann, M. (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella* enterica serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(4). 407-415.
- Tang, T., Cheng, A., Wang, M., Li, W., He, O., Jia, R., Zhu, D. and Chen, X. (2012).

- Development and clinical verification of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* species in suspect infected ducks. *Poultry Science*. 91. 979–986.
- Taylor, J. and McCoy, J.H. (1969). *Salmonella* and Arizona infections and intoxications. In Foodborne Infections and Intoxications. *New York: Academic Press*. 3–71.
- Taylor, R.J. and Burrows, M.R. (1971). The survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* Dublin in slurry on pasture and the infectivity of *S. Dublin* for grazing calves. *British Veterinary Journal*. (127). 536-542.
- Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M.A., Stevens, M., Jones, M.A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard, D., Kingley, R.A., Bignel, A., Clark, L., Harris, B., Ormond, D., Abdellah, Z., Brooks, K., Cherevach, I., Chillingworth, T., Woodward, J., Norberczak, H., Lord, A., Arrowsmith, C., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Sanders, M., Whitehead, S., Chabalgoity, J.A., Maskell, D., Humphrey, T., Roberts, M., Barrow, P.A., Dougan, G. and Parkhill, J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* enteritidis Pt4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research*. 18. 1624–1637.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. and Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 3 (5). 877-882.
- Tomlinson, J. and Boonham N. (2008). Potential of LAMP for detection of plant pathogens. Perspectives in Agriculture. *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 3 (066). 1-8.
- Uemura, N. Makimura, K., Onozaki, M., Otsuka, Y., Shibuya, Y., Yazaki, H., Kikuchi, Y., Abe, S. and Kudoh, S. (2008). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *Journal of Medical Microbiology*. 57(1). 50-7.
- Ushio, M., Yui, I., Yoshida, N., Fujino, M., Yonekawa, T., Ota, Y., Notomi, T. and Nakayama, T. (2005). Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Medical Virology*. 77(1). 121-7.
- Uzzau, S. (2013). *Salmonella* infections in sheep. Barrow PA and Methner U (eds.) In: *Salmonella in domestic animals, 2nd edn*. Wallingford: CAB International.
- Va'radi, L., Luo, J.L., Hibbs, D.E., Perry, J.D., Anderson, R.J., Orenge, S. and Groundwater, P.W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chemistry Society Reviews*. (46). 4818—4832.
- Veterinary Record. (2017). *Salmonella* investigations in ruminants. *Veterinary Record*. 181. 366-367.
- Villarreal-Ramos, B., Manser, J.M, Collins, R.A., Chance, V., Eckersall, P.D., Jones, P.W. and Dougan, G. (2000). Susceptibility of calves to challenge with *Salmonella* Typhimurium 4/74 and derivatives harbouring mutations in *htrA* or *purE*. *Microbiology*. (146). 2775-2783.
- Wallis, T.S., Paulin, S.M., Plested, J.S., Watson, P.R. and Jones, P.W. (1995). The *Salmonella* Dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of Salmonellosis in cattle. *American Society for Microbiology*. 63(7). 2755-2761.
- Wang, L., Shi, L., Alam, M.J., Geng, Y. and Li, L. (2008). Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*. (41). 69–74.

- Wang, Y. and Wang, D. (2013). Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Detecting Foodborn *Salmonella* in Raw Milk. *Advanced Materials Research*. (647). 577-582.
- Wang, W., Liu, L., Song, S., Tang, L., Kuang, H. and Xu, C. (2015). A highly sensitive ELISA and immune-chromatographic strip for the detection of *Salmonella* typhimurium in milk samples. *Sensors*. (15). 5281–5292.
- Wang, M., Yang, J., Gai, Z., Huo, Z., Zhu, J., Li, J., Wang, R., Xing, S., Shi, G., Shi, F. ve Zhang, L. (2018). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella* Typhimurium in milk. *International Journal of Food Microbiology*. (266). 251-256.
- Wang, C., Xu, Z., Hou, X., Wang, M., Zhou, C., Liang, J. ve Wei, P. (2022). Rapid, Sensitive, Specific, and Visual Detection of *Salmonella* in Retail Meat with Loop-Mediated Isothermal Amplification, Targeting the *invA* Gene. *Journal of Food Protection*. 85 (1). 6–12.
- Warsen, A.E., Krug, M.J., LaFrentz, S., Stanek, D.R., Loge, F.J. ve Call, D.R. (2004). Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Applied Environmental Microbiology*. 70(World Health Organization (Who). (1994). Guidelines On Detection And Monitoring Of *Salmonella* Infected Poultry Flocks With Particular Reference To *Salmonella* Enteritidis. Wray C. ve Davies R.H. (çev.), Who, Geneva, Switzerland: Zoon/94.173(7). 4216–4221.
- Wathes, C.M., Zaidan, W.A., Pearson, G.R., Hinton, M. and Todd, N. (1988). Aerosol infection of calves and mice with *Salmonella* typhimurium. *Veterinary Records*. 123(23). 590-4.
- Wattiau, P. Boland, C. ve Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella* enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (22). 7877-7885.
- Wirz-Dittus, S., Belloy, L., Hüsey, D., Waldvogel, A.S. and Doherr, M.G. (2010). Seroprevalence survey for *Salmonella* Abortusovis infection in Swiss sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine*. 97. 126–130.
- Wray, C. and Davies, R. (2000). *Salmonella* infections in cattle. In: Wray C and Wray W (eds.). *Salmonella* in domestic animals. New York:CABI Publishing ; pp.169-190.
- Wray, C. and Linklater, K.A. (2000). *Salmonella* infections in sheep. In: *Salmonella* in domestic animals. In: Wray C and Wray A (eds.). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI. Pp. 209-18.
- Wray, C. and Sojka, W.J. (1981). *Salmonella* Dublin infection of calves: use of small doses to simulate natural infection on the farm. *Journal of Hygiene*. 87. 501-509.
- Xueran, M., Xiwen, Z., Changwei, L., Xiaolan, Y., Zhuangzhuang, K., Xuan, W., Rong, X., Yulong, W. and Hongning, W. (2019). Development and application of a visual loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick (LAMP-LFD) method for rapid detection of *Salmonella* strains in food samples. *Food Control*. (104). 9–19.
- Xu, J., Zheng, Q., Yu, L., Liu, R., Zhao, X., Wang, G., Wang, Q. and Cao, J. (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25. *Food Science and Nutrition*. 1(6). 432-438.
- Yang, Q., Domesle, K.J. and Ge, B. (2018). Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed:Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathogens and Disease*. 15(6). 309-331.
- Yang, Q., Domesle, K.J, Wang, F. and Ge, B. (2016). Rapid detection of *Salmonella* in food

and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time. *BMC Microbiology*. 16.

- Yang, W., Pin, C., Haibing, G., Yang, C., Hui, L. and Qigai, H. (2009). Loop-mediated isothermal amplification targeting the *apxIVA* gene for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett*. 300(1). 83-9.
- Yüksel, M. (2018). Tavuk Etlerinde *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp.'nin Standart Kültürel Yöntem, İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) Ve Real-Time PCR İle Belirlenmesi Ve Doğrulanması. Basılmamış Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- Yoltaş, A. ve Karaboz, İ. (2010). DNA Mikroarray Teknolojisi ve Uygulama Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*. (8). 01-19.
- Yoshikawa, T.T., Herbert, P. and Oill, P.A. (1980, Kasım). 'Salmonellosis'. *Teaching Conference*, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance (Specialty Conference). *The Western Journal of Medicine*. (133). 408-417.
- Zhang, S., Kingsley, R.A., Santos, R.L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R.M., Adams, L.G. ve Baumler, A.J. (2003) Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhoea. *Infection and Immunity*. 71 (1): 1-12.
- Zhang, H.M., Thekisoe, O.M., Aboje, G.O., Kyan, H., Yamagishi, J., Inoue, N., Nishikawa, Y., Zakimi, S. ve Xuan, X. (2009). Toxoplasma gondii: Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Experimental Parasitology*. 122(1).47-50.
- Zhang, L., Du, X., Chen, C., Han, Q., Chen, Q., Zhang, M., Xia, X., Song, Y. ve Zhang, J. (2019). Development of a rapid, one-step-visual method to detect *Salmonella* based on IC-LAMP method. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 21 (1). 20-25.

ÖZ GEÇMİŞ

Gölnur SERDAR, Samsun Huriye Süer Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldu. 2013-2017 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansını tamamladı. 2015 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. Tarım ve Orman Bakanlığı Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nde görev yapan Gölnur SERDAR, iyi derecede İngilizce bilmektedir.

Temel ilgi alanları: Gelişim Teknolojileri, Moleküler Genetik, Resim

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-3756-4606

Yayımlar:

1. **Serdar, G.** ve Genç, O.(2022). Detection Of Humoral And Cellular Immunity On *B. abortus* S19 Vaccinated Cows with Conjunctival Route and Monitoring Of The Immune Response. 7th International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST 2022), 25-29 Temmuz 2022, pp.: 40.

2. **Serdar, G.** ve Genç, O.(2022). Comparison Of The Specificity And Sensitivity Of The Salmonella Inva Gene with LAMP and Conventional PCR Methods. 7th International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST 2022), 25-29 Temmuz 2022, pp.: 41.

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. En iyi poster sunumu 1.liği (7. Uluslararası Veteriner Bilimleri ve Tekniklerindeki Gelişmeler Kongresi). Serdar, G. ve Genç, O.(2022). Comparison Of The Specificity And Sensitivity Of The Salmonella Inva Gene with LAMP and Conventional PCR Methods. 7th International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST 2022), 25-29 Temmuz 2022, pp.: 41.