

ELAZIĞ VE ÇEVRESİNDEKİ ÇEŞİTLİ SU KAYNAKLARINDAN TEMİN EDİLEN BALIKLARDAN *SALMONELLA İZOLASYONU VE PCR İLE TEYİT EDİLMESİ*

Hasan Basri ERTAŞ¹ Burhan ÇETİNKAYA¹ Engin ŞEKER² Adile MUZ¹ Mustafa SARIEYYÜPOĞLU²

¹Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi. Elazığ-TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi. Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.05.1998

Salmonella Isolation in Fish Obtained From Various Water Sources in Elazığ and Its Vicinity, and PCR Confirmation

SUMMARY

The aim of this study was to investigate *Salmonella* spp., that cause serious infections and food poisoning in humans and animals, in fish and water samples provided in various water sources in Elazığ and its vicinity. Intestinal contents of 145 fish (7 different species) caught in six different water sources were examined bacteriologically for the presence of *Salmonella* spp. DNA was extracted from five suspicious isolates grown in selective media and Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification was carried out using specific primers derived from 16S rRNA gene of *Salmonella*. In the 1.5% agarose gel electrophoresis of the PCR products, all the isolates (3.45%) were confirmed as *Salmonella* spp. These results provide information on the pollution in regional water sources and therefore on the degree of contamination of fish that live in these sources. The isolation of *Salmonella* agents which cause various infections in humans suggests that the pollution of water sources can threaten human health directly. However, large-scale studies are needed in order to determine the potential of this threat.

Key Words: Fish, *Salmonella*, Isolation, PCR

ÖZET

Bu çalışmada Elazığ ve çevresindeki çeşitli su kaynaklarından temin edilen balıklardan, insan ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara ve gıda zehirlenmelerine neden olan *Salmonella*'ların araştırılması amaçlandı. Çalışmada altı farklı bölgedeki su kaynaklarından yakalanan yedi tür balığa ait 145 adet barsak içeriği *Salmonella* selektif zenginleştirme vasatı kullanılarak incelendi. Selektif vasatlarda üreyen toplam beş şüpheli izolattan DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA'lar *Salmonella*'ların 16S rRNA geninden türetilen cins spesifik primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda amplifiye edildiler. PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezde değerlendirilmesinde beş izolatın (%3.45) da *Salmonella* spp. olduğu saptandı. Bu sonuçlar yöredeki su kaynaklarındaki kirlilik ve dolayısıyla bu sularda yaşayan balıkların kontaminasyon derecesi hakkında bilgi vermektedir. İnsanlarda çeşitli enfeksiyonlar oluşturan *Salmonella* etkenlerinin izole edilmesi, sulardaki kirliliğin insan sağlığını da tehdit edebileceğini göstermektedir. Ancak bu tehditin ne boyutlarda olduğunu tespit etmek için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim duymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Balık, *Salmonella*, İzolasyon, PCR

GİRİŞ

Tüm doğal çevrelerde olduğu gibi sularda meyda-na gelen kirlilik de bu ortamlarda yaşayan canlıları etkilemeye başlamıştır. Özellikle şehir kanalizasyon atıklarının boşaltıldığı göl sulardında kirlilik miktarı diğer sulara göre daha fazla olmaktadır. Sulardaki bu kirliliğe paralel olarak insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren birçok tehlikeli patojen mikroorganizma bu tür sulara bulaşmakta, üremekte ve içinde yaşayan canlıları da kontamine etmektedir.

Insan ve hayvanlarda ciddi gıda zehirlenmelerine ve enterik enfeksiyonlara sebep olan *Salmonella*'lar da sulardaki bu bakteriyel floranın bir parçasını teşkil etmektedir. İnsan ve hayvanların sindirim sisteminde yaşayan bu bakterinin gayta yoluyla karıştığı kanalizasyonların boşaltıldığı su ortamlarını kontamine etme ve dolayısıyle bu sulardaki balıkları enfekte etme ihtimali yüksektir. Sulardaki mikroorganizmalar doğal olarak balıkların çeşitli organlarında yerleşip yaşayabilirler.

Salmonella ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu çeşitli gıda zehirlenmelerinin meydana geldiği bilinmektedir (3). Aynı şekilde iyi pişirilmemiş balıkların tüketimi veya bu balıkların işlenmesi esnasında enfeksiyonun insanlara bulaşması söz konusu olabilir.

Salmonella'ların teşhisinde rutin olarak kullanılan bakteriyolojik ve serolojik testler, uzun zaman alamları ve antijenik yakınlığı olan diğer türlerle krosreaksiyon vermelerinden dolayı önemli ölçüde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler, özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nın geliştirilmesi diğer pekçok mikroorganizmada olduğu gibi *Salmonella*'ların teşhisinde de ümit verici olmuştur. PCR ve bazı modifikasyonları, özellikle son birkaç yılda gerek saf ve karışık kültürlerde (24) ve gerekse yumurta (26), et (1) gibi gıdalarla gayta (5,11) gibi klinik materalardan *Salmonella* teşhisini için başarıyla uygulanmıştır. Balıklarda *Salmonella* teşhisinde PCR'nin kullanılmasına dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Salmonella bakterisi balıklarda, ilk olarak 1934 yılında Doğu Kanada kıyılarında yakalanan bir balıkta izole edilmiş (7), daha sonra çeşitli sularda ve bu sularda yaşayan balıklarda yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (13,20,27). Arıtılmış sularдан ve doğal baraj sularından yakalanan kedi balıklarında (*Clarias gariepinus*) yapılan bir çalışmada *Salmonellalar* her iki ortamda yaşayan balıklardan da izole edilmiştir (22). Gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss W*) yaşadığı göl sularında yapılan diğer bir araştırmada (8) su örneklerinde *Salmonella* bulunmasına rağmen göllerde yaşayan balıklardan *Salmonella* izolasyonu yapılamamıştır. Güney Asya ülkelerindeki balık çiftliklerinde yapılan bir çalışmada (21) balık havuzundan alınan balık, su ve sediment örneklerinin %28'inde, Mısır'da yapılan bir çalışmada (16) ise 93 balığın yüzeylerinden alınan numunelerin %3.2'sinde *Salmonella* izole edilmiştir.

Elazığ'da Keban Baraj gölünden ve Cip Balık Yetiştirme Tesisinden sağlanan balıklarda çeşitli mikroorganizmaların bulunma sıklığını saptamaya yönelik olarak yapılan incelemelerde balıkların barsaklarından %0.9 ile %1 oranında *Salmonella* izole edilmiştir (14,18).

Bu çalışmada Keban Baraj gölünün farklı bölgelerinden, Hazar gölünden, Cip balık üretim tesisi ile özel bir alabalık çiftliğinden temin edilen farklı türlerdeki balıklarda *Salmonella* türlerinin bulunma sıklığının saptanması amaçlandı.

MATERIAL VE METOT

Balıklar yakalandıktan hemen sonra bekletilmeden steril kaplar içerisinde F.U. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirildi ve aseptik koşullar altında balıklara ventral ensizyon uygulanarak abdomenleri açıldı. Bu balıkların barsak içeriklerinden zenginleştirme besi yerine ekimleri yapıldı.

Besi Yerleri

Bu çalışmada balıkların barsak içeriklerinden *Salmonella* izole edilmesi amacıyla zenginleştirme besi yerleri olarak Rappaport Vassiliadis Broth kullanıldı. Zenginleştirme sonrası selektif izolasyon amacıyla ise MacConkey, SS, Brilliant Green Phenol Red Agar besi yerleri kullanıldı (2).

İdentifikasiyon

İzolatların *Salmonella* yönünden identifikasiyonunda ise TSI agarda üreme, İndol, MR/VP, Üre, Lizin Dekarboksilaz, ONPG, Nitrat, Hareket, Oksidaz, Katalaz ve çeşitli karbonhidrat fermentasyon testleri uygulandı (2).

Selektif Izolasyon İşlemi

Tüplere 10 ml miktarlarında hazırlanmış olan Rappaport Vassiliadis Broth'a balıkların barsak içerikleri steril şartlarda ekildi. Besi yerleri 41.5 °C'de 48 saat inkube edildi. Bu sürenin sonunda sıvı besi yerinden SS, MacConkey, Brilliant Green Phenol Red Agar besi yerlerine ekimler yapıldı. Bu katı besi yerleri de 37°C'de 48 saat inkube edildikten sonra *Salmonella* üremesi yönünden incelendi.

Kullanılan besi yerlerinin *Salmonella*'ları selektif olarak izole edip etmeyeceğini kontrol etmek amacıyla referans *Salmonella typhimurium* ve kontaminant olarak *Escherichia coli* kültürleri ile deneme izolasyonları yapıldı. *Salmonella* bakterisi ve kontaminant kültür aynı anda Rappaport Vassiliadis Broth'a ekildi ve tüm diğer selektif zenginleştirme ve izolasyon basamakları uygulandı (2).

DNA Izolasyonu

Salmonella besi yerlerinde üreyen şüpheli örneklerden birkaç koloni alınarak 300 µl distile suda süspansiyon edildi. Bu süspansiyon, 56 °C'de 30-45 dak. inaktive edildikten sonra %2'lük sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 1 M NaOH karışımından 100 µl ve daha sonra da 50 µl Phosphate Buffer Solution (PBS) ilave edildi. Süspansiyon iyice vortekslandıktan sonra 30 dak. kaynatıldı ve soğumaya bırakıldı. Bu basamağı takiben,

1 M Tris-HCl'den 100 μ l ilave edildi ve süspansiyon tekrar karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 15 dak. süreyle santrifüje tabi tutuldu. Yaklaşık 300 μ l süpernatant alınarak başka bir eppendorfa aktarıldı ve üzerine eşit miktarda Tris-HCl ile sاتire edilmiş fenol ilave edildi. Bu süspansiyon 5 dak. elle çalkalandıktan sonra 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Üst kısım, fenollü kısma dokunmaksızın alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve bu basamaktan sonra sodyum asetat ve etanol ile presipitasyon işlemine geçildi. DNA süspansiyonuna 3 M sodyum asetat'tan 0.1 volüm ve saf

etanolden ise 2.5 volüm katılarak -20 °C'de 1.5 saat bekletildi. Daha sonra süspansiyon 13.000 rpm'de 10 dak. süreyle santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet sırasıyla 90% ve 70% lik etanol ile yıkandı. Her basamaktan sonra 5 dak. süreyle santrifüj uygulandı. Sonuçta elde edilen pelet kurutuldu ve 50 μ l distile suda süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan 5 μ l alınarak PCR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

Tablo 1: İncelenen balık türleri ve getirildikleri bölgeler.

Balık Türü	Keban Alabalık Çiftliği	Koçkale Keban Barajı	Aşağı İçme Keban Barajı	Sivrice Hazar Gölü	Çemişgezek Keban Barajı	Cip Balık Üretim Tesisi	Toplam
Alabalık <i>(Oncorhynchus mykiss)</i>	29	-	-	-	-	10	39
Tahta Balığı <i>(Acanthobrama marmid)</i>	-	10	7	-	20	-	37
Gümüş Balığı <i>(Chalcalbur smossulensis)</i>	-	15	6	-	-	-	21
Sıraz <i>(Capoetacapoeta umbra)</i>	-	-	-	17	-	-	17
Karabalık	-	-	-	-	-	-	13
<i>(Capoeta trutta)</i>	-	8	5	-	-	-	11
Aynalt Sazan <i>(Cyprinus carpio)</i>	-	-	-	1	-	10	11
Küpeli Balık <i>(Barbus capito pectoralis)</i>	-	5	-	-	-	-	5
Tathsu Kefali <i>(Leuciscus cephalus)</i>	-	2	-	-	-	-	2
Toplam	29	40	18	18	20	20	145

PCR

10xPCR buffer'ından (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) 5 μ l, deoksintrükotid trifosfatların (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin) herbirinden 250 μ M, 2 U Taq DNA polymerase enzimi (Promega), *Salmonella*'ların 16S rRNA geninden türetilen 16SF1 (5'-TGTTGTGGTTAATAACCGCA-3') ve 16SIII (5'-CACAAATCCATCTCTGGA-3') (Promega) primer çiftinin (10) herbirinden 10 pg ve 5 μ l hedef DNA olmak üzere toplam 50 μ l'lik volümde hazırlanan PCR karışımının üzeri 100 μ l mineral yağ ile kaplandı ve PCR reaksiyonu, touchdown thermocycler'da (Hybaid, İngiltere) gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu; denatürasyon için 95 °C'de 1 dak., hibridizasyon için 58°C'de 2 dak. ve sentez için 72°C'de 2 dak. olmak üzere 35 siklus halinde gerçekleştirildi. Son siklus takiben 72°C'de 5 dak.lik bir uzama basamağı tatbik edildi.

PCR'de amplifiye edilen DNA ürünleri, %1.5'luk agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu. Her numuneden 7 μ l alınarak 3 μ l blue-orange dye (loading solution) ile karıştırılarak kuyucuklara yerleştirildi. Jel, Tris-Borik

asit-EDTA (TBE) buffer'ı kullanılarak 60 voltta 1 saat süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforezi müteakip, jel ethidium bromide (0.5 μ g/ml) ile 45 dak. süreyle oda ısısında boyandı ve sonuçlar ultraviyolette değerlendirildi.

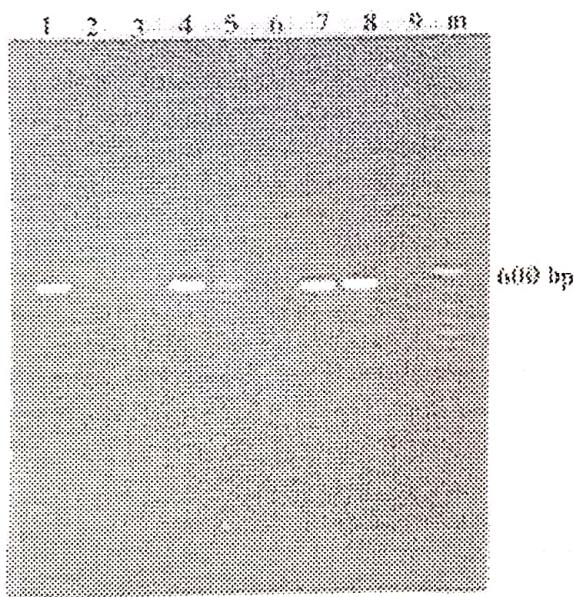
BULGULAR

Vasatların *Salmonella*'ları selektif olarak izole etmeyeceğini kontrol etmek amacıyla yapılan deneme izolasyonlarında, kullanılan tüm besi yerlerinden selektif olarak *Salmonella* bakterisi izole edildi.

Tablo 2: PCR'de pozitif olarak saptanan *Salmonella* şüpheli kolonilerin izole edildikleri balık türleri ve bu balıkların getirildikleri bölgeler.

Balık türü	Bölge
Karabalık (<i>C. trutta</i>)	Koçkale (Keban Barajı)
Gümüş balığı (<i>C. mossulensis</i>)	Aşağı İçme (Keban Barajı)
Alabalık (<i>O. mykiss</i>)	Cip Balık Üretim Tesisi
Alabalık (<i>O. mykiss</i>)	Cip Balık Üretim Tesisi
Sıraz (<i>C. umbra</i>)	Sivrice (Hazar Gölü)

Çalışmada incelenen toplam 145 numunenin Rappaport Vassiliadis Broth'da 48 saatlik selektif zenginleştirme sonrası, selektif vasatlarda beş numunede (%3.45) *Salmonella* şüphesiyle üremeler tespit edildi. Bu beş izolattan elde edilen DNA'ların PCR ile amplifikasyonu neticesinde hepsinin de *Salmonella* olduğu gözlendi. PCR ürünlerinin %1.5'luk agaroz jel elektroforezde değerlendirilmesinde numunelerin hepsinde 600 bp uzunluğunda bantların elde edildiği görüldü (Şekil 1). Gerek DNA izolasyonunda ve gerekse PCR'de kullanılan negatif kontrollerden ve *E. coli* DNA'sından amplifikasyonun gerçekleşmemesi, metodun herhangi bir aşamasında oluşabilecek muhtemel bir kontaminasyon ihtimalini ortadan kaldırıldı. Bu etkenlerin izole edildikleri balık türleri ve bu balıkların getirdikleri bölgeler Tablo 2'de verilmiştir. Bunların dışındaki hiçbir numunede zenginleştirme sonrası selektif vasatlarda *Salmonella* şüphesiyle üremeler tespit edilemedi.



Şekil 1. Balıkların iç organlarından selektif vasatlarda üreyen *Salmonella* şüpheli kolonilerden elde edilen DNA'ların PCR'de analizi sonucu oluşan 600 bp'lık bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış %1.5'luk bir agaroz jel. 1-5: Balıklardan elde edilen *Salmonella* şüpheli numuneler; 6. *E. coli*; 7,8: *S. enteritidis* referans kültür; 9: negatif kontrol; m: 100 bp'lık moleküller marker.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Salmonella'lar 2000'i aşkın serotipi ile (15) insan ve hayvan sağlığını çok yakından ilgilendiren oldukça önemli patojen mikroorganizmalarıdır. İnsan ve hayvanlarda enterik enfeksiyonlara neden olurlar ve gıda kaynaklı patojenlerin başında gelirler. Balık eti de protein kaynağı olarak oldukça sık tüketilen bir gıda

olup *Salmonella*'ların kontaminasyonuna açıktır. Özellikle kanalizasyon atıklarının boşaltıldığı sularda bu bakterinin bulunma ihtimali yüksektir. Toplum sağlığını çok yakından ilgilendiren bu bakterinin balıklarda varlığını araştırmak amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada Elazığ ve çevresindeki çeşitli su kaynaklarından temin edilen değişik türlere ait 145 balığın barsak içeriğlerinden selektif zenginleştirme方法u kullanılarak *Salmonella* izolasyonuna çalışıldı. İncelenen balıkların beş tanesinin (%3.45) barsaklarından *Salmonella* şüpheli koloniler saptandı. Bu kolonilerden izole edilen DNA'ların PCR ile analizinde beşinin de *Salmonella* bakterisine ait olduğu belirlendi. Metodun bütün aşamalarında negatif kontrollerin kullanılması ve bu kontrollerde herhangi bir amplifikasyonun gerçekleşmemesi metodun kontaminasyondan uzak olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada kullanılan *Salmonella*'ların 16S rRNA geninden türetilmiş olan 16SF1 ve 16SIII primerlerinin *Salmonella* cins spesifik olduğu ve yapılan spesifisite testlerinde *Salmonella* ile DNA benzerliği olan diğer mikroorganizmalarla kros-reaksiyon vermemediği bildirilmektedir (10).

Balıkların yakalandıkları bölgeler göz önüne alındığında bütün bölgelerin, özellikle balıkların çoğuluğunun yakalandığı Keban Baraj gölünün *Salmonella* kontaminasyonuna açık olduğu görülmüştür. Çünkü Elazığ şehir kanalizasyonu arıtma istasyonundan geçtiğinden sonra Keban Baraj gölüne akıtılmaktadır. Böylelikle kanalizasyon sularında bulunan çok sayıda patojen ve apatojen bakteri baraj sularına karışmaktadır. Bu arıtma işleminin suları bakterilerden ne oranda temizlediği konusunda kayda değer bir inceleme yapılmamıştır.

Elazığ'da önceki yıllarda yapılan iki çalışmada da balıkların barsaklarından *Salmonella* izole edilmesi, bu yöredeki suların *Salmonella* etkenleri ile kontamine olduğu fikrini desteklemektedir (14,18). Farklı zaman dilimlerinde gerçekleştirilen bu çalışmaların tümünde *Salmonella* izole edilmesi yönetimdeki suların *Salmonella*'larla kontaminasyonun devam ettiğini göstermektedir. Önceki yıllarda yapılan çalışmaların gerçekleştirildiği dönemlerde de şehir kanalizasyonun Baraj gölüne akıtıldığı biliniyordu.

PCR, son yıllarda geliştirilmiş DNA'nın in vitro olarak birkaç saat gibi çok kısa süre içerisinde çoğaltıması esasına dayanan bir teşhis metodudur (17). Bu metod gerek çabukluğu ve gerekse duyarlılığından dolayı özellikle izolasyonu zor ve zaman gerektiren ya da saf antijen yetersizliği nedeniyle serolojik testlerde kros-reaksiyonlara neden olan *Mycobacteria*'lar (23), *Mycoplasma*'lar (9) ve *Leptospira*'lar (25) gibi mikroorganizmaların teşhisinde büyük ölçüde kullanılmıştır.

Salmonella'lar her ne kadar çabuk çoğalan mikroorganizmalar olarak kabul edilseler de izolasyon ve identifikasiyonları oldukça zor ve zaman (en az 5-7 gün) gerektirmektedir. Klasik identifikasiyon testleri çok zahmetli olup, özellikle kültürler saf olmadığından hatalı sonuçlara neden olmaktadır. Bu nedenle geniş bir aile olan Enterobacteriaceae familyasındaki diğer bakterilerle çok sıkılıkla karıştırılabilirler. *Salmonella*'ların identifikasiyonunda klasik biyokimyasal testlerin yanı sıra spesifik antiserumlarla oldukça kısa sürede sonuç alınmaktadır. Ancak serolojik testlerde de kros reaksiyonlar olabilmekte ve bazı genetik benzerliği olan *E. coli* gibi mikroorganizmalarla hatalı sonuçlar verebilmektedir (12). PCR'de *Salmonella*'lara spesifik primerlerin kullanılması ve çok küçük miktarlardaki mikroorganizmaların bile saptanabilmesi bu dezavantajları ortadan kaldırılmaktadır. PCR'de ortamda kontaminant bakterilerin olması durumunda bile sadece hedef bakteri DNA'sı çoğalacağından, kontamine numelerle çalışılması sorun olmadığı bilinmektedir. Saf ya da karışık kültürlerde uygulandığı zaman bir gün gibi kısa bir sürede sonuç alındığı göz önünde tutulursa, PCR'nin diğer klasik identifikasiyon testlerine göre daha kısa sürede sonuç verdiği ve güvenilir olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aabo, S., Andersen, J.K. and Olsen, J.E. Research Note: Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. Lett. Appl. Microbiol., 1995; 21, 180-182.
2. Bekar, M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmalarının genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 1995, Ankara.
3. Bilgehan, H. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 1983, İzmir.
4. Cano, R.J., Rasmussen, S.R., Fraga, G.S. and Palomares, J.C. Fluorescent detection-polymerase chain reaction (FD-PCR) assay on microwell plates as a screening test for salmonellas in foods. J. Appl. Bacteriol., 1993; 75, 247-253.
5. Cohen, N.D., McGruder, E.D., Neibergs, H.L., Behle, R.W., Wallis, D.E. and Hargis, B.M. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. Poultry Science, 1994; 73: 2,354-357.
6. Fluit, A.C., Widjojoatmodjo, M.N., Box, A.T.A., Torensma, R. and Verhoef, J. Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic immunopolymerase chain reaction assay, Appl. Environmental Microbiol., 1993; 59, 1342-1346.
7. Gibbons, N.E. The Slime and intestinal flora of some marine fishes. Contrib. Can. Biol. Fish. 1934; 8: 225-290.
8. Gonzalez, C.J., Perez Cardenal, D., Prieto, M., Otero, A. and Garcia-Lopez, M.L. Microbiological quality of fresh rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) and microbial evolution during its chill storage. Actas Del IV Congreso Nacional de Acuicultura, 1993; 563-568.
9. Hotzel, H., Sachse, K. and Pfutzner, H. Rapid Detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol. 1996; 80: 5, 505-510
10. Lin, C.K and Tsen, H.Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. J. App. Bacteriol. 1996; 80, 659-666.
11. Mahon, J. and Lax, A.J. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of Salmonellas Carrying the *spvR* Gene. Epidemiol. Infect., 1993; 445-464
12. Mizuno, T., Chou, M.Y. and Inouye, M. A comparative study on the genes of three porins of the *Escherichia coli*

- outer membrane: DNA Sequence of the osmoregulated *ompC* gene. J. Biol. Chem. 1983; 258, 6932-6940.
13. Morse, E.V., Duncan, M.A. and Myhrom, E.P. *Salmonella* serotypes isolated from the aquatic environment Wabash River, Indiana, (1973-1976). Am. J.Vet.Res. 1978; 39: 717-719.
 14. Muz, A., Sarıeyyüpoğlu, M., Ertaş, H.B., Şimşek, A. Keban baraj gölünden yakalanan bazı balıkların çeşitli organlarının aerobik ve mikroaerobülik bakteriler yönünden incelenmesi. F.Ü. Sağlık Bil. Derg. 1995; 9, 2: 212-220.
 15. Pelzer, K.D. Salmonellosis. J. Vet. Med. Assoc. 1989; 195(4), 456-463.
 16. Reda, W.W. Studies on fish as a source of some occupational infections. Vet.Med.J.Giza.1993; 41, 3:13-16.
 17. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, 239, 487-491.
 18. Sarıeyyüpoğlu, M. Gökkuşağı alabalıklarında (*S.gairdneri*) mide barsak bakteriyel florاسının aerobik, yönden incelenmesi. Doğa Bilim Derg. Seri D, 1984; 18, 3: 281-287.
 19. Skjerve, E. and Olsvik, Ø. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. Int. J. Food Microbiol. 1991; 14, 11-18
 20. Souter, B.W., Sonstegaurd, R.A and McDermott, L.A. Enteric bacteria in carp (*Cyprinus carpio*) and white sucker (*Catostoma commersoni*). J.Fish.Res.Board Can. 1972; 33:1401-1402.
 21. Twiddy, D.R. Antibiotic-resistant human pathogens in integrated fish farms. Asean Food Journal. 1995; 10.1: 22-29.
 22. Van der Heever, D.J. and Frey, B.J. Microbiological quality of the catfish (*Clarias gariepinus*) kept in treated waste water and natural dam water. Water S.A. 1994; 20, 2:113-118.
 23. Wards, B.J., Collins, D.M., Lisle, G.W., and De-Lisle, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 1995; 2-3, 227-240.
 24. Widjojoatmodjo, M.N., Fluit, A.C., Torensma, R., Kelller, B.H.I. and Verhoef, J. Evaluation of a magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. European J. Clin. Microbiol. and Infect. Diseases, 1991; 10, 935-938
 25. Woodward, M.J. and Kirwan, S.E.S. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the Polymerase Chain Reaction. Vet.Rec. 1996; 138, 411-413.
 26. Woodward, M.J. and Redstone, J.S. Differentiation of *Leptospira* serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Vet.Rec. 1993; 132:13, 325-326
 27. Wyatt, L.E., Nickolson, R. and VanderZant, C. Occurrence and control of *Salmonella* in freshwater catfish. J. Food Sci. 1979; 44:1067-1073.