GİRİŞ

Salmonella enterica subsp. enterica serovarları dünyada ve Türkiye'de kanatlıların (1-8) en önemli bakteriyel infeksiyonlarından birkaçını oluşturur. İnsanlar için ise, gıda kökenli bakteriyel infeksiyonların en önemlilerinden biridir (9-13). Kanatlılardaki kontrol programlarının ana hedeflerinden biri de insan *Salmonella* infeksiyonlarının sıklığını azaltmaktır (14). Salmonellaların vertikal yolla anaç tavuklardan civcivlere bulaşması, damızlık düzeyinde bir koruma ve kontrol programının geliştirilmesini ve uygulanmasını zorunlu hale getirmiştir (15-21). *Salmonella* infeksiyonlarının etiyolojilerinin özellikleri, klinik hastalık formları, patolojileri, immüniteleri gibi konulara ait literatür bilgisi klasik kitaplarda, derlemelerde ve makalelerde verildiği için (15, 18, 22-38), burada kısaca değinilecek, konuyla ilgili bilgilerle sınırlı kalınmaya çalışılacaktır.

Tavuklardaki *Salmonella* serovarları "konakçı bağımlı" ve "konakçı bağımsız" olmak üzere iki gruba ayrılır. *S*. Gallinarum (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum) ve *S*. Pullorum konakçı bağımlı serovarları temsil ederlerken, *S*. Enteritidis, *S*. Typhimurium, *S.* Agona ve *S.* Seftenberg gibi diğer yaklaşık 200 serovar "konakçı bağımsız" veya "paratifo" grubu olarak anılırlar. "Konakçı bağımlı" salmonellalar tavuklarda akut sistemik ve kronik hastalık tablolarına neden olurlar ve infekte tavuklar bu bakterileri döllerine vertikal olarak aktarırlar (16). Ulusal düzeyde, hemen hemen bütün ülkeler bu "konakçı bağımlı" serovarlara karşı serolojik ve bakteriyolojik temele oturtulmuş kendi koruma kontrol programlarını geliştirmişler ve eğer sıkı ve uygun bir biçimde uyguladıklarında, bu programların damızlık sürülerde "konakçı bağımlı" serovarları oldukça önemli bir biçimde azalttığını, hatta tamamen yok ettiğini belirlemişlerdir (16, 17).

"Konakçı bağımsız" *Salmonella* serovarları genellikle tavukların sindirim kanalına yerleşirler ve ancak yoğun stres şartları altında akut sistemik hastalık olgularına neden olurlar (18). Bu serovarlar genellikle tavuklarda sindirim kanalı infeksiyonlarını oluştururlar ve yumurtayı bulaştırarak yumurta-kökenli (18, 39, 40), kesim sırasında çapraz bulaşık (karkastan karkasa) veya kesim sonrası (ürünün hazırlanması) sürecinde kontamine, uygun pişirilmemiş tavuk eti kökenli gıda zehirlenmelerinde birincil etkendir (41-43). "Konakçı bağımsız" serovarlara karşı oluşturulan tarama metodlarının temeli ise etkenin bakteriyolojik identifikasyonunu gerektirmektedir.

Salmonella infeksiyonlarının sadece tavuklara özgü serovarlarla mücadele anlamında

kalamayacağı, insanlara bulaşan birçok serovarla da etkin bir şekilde uğraşmanın gerekliliği ortadadır.

Kanatlı hayvan ve ürünlerini kapsayan bir üretim zincirini barındıran kanatlı sektöründe, "konakçı bağımlı" ve "konakçı bağımsız" *Salmonella* infeksiyonlarından korunma ancak çok iyi tarama (screening) ve izleme (monitoring) programları ile başarılabilir (19-21). Bu programların temelini, çabuk lam aglutinasyon ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gibi serolojik yöntemler ile bakteriyolojik metodlar oluşturmaktadır (44, 45). Serolojik testlerin özgünlüklerinin azlığı nedeniyle, ancak birincil tarama testleri durumundadır ve sero-pozitif sürünün bakteriyolojik olarak teyit edilmesi gerekir. Diğer taraftan bakteriyolojik yöntemlerle *Salmonella* taraması 5-11 gün arasında bir zaman gerektirmektedir (19-21). Bu süre hızlı bir biçimde kontrol önlemleri almak veya sürü hakkında karar vermek için bekleyen yetiştiriciler açısından veya satışa çıkarılacak kanatlı ürünlerinin sağlıklılığının denetlenmesi açısından gıda sektörü için oldukça uzun bir süreçtir. Ayrıca, genellikle *Salmonella* ile subklinik infekte tavuklardan alınan örneklerden ve belirli işleme süreçlerine tabii tutulan kanatlı etlerinden *Salmonella* izolasyonu zor olabilir. Bunun nedenleri arasında; *Salmonella* sayısının azlığı ve yarışmacı mikrofloranın yoğunluğu ve gıdalarda depolama süreçlerinde zarar görmüş *Salmonella* hücrelerinin varlığı sayılabilir.

Tanı süresinin kısaltılması, özgünlüğün arttırılması ve duyarlılığın yükseltilmesine yönelik birçok test geliştirilmiştir. Diğer birçok infeksiyöz etkenin tanısında kullanım alanı bulmuş bir metot olan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu; Polymerase Chain Reaction), *Salmonella* identifikasyonu ve taraması yöntemlerinin içinde duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek ve tanı zamanını kısaltan bir test olarak tanımlanmıştır. *Salmonella* PCR'u ile ilgili çalışmalarda, *Salmonella* DNA'sının hedef bölgeleri olarak *rfb* geni (46), *Ori*C geni; origin of replication (replikasyon başlangıç bölgesi) (47), *inv*A geni (invazyon A geninin bir bölgesi) (48), *spv*R-geni (*Salmonella* virulence plasmid genleri) (49), *iro*B genes (Fur-regulated gene) (50), *Omp*C geni (outer membrane proteini) (51), *fli*C geni (52), *sef*A geni (53) gibi birçok bölgesi amplifiye edilmiştir.

Salmonella PCR'ın öncesinde insan dışkısı (46, 54), hayvan dışkısı (55, 56) ve gıda örneklerinin (57-59) bir ön ve/veya birincil zenginleştirme broth'u içinde, uygun bir biçimde inkübasyonunun testin duyarlılığını ve özgünlüğünü arttırdığı ortaya koyulmuştur ve bunun etkisinin ortamdaki canlı *Salmonella* sayısını attırmak ve örnek içinde olası bulunacak PCR inhibitörlerini seyreltmek olduğu açıklanmıştır.

Bu çalışmada, tavuk ve hindi etlerinde, standart bir bakteriyolojik yöntem ve air-thermal cycler kullanımı ile uygulanan bir kapiller PCR ile *Salmonella* varlığı karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

Salmonella genusu şu anda yaklaşık 2500 *Salmonella* serovarını kapsamaktadır ve bunların birçoğu tek bir tür altında toplanmıştır (60). *Salmonella* genusu konakçı özgünlüğüne göre iki ana gruba ayrılır. Birinci grupta, kanatlılarla ilgili olarak "konakçı bağımlı" serovarlar olan *S*. Gallinarum (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum) ve *S*. Pullorum (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum) mononükleer fagositik sistemi etkileyerek sistemik infeksiyonlara neden olurlar (15). İkinci grubu ise "konakçı bağımsız" (Paratifo grubu) diye anılan "Paratifo infeksiyonları"nın etkenleri olan serovarlar oluşturur (18, 61).

Paratifo grubu salmonellalar insan, memeli, kuş, sürüngen, böcekler olmak üzere çok geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir (18, 22). Dolayısıyla özellikle bazı hayvan türleri başta olmak üzere türler arası bulaşma potansiyeline sahip olup; zoonotiktirler (62, 63). Bunlardan sadece yaklaşık 200 kadarı kanatlı hayvan türleri ile ilgilidir. Kanatlılar, insanlarda infeksiyona neden olan salmonellaların en önemli rezervuarları olarak belirlenmiştir (64-67). Tavuklar ve hindiler birçok *Salmonella* serovarına duyarlı olmasına rağmen, infeksiyonun oluşumunda hayvanın yaşı, infekte edici doz ve predispoze edici faktörler, infeksiyonu oluşturan serovardan daha önemlidir. Paratifo grubu salmonellalar birçok farklı yolla kanatlı sürüleri içerisine girebilir ve farklı farklı mekanizmalarla sürü içinde ve sürüler arasında kolaylıkla yayılabilir (18, 61).

Paratifo grubu salmonellaların hem vertikal hem de horizontal bulaşma göstermeleri ve sindirim sistemine kolonize olup genellikle hastalık belirtisi göstermeksizin dışkı ile saçılmaları sonucu kesimhanelerde kesim sırasında ve kanatlı etlerinin işlenme sürecinde karkasların kontamine olma riski, kanatlı etlerinin uygun olmayan koşullarda pişirilmesi sonucu gıda zincirine katılan salmonelların insanlarda gıda zehirlenmelerine neden olmaları halk sağlığı açısından büyük bir risk faktörüdür (66, 67).

Paratifo etkenleri "konakçı bağımlı" olmadıklarından ve konakçıları onları hiçbir hastalık belirtisi göstermeksizin dışkı ile etrafa saçtıklarından, "konakçı bağımlı" olan salmonellalara göre epidemiyolojileri daha komplekstir. Bir günlük civicivlerin infekte anaç sürülerinden vertikal bulaşma sonucu *Salmonella* ile infekte olmaları temel risk faktörlerinden biridir (68). Vertikal bulaşma, yumurtanın internal ve/veya eksternal kontaminasyonu sonucu şekillenir. Kuluçkahaneler, iki nedenle kümeslerde *Salmonella* kontaminasyonun temel kaynaklarından biri durumundadır. Birincisi, kuluçkahane

*Salmonell*a için iyi bir rezervuardır. Bu durumu destekleyen iki raporu örnek verebiliriz. Cox ve arkadaşları (69), kuluçka örneklerinin yaklaşık % 75'inin *Salmonella* ile kontamine olduğunu rapor etmiştir. Jones ve arkadaşları (70), 1 günlük civcivlerin % 5-9'unun kuluçka kaynaklı olarak *Salmonella*-pozitif olduğunu bulmuştur. İkinci neden, kuluçkadan yeni çıkan civcivlerin ergin kanatlılardan daha fazla *Salmonella* kolonizasyonuna duyarlı olmasıdır. Artan yaşla birlikte, ergin kanatlılar, olgunlaşan barsak mikroflorası nedeniyle *Salmonella*'nın intestinal kolonizasyonuna daha dirençlidir. Vertikal bulaşmanın yanısıra kümes içinde horizontal bulaşmanın da çok kolayca şekillendiği bilinmektedir. İnfekte rodentler bu yatay bulaşmada çok önemli rol oynar (18, 71). Hayvansal proteinleri içeren özellikle peletlenmemiş yemlerle beslenme, daha önce *Salmonella* infeksiyonu geçirilen bir kümese günlük civcivlerin yerleştirilmesi, kontamine alet ve ekipman, kümeslere kontrolsüz girişler, kümes çalışanları, *Salmonella* ile kontamine içme suları ve sıcak mevsimler *Salmonella*'nın yaygın bulaşımında etkin faktörlerdir. Salmonellaların uygun çevresel koşullarda uzun süre infektif kalması sürü içinde ve sürüler arasında infeksiyonun bulaşmasına olanak verdiği için epidemiyolojik açıdan önemlidir (18).

Kanatlı et ürünleri, gıda kökenli insan salmonellozisinin en önemli kaynaklarından biridir. İnfekte bir sürünün kesimi veya kesimden önce hayvanların bekletildiği seksiyonların kontaminasyonu, kesim esnasında çapraz karkas kontaminasyonu ve/veya kesim sonrası karkasların taşındığı sandıkların *Salmonella* kontaminasyonu, işleme, depolama ve marketlerde pazarlama aşamasında hijyen kurallarına uyulmaması, kanatlı et ürünlerinde ürün bazında kontaminasyonunun nedenleridir (18, 72, 73).

Salmonella serovarlarının prevalans ve insidensleri farklı coğrafi bölgelerde değişiklik göstermekle birlikte (74-76), bir bölgede farklı zamanlarda serovar tipleri değişik grafik çizmektedir (1, 2). Dünyada bazı ülkelerde değişik zaman kesitlerinde kanatlı sürülerinde *Salmonella* serovarlarının durumu ile ilgili bazı bilgiler verilmektedir (1-4, 75-78). Bu bilgiler, ülkemizde zaman sürecinde değişen serovar tablosu ile karşılaştırılınca epidemiyolojik açıdan önemli olabileceği gibi, belki de *Salmonella* korunma pratikleri ile ilgili alınacak kararlara da yardımcı olacaktır. Ülkeler arasındaki serovar dağılımı ve prevalanslar arasındaki bu farklılıklar ülkelerin farklı coğrafi alanlarda yer alması başta olmak üzere, geçmişte sorun olan serovarlara karşı gerçekleştirmiş oldukları koruma kontrol programları gibi nedenlere bağlı olabilir.

Ülkemizde tavukçuluk yetiştirmelerinde kronolojik olarak yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde, her ne kadar bunlar *Salmonella* serovar taşıyıcılığı üzerine net bilgiler

vermemekteyseler de, yapıldıkları döneme ait *Salmonell*a serovar varlıklarını tanımlayıcı nitelikte oldukları görülmektedir. Ülkemizde, 1989 yılında Bursa bölgesinde Çarlı (5), hastalıklı tavuk dışkılarında toplam 197 *Salmonella* suşu izole etmiş, 186'sını *S.* Gallinarum, 7'sini *S.* Typhimurium, 2'şer adedini *S.* Pullorum ve *S.* Infantis olarak rapor etmiştir. Daha sonra 1995 yılında yapılan iki farklı *Salmonella* izolasyon çalışması bulunmaktadır. Bunlardan ilkinde Özdemir (6), Bandırma ve Bursa bölgelerinde incelediği *Salmonella* infeksiyonundan şüpheli 24 ticari yumurtacı işletmenin 21'inden, 7 broyler işletmesinin ise 2'sinde izolasyon yapmış; izole edilen suşları yumurtacılarda 13'ünün *S.* Gallinarum, 5'inin *S.* Enteritidis ve 3'ünün *S.* Typhimurium, broylerlerde ise 1'inin *S.* Enteritidis ve 1'inin *S.* Gallinarum olduğunu rapor etmiştir. Goncagül ve Çarlı (7), Bursa, İstanbul, İzmir bölgelerinde sağlıklı damızlık, ticari yumurtacı ve broyler olmak üzere toplam 50 işletmeden 7 adet *S.* Typhimurium, 6 adet *S.* Enteritidis ve 5 adet *S.* Gallinarum izole etmişlerdir. 1996 yılında Çarlı ve arkadaşları (8), 22 haftalık yumurtacı bir tavuk sürüsünden *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Essen'i birlikte, aynı hayvandan izole etmişlerdir. 2001 yılında Çarlı ve arkadaşları (79), 28 broyler ve 5 yumurtacı sürüden kesim hattı sürecinde alınan 814 sekumun 151 (% 18.6) adedinin 4 farklı *Salmonella* serovarı ile kontamine olduğu bulmuşlardır. Araştırmacılar, broilerlerden *S.* Enteritidis (% 81.5), *S.* Agona (% 7.6), *S.* Thompson (% 10.1), and *S.* Sarajane (% 0.8) izole ettiklerini, *S.* Enteritidis'i sadece yumutacı tavuklarda tespit edebildiklerini bildirmişlerdir. 1989 ve 1995 yıllarında yapılan çalışmalarda da aynı serovar profilinin gözlendiği ve bazı yeni serovarların bu profile eklendiği dikkati çekmektedir.

Gıda üretimi amacıyla yetiştirilen hayvanlar, özellikle kanatlılar ve kanatlı ürünleri, insanlarda *Salmonella* nedenli infeksiyonların temel kaynağı olarak kabul edildikleri için kanatlı ürünlerinin *Salmonella* ile kontaminasyonu, sadece yerel bir halk sağlığı problemi değil, kanatlı ve bunların yan ürünlerinin ihracatıyla uluslararası bir problem haline gelmiştir. *Salmonella* prevalanslarının belirlenmesi epidemiyolojik açıdan önemli olduğu gibi, aynı zamanda o ülkede veya bölgede alınacak kontrol ve koruma önlemlerine ışık tutucu olacaktır. Aşağıda dünyada bazı ülkelerde değişik zaman kesitlerinde satışa sunulan tavuk ve hindi etlerinde *Salmonella* serovarlarının durumu ile ilgili bazı bilgiler verilmektedir. *Salmonella* sıklıkları (prevalans ve insidens) oranı, çalışmanın yapıldığı ülkeye, örnekleme planına ve metodun saptama limitine bağlı olarak ülkeden ülkeye % 0-% 100 arası farklılık göstermektedir.

Dujkeren ve arkadaşları (80), 1984-2001 arasında Hollanda'da, insan ve hayvanlardan

izole edilen *Salmonella* suşlarının serotip ve faj tiplerini belirlemek için yaptıkları araştırmada, insanlardaki predominant serotipleri; *S*. Typhimurium (% 44), *S*. Enteritidis (% 24) olarak belirlerken tavuklarda; *S*. Enteritidis (% 12), *S*. Infantis (% 14), *S*. Typhimurium'u (% 18) predominant serotipler olarak bildirmişlerdir. *S*. Enteritidis PT4'ün tavuk ve insanlarda en sık ratlanan faj tip olduğu rapor edilmiştir. 1984-1989 arasındaki periyotta insanlarda en çok rastlanan serovarlar; *S*. Typhimurium (% 57.2), *S*. Enteritidis (% 5.4), *S*. Panama (% 4.7), *S*. Virchow (% 4.3)'dur. 1990-1995 arasında % 38.8'le *S*. Enteritidis, % 33.1'le *S*. Typhimurium, % 4.7 ile *S*. Virchow predominant serovarlar olarak bulunmuştur. 1999- 2001 periyodunda *S*. Enteritidis (% 43.6), *S*. Typhimurium (% 32), % 1.8'le *S*. Infantis ve *S*. Hadar'ın predominantlığı rapor edilmiştir. 1984-1989'da tavuklarda, *S*. Typhimurium (% 26.1), *S*. Infantis (% 17.8), *S*. Virchow (% 11.1) predominant serovarlarken, *S*. Enteritidis'in izolasyon oranı % 5.5'dir. 1990-1995 arasındaki periyotta ise; % 16 *S*. Hadar, % 15 *S*. Enteritidis, % 14.3 *S*. Typhimurum, % 11.4 *S*. Virchow tavuklardan sıklıkla izole edilen serovarlardır. 1996-2001yılları arasında *S*. Enteritidis (% 20.3), *Salmonella* Paratyphi B var. Java (% 14.8), *S*. Infantis (% 12.8) predominantlığı belirlenmiştir. Her 5 yıllık 3 zaman diliminde *S*. Typhimurium'un azalan ve *S*. Enteritidis'in artan prevalansı tavuk ve insanlarda doğru orantılıdır. Araştırmacılar, *S*. Typhimurium PT 150'deki düşüşün tavuk ve insanlarda aynı zaman periyotlarına denk geldiğini rapor etmişlerdir. İnsanlarda izole edilen *S*. Enteritidis faj tipleri ve oranları sırasıyla, PT4 (% 65), PT21 (% 5.9), PT28 (% 5.9), PT1 (% 5.1), PT6 (% 4.5) iken, tavuklarda sıralama; PT4 (% 57.9), PT21 (% 8.1), PT28 (% 3.5), PT6 (% 3.4), PT1 (% 2.9)'dir. Hollanda'da pek çok salmonellosis vakasının gıda orijinli olduğunu belirten araştırmacılar, ülkeye ithalatı yapılan hayvansal gıda ürünleri ve hayvanların da insan salmonellosis vakalarının %10'unda sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle *S*. Enteritidis izolasyon oranındaki artışın, tavuk ithalatı bağlamında Avrupa ve Amerika'da tavuk ve tavuk ürünlerinin neden olduğu insan salmonellosis vakalarından sonraki birkaç yıl içinde Hollanda'da gözlendiğinin üzerinde durmuşlardır. Beli ve arkadaşları (81), Arnavutluk'ta 1996-1998 arasındaki 3 yıllık periyotta, 4 farklı serogrup ve 9 serotipe ait toplam 31 adet *Salmonella* spp.'yi, inceledikleri 461 tavuk eti örneğinin 30'unda (% 6.5) izole ettiklerini bildirmişlerdir. Otuz *Salmonella* pozitif örneğin % 53.3'den *S*. Enteritidis en fazla izole edilen serovar olmuştur. İzole edilen diğer serotipler; *S*. Seftenberg (3 izolat), *S*. Newport (2 izolat) ve 1'er izolat *S*. Abony, *S*. Agona, *S*. Banana, *S*. Brancaster, *S*. Infantis, *S*. Oslo'dur. Diğer 4 *Salmonella* suşu ise tiplendirilememiştir. İspanya'da

kanatlı ürünlerinde *Salmonella* prevalansını belirlemek için, Capita ve arkadaşları (82)'nın yaptıkları çalışmada, süpermarket ve perakende tavuk satan dükkanlardan toplanan örneklerde [tavuk karkasları (kanat, but, sakatat-karaciğer ve kalp) ve işlenmiş tavuk ürünleri (kırmızı sosis, beyaz sosis ve hamburger)] *Salmonella* prevalansı belirlenmiştir. Derili tavuk karkaslarından % 55'lik yüksek bir oranla ve karkaslarla kıyaslandığında % 20'lik daha düşük bir oranla hamburgerlerden, % 49 gibi yüksek bir yüzde ile incelenen tüm örneklerden *Salmonella* izole edildiği rapor edilmiştir. Süper marketlerden toplanan tavuk karkaslarında *Salmonella* kontaminasyon oranı (% 75), perakende tavuk satan dükkanlardakine (% 25) göre daha yüksek bulunmuştur. *S*. Enteritidis, *S*. Poona, *S*. Paratyphi B ve *S*. Worthington'un, incelenen örneklerdeki izolasyon oranları sırasıyla % 34.3, % 11.4, %2.8, ve % 1.4'dür. Bir kırmızı sosis örneğinin ise, *S*. Enteritidis ve *S*. Worthington olmak üzere 2 serotipi birden içerdiği tespit edilmiştir. Tayland'da 1997 yılında Boonmar ve arkadaşları (83)'nın, *Salmonella* prevalansını belirlemek için yaptıkları çalışmada, Bangkok'ta perakende tavuk eti satan 10 adet dükkandan toplanan 100 tavuk eti örneğinin 72'sinden, ihracat yapan 1 kesimhaneden alınan 200 tavuk etinin 20'sinden ve Tayland'ın doğusunda yer alan 3 çiftlikten toplanan 285 tavuk dışkısının 19'undan izole edilen 22 farklı *Salmonella* serovarı içinden, perakende satılan tavuk etlerinin % 28'inde, kesimhaneden toplanan tavuk etlerinin % 4.5'inde ve tavuk dışkılarının % 6.6'sında, *S*. Enteritidis predominant serovar olarak belirlenmiştir. Perakende satış yapılan yerlerde ikinci sırada en fazla izole edilen serovar *S*. Muenchen olmuştur. Bunu *S*. Blockley ve *S*. Montevideo izlerken, süpermarketlerden *S*. Anatum, kesimhanelerden *S*. Hadar izole edilmiştir. *S*. Enteritidis 1 günlük civcivlerden alınan 15 fekal örneğin 11'inden (% 73.3) ve 30 günlük civcivden alınan 270 örneğin 8'inden (% 3.0) izole edilirken, pelet yem, içme suyu, altlık gibi çevresel örneklerde bu serovara rastlanmadığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar perakende tavuk eti satan dükkanlardaki *Salmonella* kontaminasyon oranının, kesimhanedeki kontaminasyondan yüksek olmasını kesimhanelerde işleme sürecinde kullanılan ekipmana ilaveten perakende satış yerlerinde kontamine aletlerin kullanılmasına bağlamışlardır. Bir günlük civcivlerin dışkılarında % 73.3 oranında *S*. Enteritidis'e rastladıklarını ve civicivler kümese sokulmadan önce alınan çevresel örneklerde bu serovarın tespit edilmediğini bildirirken, civcivlerin parentlerinden vertikal yolla infekte oldukları yorumuna gitmişlerdir. Otuz günlük civcivlerden alınan dışkı örneklerinde *S*. Enteritidis izolasyon oranının düşmesi, içme suyuna katılan amoxycilline'e bağlanmaktadır. Çiftliklerden toplanan tavuk dışkılarında *S*. Enteritidis izole edilmesi, *S*.

Enteritidis ile tavuk etlerinin kontaminasyonunun kesimhanelerdeki aletlerin intestinal içerik ile bulaşmasıyla ilgili olduğunu düşünmüşlerdir. Skai ve arkadaşları (84), 1989-1993 yılları boyunca WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'dan ve Tayland Sağlık Bakanlığı, Tıp Bilimleri Departmanı, Klinik Patoloji Bölümü'nden *Salmonella* serotiplerine ait verilerin analizleri sonucunda, *S*. Enteritidis'in 1990'dan beri dramatik bir artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. 1972-1989 arasında rapor edilen tüm *Salmonella* izolatları içinde insanlardan izole edilen *S*. Enteritidis izolatlarının % 0.70±% 0.41iken, 1990 yılında % 1.33 ve ardı sıra gelen 3 yıl boyunca sırasıyla, % 2.98, % 9.54, % 16.98 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, aynı zaman periyotları arasında tavuk eti örneklerinde de insanlardaki izolasyon oranına benzer sonuçlara rastlamışlardır. 1990'dan önce tüm tavuk eti örnekleri, insan gıdası içinde ayrım yapılmaksızın değerlendirildiğinden dolayı bu dönemle ilgili kesin veriler bulunmamakla birlikte, tavuk etlerinden izole edilen *S*. Enteritidis izolatları 1990'da % 1.40 iken, 1991-1993 arasında yıllara göre izolasyon oranının sırasıyla; % 5.28, % 11.27, % 16.75 gibi göze çarpan bir artışla seyrettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, tavuk ve insan *S*. Enteritidis izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkinin, faj tiplendirme ve diğer *Salmonella* tiplendirme metodları ile kanıtlanması gerekliliği sonucuna varmışlardır. Boonmar ve arkadaşları (85) tarafından, Tayland'da 1990-1997 yılları arasında *S*. Enteritidis faj tiplerini ve bu serovarın neden olduğu insan infeksiyonlarında potansiyel kaynağı açığa çıkarmak için toplanan, kanatlı, insan ve tavuk eti izolatlarının faj tiplendirilmesi yapılmış ve PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ile analiz edilmişlerdir. Faj tiplendirmesi yapılan 302 izolat içinde 10 farklı faj tip belirlenmiş ve insanlarda % 73.9'la, kanatlılarda % 76.2 en sık rastlanan faj tipin; PT4 olduğu bulunmuştur. İnsan izolatlarında bunu % 80'le PT1, % 3.6'yla PT8 ve % 2.2 ile PT7a izlerken, kanatlılarda PT4'ü sırasıyla PT7a (% 4.9), PT1 (% 3.7), PT12 (% 2.4) izlemektedir. PFGE ile analiz edilen 53 izoltın 45'i birbirinden ayırt edilemeyen patternler sergilediği, 8 izolatın ise sadece birkaç bantta farklılıkla birbirine çok benzer patternler oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, PFGE sonuçlarına göre, Tayland'da insan ve kanatlı izolatları arasında çoğunlukla genetik olarak identikal klonların saçıldığını ortaya koymuştur. İspanya'da 1999 yılı Şubat-Ekim ayları arasında Dominquez ve arkadaşları (86) yaptıkları araştırmada, 198 tavuk eti örneğinde *Campylobacter* ve *Salmonella* prevalansını belirlemişlerdir. Muayene edilen 198 örneğin; 71'inde (% 35.83) *Salmonella* izole edilmiş, predominant serovarlar; % 47.88 ile *S*. Enteritidis, % 25.35 ile *S*. Hadar ve % 19.71 ile serotip 4,12:b:-(II) olarak belirlenmiştir. *S*. Mbandaka, *S*. Derby, *S*.

Virchow ve *S*. Paratyphi B gibi diğer serovarlar ise çok düşük oranlarda izole edilmiştir. İncelenen örneklerde termofilik Campylobacterleri % 49.5 oranında tespit ettiklerini bildirirken, aynı araştırmacılar, yaptıkları faj tiplendirmede ise; *S*. Enteritidis izolatlarının % 58.82'sini (20 adet) faj tip 4'e, % 26.47'sini (9 adet) faj tip 6a'ya, % 14.70'ini (5 adet) faj tip 7'ye ait olduğunu bulmuşlardır. İspanya'da salmonellosise en çok neden olan faj tip; faj tip 4 olarak rapor edilmiştir. Brezilya'da 1995-1997 yılları arasındaki 2 yıllık süreçte Nunes ve arkadaşları (87), yumurta ürünlerinin tüketimi ile ilişkili insan gastroenteritis salgınlarından izole edilen *Salmonella* suşlarından, hasta tavuklardan, kanatlı etlerinden, broiler tavukların embryolarından, et yemeklerinden, kanatlı yetiştirilen yerlerdeki çevresel örneklerden, mayonez, peynir ve kek gibi birçok gıdadan, *S*. Enteritidis faj tiplerini belirlemek için aldıkları örneklerde, *S*. Enteritidis suşunu izole ederken, en sık görülen faj tipi PT4 olarak tespit etmişler ve bunu sırasıyla PT7, 21, 35, 6, 4a, 8, 30, 6a, 5a, 1 ve 1b'nin izlediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, direkt tavuk ilişkili suşlar arasında PT 1b, 4, 5a, 6 6a,7, 8, 21, 30, 35'i identifiye etmişlerdir. Kanatlı ilişkili izolatlarda PT4 ve PT7 % 95.6'lık yüksek bir oranla en sık rastlanan faj tiplerken diğerleri nadiren gözükmektedir. PT6, kanatlı eti, mayonez, peynir ve kek gibi çeşitli yiyeceklerden izole edilirken tavukların yetiştirildiği çevresel örneklerde ve et yemeklerinden PT4a, ve PT1 izole edilmiştir. İnsanlarda sıklıkla izole edilen faj tipin, PT4 olduğu ve bunu PT7, PT8'in izlediği bulunmuştur. PT4'ün insan ve tavuklarda görülen en predominant faj tip olmasının, gıda orijinli insan salmonellosis salgınları ve tavuk rezervuarı arasındaki özel bir ilişkiyi ortaya koyan bir sonuç olarak rapor etmişlerdir. Boonmar ve arkadaşları (88), Tayland'da 1993-1996 yılları arasında tavuk etlerinden, insanlardan, hazır Tayland yerel yemeklerinden izole ettikleri toplam 27.497 *Salmonella* suşunu, insan ve yiyeceklerdeki predominant *Salmonella* serovarlarını tespit etmek için serotiplendirmişlerdir. İnsan ve yiyecek örneklerinde sırasıyla 72 ve 81 farklı serovar tespit etmişlerdir. Bu dört yıllık periyotta insanlardan alınan idrar, serebrospinal sıvı, kan, dışkı ve tükrük gibi örneklerde, *S*. Enteritidis % 47.2 ile predominant serovar olarak tespit edilirken, dondurulmuş tavuk eti örneklerinde 1993 yılında % 17.1, 1994 yılında % 33.8, 1995 yılında % 29.6, 1996 yılında % 15.1 ile yine *S*. Enteritidis predominant serovar olarak bulunmuştur. Mikolajczyk ve arkadaşları (89), Polonya'da 1999 yılında Ocak-Mart, Nisan-Haziran, Temmuz-Eylül, Ekim-Aralık olmak üzere 4 zaman diliminde tavuk eti işleme platformlarında tavuk karkaslarındaki *Salmonella* kontaminasyonunu araştırmışlar ve incelenen 400 tavuk etinin 95'inin *Salmonella* spp. ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. İncelenen 100 örnekte

şoklama sonrasında % 6, eviserasyondan sonra % 24, soğutmadan önce % 52, soğutmadan sonra % 13 *Salmonella* kontaminasyonuna rastlamışlardır. En düşük *Salmonella* kontaminasyon oranı şoklama öncesinde tespit edilirken, en yüksek oran soğutma öncesinde bulunmuştur. Bu sonuçlar; işlemelerin bazı noktalarında *Salmonella* spp.'nin daha fazla bulunabileceğini göstermektedir. Tavuklardan izole edilen *Salmonella* spp.'nin serolojik tipleri; *S*. Enteritidis predominant serovar olarak başı çekmekle birlikte, sırasıyla *S*. Typhimurium, *S*. Saintpaul, *S*. Agona ve *S*. Infantis'dir. Araştırmacılar, 1 yıllık süreçte, ilk iki periyotta, Ocak-Mart, Nisan-Haziran, *Salmonella* spp.'yi daha sıklıkla izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Çalışmalarda bahsedilen *S*. Enteritidis predominantlığı Rodrigue ve arkadaşları (90), tarafından WHO verileri baz alınarak insanlarda görülen *Salmonella* salgınları için 1979 yılından itibaren 1987 yılına kadar olan önceki süreç için bildirilmektedir. Araştırmacılar, Atlantik Okyanusu'nun her iki ucunda da, insanlarda görülen *S*. Enteritidis infeksiyonlarında büyük bir artış olduğunu rapor etmişlerdir. WHO'nın 1979-1987 *Salmonella* taramalarına göre Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avrupa ve Afrika kıtalarında *S*. Enteritidis'in göstermiş olduğu yükselen grafik dikkate değerdir. 1979-1987 arasında 35 ülkenin 24 (% 69)'ünde *S*. Enteritidis izolasyon oranının artış gösterdiği rapor edilmiştir. 1979 yılında, 21 ülkenin (% 10) sadece 2'si *S*. Enteritidis'i en yaygın serotip olarak bildirirken, 1987 yılında 21 ülkenin 9 (% 43)'u -ki bu dokuz ülkeden 8'i Avrupa ülkesi- *S*. Enteritidis'i predominant serotip olarak bildirmişlerdir. *S*. Enteritidis'teki global artışın nedeni açık bir şekilde ortaya konmasa da, bu ülkelerde yapılan araştırmalar bu bakteriyi taşıyan yumurta ve kanatlı etlerinin tüketiminin insanlarda görülen *S*. Enteritidis salgınlarının asıl nedeni olduğu yönündedir. Goncagül ve arkadaşları (91), Türkiye'de sekiz şirketten toplam 315 adet tavuk kanadından yaptıkları *Salmonella* izolasyon çalışması sonucunda, 315 adet tavuk karkasının kanat bölgesi derilerinin 27'sinden (% 8.57) *S*. Enteritidis izole ettiklerini bildirmişlerdir. Buna karşın Coagan ve arkadaşları (92), 1997'den itibaren insanlarda görülen *Salmonella* infeksiyonlarında dramatik bir düşüşün olduğunu rapor etmişlerdir.

Yukarıda değişik epidemiyolojik verilerin bir sonucu olarak, *Salmonella* kontrolünün kümesten sofraya kadar sağlanması gereken bir süreç olduğu ortadadır. *Salmonella* infeksiyonlarından korunmanın kanatlı sağlığı, gıda endüstrisi ve dolayısıyla halk sağlığı açısından önemli olduğu açıktır. Bu infeksiyondan korunma ancak kanatlı yetiştiriciliği ve gıda sektöründe uygulanan iyi tarama ve izleme programları ve düzgün bir örnekleme planı

ile sağlanabilmektedir (19-21).

Kanatlı sürülerinde "Paratifo grubu" salmonelların teşhisi, sırasıyla aglutinasyon testleri (44, 93) konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler (21), ELISA-tabanlı testler (45, 94-97), IMS (immunomagnetic separation) ile bakteriyi yoğunlaştırıp daha sonra uygulanan testler (98, 99) ve bakterilerin çok sayıda olduğu durumlarda uygulanan DNA-DNA hibridizasyon testleri (100-102) ile yapılmıştır.

Gıdalarda ise Avrupa'da ISO6579 (International Standart Office; Uluslararası Standart Ofisi), Amerika Birleşik Devletleri'nde BAM (Bacteriological Analytical Manual) gibi konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler, ELISA tabanlı serolojik testler (103), IMS (104, 105) ve DNA-DNA hibridizasyon testleri (106, 107) *Salmonella* teşhisinde kullanılmıştır.

Fakat bu metodlarla ilgili yaşanan duyarlılık ve özgünlük sorunları ve diagnostik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha hızlı teşhis yöntemlerine duyulan gereksinim, bu açıklarını kapatan alternatif tanı yöntemlerinin gelişimine yol açmıştır (54-59).

Yüksek duyarlılığa sahip çeşitli aglutinasyon, enzyme immunassay testleri ile Paratifo grubu salmonellalara karşı spesifik antikorlar, infekte kanatlıların serumlarında yüksek düzeyde tespit edilmektedir (94). Bu serum antikor titreleri, salmonellalar dokulardan temizlenene ve fekal saçılım kesilene kadar sürekliliğini korur (94). *Salmonella*'ya karşı oluşan antikorlar, hem doğal (44) hem de deneysel (95) infekte kanatlılarda saptanmıştır. Fakat antikor arayan testler sadece *Salmonella*'ya ilk maruz kalışı belgelediği ve sürü içerisinde o an devam eden infeksiyonu birebir ortaya koyamadığı için pozitif serolojik sonuçlar genellikle bakteriyoloji ile konfirme edilmelidir. Yeterli invazyon ve yayılım olmaksızın fekal saçılıma neden olan subklinik infeksiyonlarda antikor tepkisinin yeterince oluşmaması, genç kanatlıların *Salmonella* infeksiyonlarına karşı immun-tepkisizliği, benzer paratifo serotiplerine karşı oluşan antikorlar arası çapraz reaksiyonlar antikor tabanlı testlerin güvenilirliğini gölgelemektedir (18, 44, 45). "Konakçı bağımsız" *Salmonella*-infekte sürüleri teşhis etmek için kullanılan ELISA, "konakçı bağımsız" *Salmonella*-infekte bireyleri tanımak için düşük özgünlüğe sahiptir ve bundan dolayı da yanlış pozitif veya negatif sonuçlara neden olabilir. Buna ek olarak, serovar-özgün serolojik testler sadece kendi serotipi ile infekte bireyi belirler; bu ise iki yolla büyük probleme neden olur: Birincisi; eğer sürüde birden fazla sayıda serovar mevcutsa, serolojik test kendi taradığı serovar dışındaki serovarların infeksiyonunu yakalayamamaktadır. Bir diğeri ise; ülkeler arasında serovar dağılımları büyük farklılık gösterdiğinden dolayı, serolojik test uygulansa bile, kendi serovarı o yörede yoksa boşuna

uğraş verilmiş olur (108).

Serolojik testlerden, önce aglutinasyon testleri "paratifo grubu" salmonellalarla doğal ve deneysel olarak infekte bireyleri belirlemekte kullanılmıştır (44, 93). Kanatlı immunglobulinlerine karşı ikincil antiglobulinlerin kullanımı "paratifo grubu" serovar infeksiyonları sonucu oluşan antikorları belirleyen aglutinasyon testlerinin duyarlılığını arttırmaktadır (109). Kanatlılarda "paratifo grubu" *Salmonella* infeksiyonları çok sayıda ELISA yaklaşımları kullanılarak teşhis edilmiştir. Örneğin; LPS (Lipopolisakkarit), flagella ve outer membran proteinlerini içeren antijenler ile ELISA testleri, *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis ile deneysel ve doğal infekte kanatlıları identifiye etmiştir (45, 95, 96). İyi belirlenmiş antijenler kullanarak ELISA, aglutinasyon testleriyle karşılaştırıldığında özgünlüğü yüksektir ve serotipler arasındaki çapraz reaksiyonlar nedenli yanlış pozitif sonuçlar oldukça düşük düzeydedir (94). *Salmonella* LPS ve flagellasına karşı poliklonal antikorlar kullanarak yumurta, doku, kloakal svab, drag svab, altlık, yem ve gıdalarda mevcut olan salmonellaları saptamak için geliştirilen bu testlerle ilgili çok sayıda çalışma vardır (110, 111). "Outer membran proteinleri" ve flagellaya karşı monoklonal antikorlarla yumurta, doku ve çevresel örneklerde spesifik olarak *S.* Enteritidis'in tespitinde ELISA kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (112). Konvansiyonel kültürel metodlar kadar duyarlı olmamasına rağmen (113), genellikle antijen arayan ELISA testlerinin standart metodlarla karşılaştırıldığında daha kısa zamanda *Salmonella* tespit edebildiği bildirilmiştir (114). Metodun duyarlılık eşiğinin 10^5-10^7 cfu ml^{-1} olduğu gözönüne alınırsa, ELISA öncesi daha fazla zenginleştirme kültür basamağına 10^5-10^7 cfu ml^{-1} *Salmonella*'yı saptamak için gereksinim duyulmaktadır (112). Fakat konvansiyonel kültürel metodlar gibi, ELISA testleri de zenginleştirme besiyerlerinde üreme kabiliyetine sahip yarışmacı mikrofloradan dolayı, yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir (115).

Salmonella infeksiyonlarının teşhisinde ve prevalanslarının saptanmasında birçok tanı yönteminden faydalanılsa da izolasyon prosedürleri kesin karar ve teyit için mutlaka uygulanması gereken işlemlerdir. Konvansiyonel kültürel tekniklerle (bakteriyolojik yöntemler) klinik örneklerden *Salmonella* izolasyon ve identifikasyonu oldukça zaman alıcı ve işgücü gerektiren bir prosedürdür. Klinik örneklerden bakteriyolojik metodla *Salmonella* aranması 5-11 gün alır (19-21). *Salmonella* serovarları ile infekte populasyonlardan çıkan ve çevresel kontaminasyonun potansiyel kaynağı olan kronik asemptomatik taşıyıcıların tespiti bakteriyoloji ile oldukça zor ve zaman alıcıdır (116).

Salmonella infeksiyonlarının tanısında izolasyon ve identifikasyon prosedürleri kesin karar ve teyit için mutlaka uygulanması gereken işlemlerdir. Bu nedenle *Salmonella*'nın izolasyonu için çok sayıda selektif besiyeri geliştirilmiştir. Bu agarların içinde kullanılan seçicilik sağlayan maddeler; boyalar, antibiyotikler ve safra tuzlarıdır (117). İlk etapta, *Salmonella*'nın diğer bakterilerden ayırımında genellikle hidrojen sülfid üretimi ve laktozun fermente edilmemesi gibi basit biyokimyasal özellikler baz alınsa da, salmonellalar ile benzer özellikler gösteren *Proteus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* gibi türlerden ayırım yapılabilmesi için bazı başka analizlar gerekmektedir (117). Ayrıca bazı *Salmonella* türlerinin H_2S-, laktoz+ olması durumunda yanlış-negatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bunun yanısıra, incelenen örnek tipi, *Salmonella* dışı bakteri kontaminasyon seviyelerindeki farklılıklar, örneklerdeki *Salmonella* sayısı, izole edilmek istenenen serotiplerin farklılığı, zenginleştirme ve izolasyonda kullanılan besiyerleri arasındaki etkinlik farkı ve laboratuvar çalışanlarının becerisine bağlı olarak laboratuvardan laboratuvara *Salmonella* izolasyon oranları da farklılık göstermektedir (118).

Tavuklarda *Salmonella* izolasyonunda kullanılan katı besiyerleri XLT4 Agar (Xylose Lysine Tergitol-4 Agar), BGN Agar (Novobiosinli Brilliant Green Agar), NGBL Agar (Novobiosinli Brilliant Green Glycerol Lactose Agar), BG Agar (Brilliant Green Agar), XLD Agar (Xylose Lysine Deoxycolate Agar), HE Agar (Hektoen Enteric Agar), BS Agar (Bismuth Sulfid Agar), SS Agar (*Salmonella Shigella* Agar) , MacConkey Agar, DCA Agar (Desoxycholate citrate Agar), MSRV (Modifiye Semi-Solid Rappoport Vassiliadis), MLCB Agar (Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar)'lardır. Bu besiyerlerinin birçoğunda şekerlerin yıkımlanması, besiyeri bileşimi içine katılan antibiyotikler, boyalar ve çeşitli katkı maddeleri ile yarışmacı mikrofloranın üremesi inhibe edilirken *Salmonella*'nın üremesi provoke edilmiştir. Dusch ve arkadaşları (119), paratifo grubu salmonellaların izolasyonunda etkin olan besiyerini belirlemek için konvansiyonel besiyerlerinden HE agarla RA, SM-ID (*Salmonella* Detection and Identification Medium), XLT4, BGN agarları karşılaştırmışlardır. MSRV ve XLT4 agarların dışkıdan paratifo grubu salmonellaların izolasyonunda en etkili besiyerleri oluğu sonucuna varmışlardır. Direk dışkıdan ve TTB (Tetrathionate broth)'da zenginleştirmeden sonra, XLT4 ve MSRV agarlarda yapılan izolasyon sonucunda duyarlılıklar sırasıyla; XLT4 için % 32.9 ve % 86.6 bulunurken, MSRV için sırasıyla; % 63.4 ve % 100'dür. Besiyerlerinin özgünlükleri XLT4 için sırasıyla; % 100 ve % 99.8, MSRV için sırasıyla; % 99 ve % 98.8 olarak

belirlenmiştir. Bu iki besiyerinin duyarlılığı ve özgünlüğü HE agardan oldukça yüksek bulunmuştur. XLT4 agar % 100'e varan özgünlüğü ile rutin laboratuvarlarda iş yükünü azattığı için dışkıdan izolasyonda önerilmektedir (119).

Bu besiyerlerine alternatif olarak son yıllarda spesifik enzimler için substrat olarak görev alan bileşimler olan kromojenik enzim substratları ile enzim aktivasyonu sonucu oluşan renk değişiminden faydalanılan kromojenik agarlar devreye girmiştir (120-126). Bunlar RA (Rambach Agar), CAS (CHROMagar *Salmonella* Medium), SCM (*Salmonella* Chromogenic Medium), CSE (Chromogenic Ester Agar Medium), ABC Medium (α-β Chromogenic Medium), SM-ID Medium'dur. Kromojenik agarların maliyetleri bir dezavantaj olarak gözükse de izolasyonda yüksek duyarlılık ve özgünlükleri, göreceli olarak identifikasyon zamanının kısalması ve harcanan emeğin azalması gözönünde bulundurulursa, bu besiyerlerinin kullanımı aslında laboratuvarlar için birer avantaj olarak görülmektedir (120-126). Her ne kadar kromojenik agarlar paratifo grubu salmonellalar için spesifik besiyerleri olsalar da, yanlış pozitif ve/veya nagatif sonuçların da şekillendiği yadsınılmayacak bir gerçektir. Örneğin; Freydiere ve arkadaşları (125), gıda orijinli, *Salmonella* salgınlarının tespit edilmesinde önerilen, kromojenik agarların ilki olan, RA ile yaptıkları bir çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinotobacter spp*.'nin besiyeri içinde mevcut olan iki kromojenden biri olan propilen glikolü metobolize etmeleri ve β-galaktosidaz aktivitesi göstermemeleri ile *Salmonella* spp. gibi tipik kırmızı koloniler oluşturdukları için izolasyonda yanlış-pozitif sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Dışkı örneklerinden yapılan bir çalışmada, ABC medium'un hindiler için problem olan *Salmonella enterica* serovar Arizonae suşlarının β-galaktosidaz aktivitesi göstermeleri ve *S*. Braenderup ve *S*. Saintpaul'un α-galactosidase üretmemelerinden dolayı yanlış negatif sonuçların alındığı ortaya konmuştur (126).

Tavuk etlerinden *Salmonella* izolasyonunda, rutin laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılan besiyerileri BGN, MSRV ve XLT4 agarlardır. XLT4 agar içine katılan Tergitol4 suplementi *Proteus*, Pseudomonas, Providencia ve diğer enterik bakterilerin tamamiyle inhibisyonunu sağlarken, *Salmonella* kolonileri besiyeri içine katılan ferrik amonyum sülfat sayesinde gözlemlenebilen, sodyum tiosülfattan H_2S formasyonu sonucu merkezlerinde siyah renk oluştururlar. Kolonilerin periferi xylose'un tüketimine bağlı olarak sarı (asit)'dan pembeye (alkali) dönüşür. XLT4 agar pleytlerinde, 24 saat içerisinde siyah koloni oluşturma yeteneğindeki tek genusun *Salmonella* olduğu ve böylece XLT4 agarın bu genusa ait etkenlerin diğer mikroorganizmalardan kolaylıkla ayrılmasını

sağladığı ve kısa sürede doğru sonuçların alındığı saptanmıştır (119). Fakat, *Salmonella* izolatlarının birçoğu laktozu fermente etmezken, *S*. Enteritidis izolatlarının yaklaşık olarak %1'i ve *Salmonella enterica* serovar Arizonae izolatlarının %15-85'i laktozu fermente edebilmektedir. Bu nedenle laktozun kullanımı temel alınarak hazırlanan besiyerlerinde laktoz+ izolatların diğer mikroorganizmalardan ayırımı oldukça güçtür. Bunun yanısıra H_2S- suşların varolabileceği olasılığı da gözardı edilmemesi gereken bir durumdur (127, 128). MSRV Agar düşük agar konsantrasyonlarında hareketli bakterilerin göç etmesi esasına dayanan bir besiyeridir. Koliformlar bu besiyerinde, arttırılmış ozmotik basınç, malaşit yeşili, 41-43 ºC'lerde inkubasyonla inhibe edilirler. Yalnız bu besiyeri oldukça hassas olup, dikkatli bir manuplasyon gerektirmektedir (129, 130). Bunun yanısıra hasar görmüş ve hareket yeteneğini kaybetmiş salmonellaların izolasyonu, hareketlilik temelli bu besiyeri ile imkansızdır. Ayrıca BGN agar'da yeterli H_2S formasyonu sadece gliserol ve laktozdan asit üretmeyen koloniler tarafından gerçekleştirilir. Çünkü düşük pH, H_2S formasyonunu engeller. BGN agar *Proteus* ve *Citrobacter* türleri için renksiz, *Salmonella* türleri için siyah renkli koloniler oluşturur (117).

Salmonella izolasyonunda kullanılan besiyerleri kadar, bu besiyerlerini de içeren uygun bir sistematik içinde sürdürülen *Salmonella* izolasyon test yöntemleri de, kullanılacak materyallere göre optimize edilmiştir. Gıdalarda ve fekal örneklerde *Salmonella* yükünün az ve diğer yarışmacı mikrofloranının da mevcut olması dolayısıyla, kanatlı etlerinden ve klinik örneklerden *Salmonella* izolasyonu için, ön zenginleştirme ve ardından zenginleştirme yapıldıktan sonra izolasyon prosedürüne geçilmesi zorunluluktur (21, 131-133). Zenginleştirme basamağına alternatif bir metod olan IMS, salmonellaları konsantre etmekte, sublethal zarar görmüş *Salmonella* hücrelerine herhangi bir yan etkisinin olmamasının yanısıra teşhis zamanını kısaltmaktadır. Selektif agarlarda izolasyondan önce IMS kullanılarak salmonellaların konsantre edilmesi kanatlı eti, dokuları yumurta kabuğu, yem, kloakal svab, veya fekal svab örneklerinde konvansiyonel selektif zenginleştirme veya hareketlilik temelli zenginleştirmelere göre daha yüksek sıklıkla *Salmonella* saptayabilmiştir (134-136). IMS aynı zamanda zenginleştirme besiyerleri ve ELISA ile kombine uygulanarak, yumurta içeriğindeki düşük seviyelerde *S*. Enteritidis kontaminasyonunu belirlemek için kullanılmıştır (137). Fakat; Ripabelli ve arkadaşları (138), BPW (buffered peptone water)'da önzenginleştirme ve ardından sırasıyla SC (Selenite Cystine) broth'da zenginleştirme ve IMS'den sonra HE agar ve RA agarlar'da dana kıymasından yaptıkları izolasyon çalışması sonucunda; IMS uygulanan örneklerden

HE ve RA agar pleytlerde üreyen *Salmonella* sayısının SC broth'ta zenginleştirme yapılarak pasaj edilen kültüre göre düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunu iki nedene bağlamışlardır: Bunlardan birincisi, dana kıyması gibi yüksek düzeyde yağ içeren gıdalarda anti-*Salmonella* Dynabead'leri ile non-spesifik bağlanmalar olabileceği ve aynı zamanda manyetik boncukların birbirlerine tutunan *Salmonella* hücrelerini tek bir koloni olarak belirleyebileceğini söylemişlerdir. İkinci neden ise, gıda numuneleri içerisinde mevcut olan yarışmacı mikrofloranın sadece BPW'da önzenginleştirme ile önlenememesi ve bu mikrofloranın çapraz reaksiyonlardan dolayı manyetik boncuklarla non-spesifik bağlanması olabileceğini tespit etmişlerdir. FDA'nın BAM'ına göre, tavuk etleri ve ürünlerinden önzenginleştirme amacıyla kullanılan broth LB (Lactose broth)'dur. Önzeginleştirmeyi takiben RVB (Rappoport Vasilliadis broth), TTB (Tetrathionate broth) ve SCB (Selenite Cycstine broth)'de zenginleştirme kültürlerinin hazırlanması önerilmiştir (131). Kanatlı et örneklerinden 25'er gram tartıldıktan sonra, et örneklerinin steril makaslar yardımı ile küçük parçalara ayrılıp, 225 ml LB içerisinde 1 saat oda ısısında önzenginleştirme amacıyla homojenize edilmesi gerekliliği, ardından önzenginleştirme kültürlerinden, 0.1'er ml içinde10 ml RVB bulunan tüplere, 1'er ml de 10 ml SCB ve 10 ml TTB içeren tüplere inokule edildikten sonra, TTB 37 ºC'de, SCB 35 ºC'de su banyosunda ve RVB 42 ºC'de 18 saat zenginleştirme için inkube edildiğinde izolasyon şansının arttığı bildirilmiştir (132). Yapılan araştırmaların sonuçları; bu üç zenginleştirme broth'unun etkinliğinin incelenen örnek tipine ve uygulanan inkubasyon süresine göre göreceli olarak farklılık gösterdiği yönündedir. Hammack ve arkadaşları (132), düşük mikrobiyal yüke sahip gıdalardan *Salmonella* izolasyonu için TTB'u 35 ºC'de, RVB'u 42 ºC'de inkube etmeyi önermektedir. SCB'la yapılan zenginleştirmeden sonra izolasyon şansının RVB ve TTB'a göre daha düşük olmasının nedenini, besiyeri içinde bulunan toksik seviyelerdeki selenyuma bağlamışlardır.

Kanatlılarda *Salmonella*'nın hızlı aranması için son yıllarda kabul gören bir diğer yaklaşım, *Salmonella* genusuna ve hatta serotiplere özgü özel DNA dizileri için problar kullanmaktır. Örnekten ekstrakte edilen DNA ile probun hibridizasyonu pozitif sonuç verir. DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri klinik örnekler için son yıllarda yaygın bir biçimde kullanılmıştır (100). Hem radiolabelled hem de colorimetric testlerde DNA probları yüksek özgünlük ile kanatlı fekal örnekleri ve çevresel örneklerden, gıdalardan *Salmonella* teşhisinde uygulama alanı bulmuştur (107, 139-141). Bu amaçla kullanılan dot-blot hibridizasyon, reverse dot blot hibridizasyon gibi DNA-DNA hibridizasyon

yöntemlerinin görüntülenmesinde konjugat, DNA ile reaksiyon veren özel antikorlara ve enzim işaretli substratlara gereksinim vardır. DNA hibridizasyonu ile salmonellaların aranma duyarlılığı, antijen arayan ELISA'ya benzerdir. Bu nedenle genellikle *Salmonella* sayısını arttıracak bir veya daha fazla zenginleştirme basamağı yapılmasına ihtiyaç vardır (142).

Konvansiyonel bakteriyolojik yöntemlerle gıdalardan *Salmonella* tespitinin zaman alıcı olması, laboratuvarlara iş yükü getirmesi ve düşük mikrobiyal yüke sahip numunelerde duyarlılığın düşük olması, salmonellosisin gerek kanatlı sektörünü gerek insan sağlığını tehdit eder boyutlara ulaşması ile kanatlı etlerinden *Salmonella*'nın tanısını koyabilmek için hızlı, duyarlı ve güvenilir teşhis metodlarına gereksinim vardır. Teşhiste yaşanan zaman ve duyarlılık problemleri araştırmacıları yeni arayışlar içine itmiştir. Bunun sonucunda kullanılan son teknik PCR (Polimerize Zincir Reaksiyonu; Polymerase Chain Reaction)'dır. PCR, konvansiyonel metodlarla karşılaştırılığında herhangi bir substrat kullanımı veya antijen ekspresyonuna dayanan bir teknik değildir (143). Bu nedenle biyokimyasal paternlerde ve detekte edilebilir antijende gözlenen fenotipik varyasyonlardan etkilenmez (144). 1980'li yılların ortalarında birçok gıda patojeninin aranmasında kullanılan PCR (145-150), *Salmonella* için saf kültürlerde veya selektif agar pleytlerde (151, 152) veya direkt ön zenginleştirme ve/veya zenginleştirme besiyerlerinde (56, 57, 59, 153-157) veya gıdalarda (158, 159) identifikasyon metodu olarak kullanılmak üzere tanımlanmıştır.

Salmonella saptanması için geliştirilen PCR protokollerinde; farklı PCR makinaları, PCR tüpleri, annealing sıcaklıkları, $MgCl_2$ konsantrasyonları ve buffer sistemleri, PCR kitleri, primer çiftleri kullanılmaktadır (160).

PCR reaksiyonları için çok sayıda farklı ticari PCR makinası kullanılmıştır: AG 9600 AmpliSensor Analyzer (Gene Amp PCR systems 9600, The Perkin Elmer Corp., Norwalk, Conn), Gene Amp 2400 thermocycler (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, US), Robocycler 96 Grad (Stratgene, La Jolla, Calif.), DNA Air Thermal Cycler Model 1605 (Idaho Technologies, USA), Light Cycler (Roche Dianostics , Mannheim, Germany), Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Warrington UK), PTC-200 (MJ Research, Wartertown, MA USA) Programmable Thermal Controller (PTC-100; MJ Research, Inc.) Perkin Thermocycler Model 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gibi. Temelde hava çevreli ve su çevreli olmak üzere 2 çeşit PCR makinası vardır. Konvansiyonel PCR makinalarında, aksesurların sıcaklık geçirgenliğinin az olması, arzu

edilen sıcaklığa uzun zamanlarda erişilebilmesi, dolayısıyla zamanın çoğunun denatürasyon, annealing ve ekstensiyon basamaklarına geçişte harcanması, bunların kullanımınlarıyla ilgili büyük dezavantajlar getirmektedir. Air Thermal Cycler Model 1605 (Idaho Techonologies, USA) gibi hava çevreli PCR makinalarında ise; havanın düşük yoğunluğu nedeniyle soğutma ve ısıtmanın hızlı yapılabilmesi, havanın ısı iletkenliğinin yüksek olması nedeniyle PCR basamaklarının daha kısa sürelerde ve verimli bir şekilde tamamlanabilmesi en önemli avantajdır. Bu tip PCR makinalarında, DNA amplifikasyonu için sıcaklık siklus protokolü 3 bitiş sıcaklığı ve 3 transferin yapıldığı sıcaklık olmak üzere 6 segmente ayrılmaktadır. Konvansiyonel PCR makinaları ile karşılaştırıldığında sıcaklık transferi sırasında harcanan zaman çok kısadır. Ayrıca, ekstensiyon ve denaturasyondan sonraki geçiş basamaklarında harcanan zamanın PCR üzerinde herhangi bir etkisi yoktur (161). Özetle, PCR makinaları arasındaki performans farklılıkları PCR sonucunu kalite ve zaman yönleriyle etkilemektedir (162).

PCR makinası kadar örneklerin hacimleri, kullanılan PCR tüplerinin özellikleri de PCR performansını etkileyen diğer önemli öğedir. İyi bir PCR tüpünün sahip olması gereken özellikler; tüpün kapağı kapandıktan sonra buharlaşma olmaması, düşük ısıl kütleye sahip olması, sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması ve çapraz reaksiyonlara izin vermeksizin reaksiyon hacimlerinin tüplere konulabilmesidir. Kalın çeperli PCR tüplerinin, içerdikleri örneklere ısı transferini randımanlı bir şekilde yapamamakla birlikte tüpün yüzeyine temas eden örnek hacminin sınırlı olması, PCR protokollerinde belirlenen sıcaklıkların örneklerde sağlanamaması veya örneğin belirlenen zamandan daha kısa bir süre final sıcaklığa maruz kalması da PCR'ın verimli bir şekilde uygulanmasını engeller. Bundan dolayı ince çeperli 200 µl'lik tüpler PCR'da tercih edilmelidir. PCR amplifikasyonu için kullanılan farklı bir taşıyıcı ortam ise borosilikat cam borucuklardır. Bunlar içinde PCR yapmanın avantajları şu şekilde özetlenebilir; borosilikat kapiller cam PCR borucukların yüzeyiyle maksimum temasa geçmesi, kapiller borucukların alev yardımıyla uçlarının kapatılması sonucu buharlaşma ve çapraz kontaminasyon oranının en aza indirgenmesi, borucukların ısı geçirgenliğinin yüksek olması, sonucu PCR lehine çevirmektedir (161).

Gıdaların analizinde kullanılan ticari PCR kitleri oldukça az sayıdadır. Kanatlı etlerinden *Salmonella* teşhisinde halihazırda kullanılan PCR kitleri; BAX™ (Qualicon, Wilmington, DE, USA), TaqMan™ (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster Cty, CA, USA), Probelia™ (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes La Coquette, France) olmak üzere

3 adettir. Her üç kitinde, diğer bakterilerle çapraz reksiyon oluşturmaksızın *Salmonella* deteksiyonunda güvenilir bir şekilde kullanılabileceği, fakat Probelia™ (163, 164), TaqMan™ PCR'ın (165, 166) 10^2 cfu ml^{-1} eşik duyarlılığı ile 10^3-10^4 eşik duyarlılığına sahip BAX™ PCR'na (41, 58, 167) göre daha hassas olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca Probelia™ (163, 164), TaqMan™'in (165, 166) 96 gözlük pleytler olması dolayısıyla çok sayıda örneğin incelenmesine olanak sağladığı rapor edilmiştir. BAX™ PCR kitinin, PCR için gerekli olan primerler, enzim, deoksiribonükleotidler gibi tüm reagentlerin basit liyofilize bir tablet içerisinde bulundurması ve bu nedenle laboratuvarlarda moleküler biyoloji açısından gerekli tecrübesi bulunmayan laboratuvar çalışanlarının olası manuplasyon hatalarını bertaraf ettiği bildirilmiştir (41, 58, 167). Bailey ve arkadaşları (167), kitlerle *Salmonella* aranmasını kanatlı karkaslarından ve tüketime hazır kanatlı ürünlerinden, konvansiyonel kültürel metodla karşılaştırıldığında 2-3 gün, ELISA ve genetik hibridizasyon metodları ile karşılaştırıldığında 1 gün avantajı olduğunu belirtmişlerdir. Fakat her üç kitte de, PCR'dan önce 16-20 saatlik önzenginleştirme kültürleri uygulanmıştır.

Salmonella PCR çalışmalarında, *Salmonell*a DNA'sının hedef bölgeleri olarak *rfb* gene (46), *Ori*C; origin of replication (replikasyon başlangıç bölgesi) (47), *inv*A gene (invazyon A geninin bir bölgesi) (48), *spv*R-gene (*Salmonella virulence plasmid* genleri) (49), *iro*B genes (Fur-regulated gene) (50), *Omp*C *geni* (outer membran protein genleri) (51), *fli*C geni (52), *sef*A geni (53), IS200 (158), 16S rRNA gene (rDNA) sekansları (159, 168-171) kullanılmıştır. *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere tüm *Salmonella* türlerinde mevcut olması (22) ve daha önce Rahn ve arkadaşları (48), tarafından özgünlüğünün kanıtlanması dolayısıyla bu çalışmada *inv*A geni seçilmiştir.

Nükleik asitlerin spesifik fragmanlarının amplifikasyonu ile gerçekleştirilen PCR teknolojisinin üre, kan, serebrospinal sıvı, dışkı kloakal svab gibi klinik örneklerden, kümeslerden alınan çevresel örneklerden ve gıda örneklerinden direk spesifik patojenin identifikasyonu için kullanımındaki en büyük engel örnekler içerisinde mevcut olan inhibitör substanslardır (54, 141, 142). Bundan dolayı, inhibitör substansların elimine edilmesi amacıyla DNA ekstraksiyon prosedürlerinden faydalanılmaktadır. Bu prosedürler genellikle bir gecelik önzenginleştirme basamağından sonra, proteinaz K (56), guanidine isothiocyanate (172), DNA bağlayan matriksler (173), phenol-chloroform (174), santrifügasyon ve filtrasyon (175), *Salmonella* spp.'ye karşı antikor kaplı manyetik boncukların (176) kullanımı ile uygulanmaktadır. Fakat birçoğu PCR'dan önce çok sayıda

manuplasyon gerektirdiği için örnekler arasında çapraz kontaminasyon şekillenmesi olasıdır. Dışkı örneklerinden *Salmonella* aranması için PCR'dan önce DNA ekstraksiyonunun yapılmasındaki amaç; dışkı içerisinde mevcut olan bilurubin, safra tuzları gibi substansların reaksiyonu inhibe etmesi nedenlidir (177). Gıda örneklerine PCR uygulaması sırasında mikrobiyal metabolitler ve gıda öğeleri, reaksiyonun şekillenmesini engelleyebilmektedir. Gıdalarda bulunan inhibitörler tam olarak karakterize edilmediyse de, inhibisyonu hücre lizisini engelleyerek, nükleik asitleri degrade ederek veya nükleik asitlere bağlanarak, DNA polymerase'ı inhibe ederek veya primer-DNA template anneling reaksiyonunun şekillenmesini bloke ederek yaptıkları şeklinde görüşler mevcuttur (162). PCR reaksiyonlarının inhibisyonu düşük saptama duyarlılığı nedeniyle yanlış-negatif sonuca neden olabilir. Gıda örneklerinin kompozisyonlarındaki farklılıklar, farklı ekstraksiyon prosedürlerine gereksinim duyulmasına neden olur. Gıdalarda özellikle organik, fenolik bileşikler, glikojen, yağ ve kalsiyum gibi gıda matriksleri DNA amplifikasyonunun engellenmesine neden olmaktadır (178). Soumet ve arkadaşları (56), tavuk ürünlerine uyguladıkları 4 farklı DNA ekstraksiyon prosedürleri sonucunda, proteinaz K ve/veya santrifügasyonun en etkili metot olduğunu bildirmişlerdir. Li ve arkadaşları (178) kaynatma ve santrifüjün en etkili ve ucuz metot olduğunu ortaya koymuştur. DNA ekstraksiyonu amacıyla çok sayıda kimyasal kullanılmaktaysa da, bunların birçoğunun PCR için inhibitör olduğu yadsınılmayacak bir gerçektir. Tavuk etleri ve dışkı, kloakal svab gibi aranılan patojenin sayısının düşük olduğu örneklerde ekstraksiyondan önce zenginleştirme yapılması saptama duyarlılığını arttırdığı için birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir.

PCR sonucu amplifiye olan yüksek miktardaki *Salmonella* DNA'sının ilgili gen parçacığını gözlemlemek için gel elektroforezi, ELISA tabanlı yöntemler ve fluorometrik yöntemlerden faydalanılır. *Salmonella* saptanması için spesifik birçok PCR-tabanlı metot tanımlanmıştır (46, 48, 49, 58, 157, 164, 165, 179). Elektroforez ve ELISA-tabanlı bu PCR metodları, PCR ürünlerini sırasıyla, ya ethidium bromide/gel elektroforez ya da post-PCR hybridization-capture metodları kullanarak görüntülemektedir. Gel-tabanlı metodlar zahmetli, zaman alıcı, daha az duyarlılığa sahip olmalarının yanısıra otomotize edilebilmeleri de zordur. Ayrıca ethidium bromide'in çevreye toksik etkisi bulunmaktadır. Hoorfar ve arkadaşları (180), ancak 10^8 pmol DNA'nın gel elektroforezle saptanabildiğini bildirmektedir. PCR sonrası hybridization capture metodlarının jel tabanlı metodlara göre daha duyarlı ve özgün olduğu, otomatize edilmelerinin daha kolay olduğu rapor edilmiştir.

Fakat bu metodlar, kimi zaman jel tabanlı metodlardan daha zahmetli ve zaman alıcı çoklu sinyal geliştirme basamakları gerektirmektedirler. Diğer bir ifade ile, ELISA-tabanlı metodlarda DNA ile birleşen özel antikorlara, enzime ve substrata ihtiyaç vardır. Her iki yöntemle (jel elektroforezi ve ELISA-tabanlı yöntemler), PCR ürünü oluşurken gözlemleyebilmek mümkün değildir ve PCR ürünü özenli bir şekilde alınmazsa potansiyel kontaminasyon kaçınılmazdır. PCR teknolojisindeki son yenilikler PCR sonrası işlemi elimine ederek, PCR ürününün gerçek zamanlı (real-time) tespitini olanaklı hale getirmektedir (180, 181). Real-time PCR tamamen kapalı PCR tüplerinde devam ettirilmekte, böylece rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında PCR metodlarının uygulanmasında en önemli problemlerden biri olan çapraz-kontaminasyon riski azaltılmaktadır. *Salmonella*'nın hızlı bir şekilde aranmasını sağlamak için PCR ürünlerinin farklı floresan-tabanlı sistemler kullanarak saptanması olanaklıdır. Bu nedenle floresan "intercalating" (oluşan DNA iplikçikleri arasına giren ve bağlanan) boyalarının floresan sinyal oluşturma özellikleri ve spesifik DNA fragmanının termal denatürasyon karakteristiği kombine edilerek homojen floresan tespit metodları geliştirilmiştir (182, 183). "$5^{'}$ nükleaz" testi ile "quencher dye" ve "reporter dye" ile işaretli olan spesifik problarla hibridize olmuş DNA moleküllerinde , Taq DNA polimerazın $5^{'} \longrightarrow 3^{'}$ yönünde ekzonükleaz aktivitesi, amplifikasyon esnasında hibridize olmuş probları ayrıştırarak, PCR esnasında her amplifikasyondan sonra "reporter dye"ın floresan sinyalindeki artışın gözlemlenmesine ve floresan yoğunluğunun otomotik olarak ölçülebilmesine izin vermektedir (184, 185). Bu sistemlerin avantajı, PCR ürününde şekillenmesi olası olan potansiyel kontaminasyonu engellemesi ve daha ürün oluşurken, eşzamanlı olarak, hızlı ve duyarlı sonuçların alınmasıdır. Fluorometrik yöntemleri konvansiyonel PCR saptama tekniklerinden 10 kat daha hızlı sonuç vermekle birlikte (56, 57, 156), duyarlılığı gel elektroforeziden yaklaşık 100 kat daha fazladır (186).

Gıdalarda ve klinik örneklerde *Salmonella* saptanması için bazı PCR-tabanlı kısa süren yöntemler tanımlanmıştır. Fakat bunlar sadece saf *Salmonella* kültürlerinin seri dilusyonları kullanılarak yapay kontamine edilen örneklerde denenmiştir (52, 56, 187, 188). Gıdalarda bulunan salmonellalar saf laboratuvar kültürleriyle aynı fiziksel koşullarda bulunmadıkları için bu metodların duyarlılıklarının güvenilirliği hakkında yoruma gidilemez.

Bazı araştırmalarda, selektif olmayan bir besiyerinde ön-zenginleştirme basamağından sonra zenginleştirme basamağı atlanarak DNA ekstraksiyonununun ardından direk PCR

yapıldığı bildirilmiştir (56, 189). Fakat *Salmonella*'nın kanatlı etleri gibi bakteri yükü düşük kontamine örneklerde uniform bir dağılım göstermediği gözönünde tutulduğunda, örnekleme yapıldıktan sonra mümkün olan en kısa zamanda örneklerin çalışılması gerekmekte ve teşhis şansı azalmaktadır (190).

Zaman ve duyarlılık problemlerinin üstesinden gelebilmek için zenginleştirme broth'unda ön inkubasyon ile PCR *Salmonella* spp. saptanmasında, insan (46, 54, 176, 191), hayvan (156, 192, 193), gıda (58, 59, 194), yem (195, 196) örnekleri için uygulanmıştır. Örnekler içerisindeki canlı *Salmonella* sayısındaki artışı takiben testin duyarlılığının artması, bu yöntemleri oldukça yararlı ve hızlı kılmıştır (197). Zenginleştirme broth'u ve PCR kombinasyonu ile ilgili bazı çalışmalardan şu örnekler verilebilir. Whyte ve arkadaşları (198), ticari broiler kesimhane servisinde 40 sürüden topladıkları toplam 198 boyun derisi örneğinde, bakteriyoloji ile tüm örneklerin % 16'sının (32 örnek) *Salmonella* spp. ile kontamine olduğunu bulurken, PCR ile test edilen örneklerdeki *Salmonella* yükünü % 19 (38 örnek) olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, peptonlu suda ön-zenginleştirme, RVB'da zenginleştirme sonrasında örnekleri PCR ile incelediklerinde 198 örneğin 45'inin (% 23) *Salmonella* ile kontamine olduğunu ve zenginleştirme ve PCR'nun kombine kullanıldığında testin duyarlılığının arttığını bildirmişlerdir. Tuchili ve arkadaşları (55), kabuk altı ölümlerin şekillendiği 45 adet embryolu yumurtadan direkt PCR ile 20'sinde (% 44.4) *Salmonella* spp. saptarken, zenginleştirme ve ardından PCR uyguladıklarında 23'ünde (% 51.1) *Salmonella* spp. tespit etmişlerdir. Malkawi ve arkadaşları (199), tavuk, koyun, sığır etlerinin ön-zenginleştirme kültürlerini PCR'na uyguladıklarında *Salmonella* yönünden toplam 300 örneğin 93'ünü (% 30) PCR ile, 67'sini bakteriyoloji ile pozitif bulduklarını rapor etmişlerdir. Chiu ve arkadaşları (54), insan dışkı örneklerinden yaptıkları bir çalışmada, tanımladıkları PCR testinde 2 basamak kullanmışlardır. İlkinde, dışkıda bulunan bilurubin, safra tuzları gibi inhibitör substansların eliminasyonunu dışkının 10-20 katlı dilusyonlarla GNB (Gram negatif broth)'ta 6 saatlik inkubasyonla sağladıklarını bildirmişlerdir. İkinci basamakta ise, araştırmacılar bu kültürleri templeyt olarak kullanarak PCR testini uygulamışlardır. Araştırmacılar test ettikleri 57 hastanın 40'ının (% 70) *Salmonella* ile infekte olduğunu PCR veya kültür ile tespit etmişlerdir. Kırk pozitif örnek içerisinde, PCR 38 (% 95) dışkı örneğinde bakteriyi tespit ederken, 16 örnek kültür ile negatif sonuç vermiştir. Geriye kalan 2 örneğin kültür pozitif, PCR negatif sonuç vermesini araştırmacılar 2 nedene bağlamıştır: Dilusyonlarla yeterli düzeyde düşürülemeyen inhibitör bileşimlerin anormal

konsantrasyonda varlığı ve deteksiyon limitinin altında bakteri bulunmasıdır. Böylece PCR testinin duyarlılığının % 95 olmasına karşın kültürel metodun ki % 60 olarak bildirilmiştir. Cohen ve arkadaşları (156), at fekal ve çevresel svab örneklerinden yaptıkları çalışma, TTB zenginleştirme-PCR'ın standart kültür metodundan daha fazla sayıda pozitiviteyi yakaldığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar 152 at fekal örneklerinin 26'sında, 313 çevresel svab örneğinin 8'inde PCR ile *Salmonella* yönünde pozitivite tespit ederken, kültürel metodla her iki örnek grubunda da, *Salmonella* spp. izole edememişlerdir. Waage ve arkadaşları (200), non-selektif zenginleştirme ve PCR ile tespit edilen *Salmonella* spp. oranının arttığını rapor etmişlerdir. Bailey ve arkadaşları (41), peptonlu suda zenginleştirmenin ardından PCR yaptıklarında 50 hindi kıymasının 28'inde (% 56) *Salmonella* tespit ederken, kültürel metodla 25 örnekte *Salmonella* izole etmişlerdir. Aynı araştırmacılar 150 tavuk etine, PCR ve kültürel metodla *Salmonella* kontaminasyon oranını sırasıyla, % 15 ve % 12 olarak belirlemişlerdir. Önzenginleştirmenin örnek içerisindeki az sayıdaki bakteriyi konsantre ettiğini, zenginleştirmenin canlı *Salmonella* hücrelerinin sayısını arttırdığını ve zenginleştirme kültürlerine uygulananan PCR'nun bakteriyolojiyle kıyaslandığında yüksek duyarlılık ve özgünlük ile *Salmonella* saptayabildiğini bildirmişlerdir (201, 202).

Bu çalışmada, zenginleştirmeli kapiller PCR, *Salmonella* tespiti amacıyla optimize edildi ve optimize edilen kapiller *Salmonella* PCR ve BAM (131)'da tanımlanan standart bakteriyoloji ile tavuk ve hindi etlerinden karşılaştırmalı olarak *Salmonella* arandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

GEREÇ

1. Standart Bakteri Suşu: Pasteur Enstitüsü'nden (Institut Pasteur 28 reu du Dr Roux, 75015 Paris Codex 15, France) sağlanan *Salmonella* Enteritidis 64K suşu kapiller PCR testinin optimize edilmesi amacıyla kullanıldı.

2. Besiyerleri

2.1. İzolasyon besiyerleri: *Salmonella* izolasyonunda "Ön-zenginleştirme" (PE) için LB (Lactose broth) (Difco, 0004-01-5, Becton Dickinson, USA) ve "Zenginleştirme" (E) amacıyla (TTB) (Tetrathionate broth base) (Difco, 0104-17-6, Becton Dickinson, USA), SCB (Selenite Cystine broth) (Difco, 0687-17-1, Becton Dickinson, USA), RVB (Rappoport Vassiliadis R10 broth) (Difco, 1858-17, Becton Dickinson, USA), selektif besiyeri olarak XLT4 (Xylose Lysine Tergitol 4) agar (Difco, 0234-17-9, Becton Dickinson, USA) kullanıldı. Besiyerleri üretici firmaların belirttiği formulasyona göre hazırlandı.

2.2. Biyokimyasal Test Besiyerleri: Salmonellaların biyokimyasal karakterizasyonu amacı ile TSI (Triple Sugar Iron) Agar (Difco, 0265-17-1, Becton Dickinson, USA), LI (Lysine Iron) Agar (Difco, 0849-17-6, Becton Dickinson, USA), Simmons Citrate Agar (Difco, 0687-17-1, Becton Dickinson, USA) kullanıldı. Besiyerleri üretici firmaların belirttiği formulasyona göre hazırlandı.

3. Antiserumlar: *Salmonella* izolatlarının serogruplandırılması amacı ile *Salmonella* "O" Antiserum Poly A (Difco, 2534-47-6, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* "O" Antiserum Poly B (Difco, 2535-47-5, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* O Antiserum Factor 4 (Difco, 2659-47-5, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* O Antiserum Factor 5 (Difco, 2660-47-2, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* O Antiserum Factor 9 (Difco, 2818-47-3, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* O Antiserum Factor 12 (Difco, 2779-47-0, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* "O" Antiserum

Factor 14 (Difco, 2661-47-1, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* "O" Antiserum Group C1 Factors 6, 7 (Difco, 2949-47-5, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* "O" Antiserum Group C2 Factors 6, 8 (Difco, 2950-47-1, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), *Salmonella* "O" Antiserum Group E1 Factors 3,10 (Difco, 2952-47-9, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) kullanıldı.

4. Primerler: Daha önce Rahn ve arkadaşları (48) tarafından duyarlılığı ve özgünlüğü belirlenmiş olan $invA_1$ (Iontek, 0403241456-33, İontek Ltd, İstanbul, Türkiye) ve $invA_2$ (Iontek, 0403241456-34, İontek Ltd, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. invA1 ve invA2 nükleotid dizilerine şu şekildedir: 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3' ve 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'. Bu primer çifti Expedite DNA sentezleyicide (Perspective Systems, USA) sentezlenmiş ve reverse-faz yüksek basınçlı likit kromotografi (high pressure liquid chromatography) kullanarak (BioCAD700E; Perspective Systems, USA) saflaştırılmıştır. *Salmonella* genus-spesifik primerin amplifiye ettiği kapiller PCR ürünü büyüklüğü 284 baz çifti olarak hesaplandı.

5. PCR Makinası: Çalışmada Air Thermal Cycler Model 1605 (Idaho Techonologies, USA) hava bazlı bir PCR makinası kullanıldı. Makinanın bazı özellikleri şu şekilde sıralanabilir: Havanın düşük yoğunluğu nedeniyle soğutma ve ısıtmanın hızlı yapılabilmesi, havanın ısı iletkenliğinin yüksek olması nedeniyle PCR basamaklarının daha kısa sürelerde ve verimli bir şekilde tamamlanabilmesini sağlamaktadır. Bu cycler'ın özelliği yaklaşık 30 siklusluk tüm reaksiyon süresinin 25-30 dk'da tamamlanabilmesidir. Çalışmada kullanılan PCR makinasında, DNA amplifikasyonu için sıcaklık siklus protokolü; 3 bitiş sıcaklığı ve 3 transferin yapıldığı sıcaklık olmak üzere 6 segmente ayrılmaktadır. Konvansiyonel PCR makinaları ile karşılaştırıldığında sıcaklık transferi sırasında harcanan zaman çok kısadır. Bu çalışmada kullanılan kapiller PCR borucuklarında, 25 µl'lik reaksiyon hacminin kapiller boruların yüzeyiyle maksimum temasa geçmesi, kapiller borucukların alev yardımıyla uçlarının kapatılması sonucu buharlaşma ve çapraz kontaminasyon oranının minimalize edilmesi, borucukların sıcaklık geçirgenliğinin yüksek olması, denaturasyon, annealing ve ekstensiyon süreçleri için gerekli sıcaklıklara geçişin seri şekillenmesi sonucunda mispriming en aza indirgenmiştir. Bu sayede oluşan spesifik ürün (amplikon) net bir biçimde ortaya koyulabilmiştir.

6. Pipetler: 0.5-10 µl (Eppendorf, 1915724, Ependorf AG, Hamburg, Germany), 2-20 µl (Eppendorf, 1792574, Ependorf AG, Hamburg, Germany),10-100 µl (Eppendorf, 1740954, Ependorf AG, Hamburg, Germany), 20-200 µl (Eppendorf, 1858954, Ependorf AG, Hamburg, Germany), 100-1000 µl (Eppendorf, 1972784, Ependorf AG, Hamburg, Germany)'lik pipetler kullanıldı.

7. Jel Elektroforez Ünitesi ve Reagentler

7.1. Jel Elektroforez Ünitesi: Gel elektroforez ünitesi (BIO-RAD, 170-4472, Wide Mini Sub-Cell GT systems, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy) ve ünitenin 2 adet tepsisi (BIO-RAD, 170-4422, Mini Gel Caster, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy ve BIO-RAD, 170-4416, GT UVTP Gel Tray, 15x10 cm, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy) kullanıldı.

7.2. Jel Eletroforez Ünitesinin Tarakları: İki farklı tarak kullanıldı. Kullanılan taraklardan biri (BIO-RAD, 170-4445, Sub-Cell Systems Combs, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy) ile jel üzerinde 0.75mm kalınlıkta, 5.52 mm genişlikte ve 20.7 µl hacim alabilen 15 adet kuyucuk elde edildi. Taraklardan ikincisi ile (BIO-RAD, 170-4447, Sub-Cell Systems Combs, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy), 0.75 mm kalınlığında, 4.84 mm genişlikte 18.2 µl hacim alabilen 20 adet kuyucuk açıldı.

7.3. Güç Kaynağı: Ürünlerin göç etmesi için güç kaynağı **(**BIO-RAD, 164-5050, PowerPac Basic^{TM} Power Supply, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy) kullanıldı.

7.4. DNA Elektroforezinde Kullanılan Buffer'lar ve Solusyonlar

0.5 M Na_2EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) pH=8.0 1litre: 186.12 gr $Na_2EDTA\text{-}2H_2O$ (Sigma, E-5134, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (Disodium ethylenediaminetetraacetic acid, MW=372.24) 800 ml su içine katılıp, manyetik karıştırıcı (Janke&Kunkel, IKAMAG RH, IKA- Labortechnik)'da çok iyi karıştırılarak çözdürüldü. pH'yı 8'e ayarlamak için NAOH (~ 20 gr NAOH peleti) ilave edildi ve toplam hacim su ilavesi ile 1 lt'ye ayarlandı. Hazırlanan karışım 500 ml'lik şişelere bölünüp, otoklave edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

50X TAE (Tris-acetate-EDTA) 1 litre: 242 gr Tris (Roche, 708 968, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 500 ml su içinde çözdürüldü. 57.1 gr glacial acetic acid (Riedel-de Häen, 27 225, RdH Laborchemikalien GmbH & Co, Seelze, Germany) ve pH'sı 8 olan 0.5 M Na_2EDTA (Sigma, E-5134, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)'dan 100ml karışım içine ilave edildi. Karışımın hacmi 1 lt'ye tamamlandı. Karışım oda sıcaklığında saklandı.

1X TAE: 50X'lik TAE'den 1X'lik TAE hazırlandı. 20 ml 50X TAE, 980 ml ddH_2O içerisine ilave edildi.

Yükleme Solusyonu: 20 ml'lik mezur içine 3 gr gliserol, 9.5 ml H_2O, 0.5 ml 0.5M Na_2EDTA 25 mg bromphenol blue (Sigma, B-5525, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) ve 25 gr xylene cyanol (Sigma, Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany) ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında saklandı.

Ethidium Bromide Boya Solusyonu: 100 ml ddH_2O içerisine 1 gr ethidium bromide (Sigma, E-8751, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (2, 7-Diamino-10 ethyl-9phenyl-phenanthridinium bromide) ilave edilerek 10 mg/ml'lik stok solusyon hazırlandı. Stok karanlıkta +4 ˚C'de saklandı.

8. Karıştırıcı: Gel elektroforesisi sonrası jeldeki ürünlerin ethidium bromide ile boyanması aşamasında karıştırıcıdan (Stuart, Mini Orbital Shaker S05, Staffordshire, UK) yararlanıldı.

9. Ultraviyole Cihazı : Jelin boyanmasını takiben ürünler UV cihazında (Vilber Lourmat, 4x6 W- 312 nm tube, Power: 50 W, France) gözlendi.

10. Fotoğraf Makinası: UV'de gözlenen ürünler fotoğraf makinası (Polaroid GelCAm; Polaraid Corp., Cambridge, USA) ile görüntülendi.

11. Fotoğraf Filmi: Polaroid, 667, UK

12. Kanatlı Et Örnekleri: Temmuz- Ekim 2004 tarihleri arasında, Bursa'da bulunan 4 perakende tavuk eti satan marketten 5 farklı firmaya ait but, kanat, göğüs, boyun, bütün tavuk olmak üzere 100 adet tavuk eti örneği ile 3 süpermarketten 2 farklı firmaya ait göğüs, kuşbaşı-but, parça, kuşbaşı-fileto olmak üzere 100 adet hindi eti örneği alındı. Tavuk etleri; 4 farklı firmanın perakende satış yapan marketlerinden toplanan toplam 30 adet derili tavuk kanat eti örneği, 2 farklı firmadan örneklenen 20 adet derili tavuk but örneği, 4 farklı firmadan alınan (C firmasından 15 adet derili, G, F, E firmalarından derisiz boyun eti) toplam 30 adet boyun eti örneği, 2 farklı firmadan sağlanan 15 adet derili göğüs eti örneği ve 1 süpermarketten örneklenen derili 5 bütün tavuk eti örneği olmak üzere toplandı (Tablo-1). Hindi et örnekleri; 2 farklı firmadan sağlanan toplam 50 adet hindi göğüs eti örneği (derisiz), bir firmadan örneklenen 5 adet kuşbaşı (derisiz), 5 adet fileto (derisiz), 15 adet parça (derili), 10 adet kuşbaşı-fileto (derisiz), 15 adet but-kuşbaşı (derisiz) olmak üzere toplandı (Tablo-2). Marketlerde satışa sunulan tavuk ve hindi etleri rastgele seçilerek, herbir örnek fermuarlı naylon poşetlerde buz kalıpları ile laboratuvara getirildi. Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmaması için numuneler alınırken her numune için eldiven değiştirildi. Alınan örnekler, aynı gün içinde laboratuvara getirildi ve izolasyon çalışmalarına başlandı.

Tablo-1 Tavuk eti örneklerinin toplandığı firma kodları ve örneklemenin yapıldığı işletme türleri

Örnek Tipi	Firma kodu	Örnek sayısı (adet)	Örneklemenin yapıldığı işletme türü
Kanat	C	10	a
	D	5	a
		5	a
	E	5	a
	F	5	a
But	C	10	a
	D	10	a
Boyun	C	15	a
	G	5*	a
	F	5*	a
	E	5*	a
Göğüs	C	10	a
	D	5	a
Bütün tavuk	D	5	b
TOPLAM	5 ADET	100	5 ADET

*: derisiz
a: perakende satış yapan dükkan
b: Süpermarket

Tablo-2 Hindi eti örneklerinin toplandığı firma kodları ve örneklemenin yapıldığı işletme türleri

Örnek Tipi	Firma kodu	Örnek sayısı (adet)	Örneklemenin yapıldığı işletme türü
Göğüs	A	15	a
	B	20	a[1]
		15	a
Kuşbaşı	B	5	b
Fileto	B	5	b
Parça (Derili)	B	15	b
Kuşbaşı-fileto	B	10	b
But-kuşbaşı	B	15	c

a: Bir marketin soğuk hava deposu
a[1]: a marketinde satışa sunulan dökme et
b: A firmasının Bursa dağıtım bayii
c : Süper markette satışa sunulan et

YÖNTEM

1. Standart Bakteriyoloji ile Yapay Kontamine Örneklerde Arama Limiti Hesaplanması

Tavuk Eti Örneğinin *Salmonella*-ari Durumunun Tespiti: Yapay örnek hazırlamak için markette satışa sunulan bir bütün tavuk alındı. Öncelikle tavuk etinin *Salmonell*a-ari olması gerektiği için tavuk eti örneğinin *Salmonella* yönünden bakteriyolojik analizi yapıldı. Bu amaçla; FDA'ın BAM'ında tanımlanan *Salmonella* izolasyon işlemi uygulandı. Aseptik olarak alınan 25 gr tavuk eti örneği, steril bir parçalayıcı kabı içine konuldu ve ön-zenginleştirme amacıyla üzerine 225 ml steril LB broth eklenerek, 2 dk karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 1 saat inkube edildi ve ardından zenginleştirme amacıyla içerisinde 10 ml TTB bulunan tüpe 1 ml LB kültüründen inokule edildi. TTB kültür 37 ºC'de 18 saat inkübe edildikten sonra, TTB kültürden 20 µl alınarak XLT4 agara geçildi ve 35 ºC'de 24 saat inkube edildi (131). İnkubasyonun sonunda *Salmonella*-

ari olduğu tespit edilen tavuk eti örneği ile yapay kontamine örnek hazırlamak için kullanıldı.

***S*. Enteritidis 64K Saf Stok Kültüründeki Bakteri Sayısının Hesaplanması**: İzolasyon işlemine geçmeden önce, *S*. Enteritidis 64K izolatındaki bakteri sayısını hesaplamak için, 18 saatlik TTB'daki saf stok kültürün PBS (phosphate buffer saline)'de 10 katlı sulandırması yapıldı ve 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} sulandırmalardan 100 µl alınarak XLT4 agara geçildi. 35 ºC'de 24 saat inkubasyon sonrasında *S*. Enteritidis 64K saf stok kültüründeki bakteri sayısı hesaplandı.

Yapay Kontamine Örnek Hazırlanması: İzolasyon sonrası *Salmonella*-ari olduğu teyit edilen bütün tavuk etinden alınan 25'er gr 8 adet tavuk eti örneğinin her biri steril parçalayıcı kap içine koyularak her örnek üzerine 225'er ml steril LB eklenerek, 2 dk karıştırıldı. Homojenat içine *S*. Enteritidis 64 K saf kültürünün 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}'lik PBS sulandırmalarından 0.1 ml inokule edildi ve ön-zenginleştirme amacıyla 1 saat oda sıcaklığında inkube edildi. Aynı gün, LB'deki herbir ön-zenginleştirme kültüründen, 1'er ml 10 ml TTB ve 10 ml SCB içeren tüplere, 0.1'er ml 10 ml RVB içeren tüplere aktarıldı. TTB 37 ºC'de, SCB 35 ºC'de su banyosunda ve RVB 42 ºC'de 18 saat zenginleştirme amacıyla inkube edildi. Zenginleştirme işlemi sonrasında, herbir sulandırmaya ait kültürden 20 µl alınarak XLT4 agara geçildi. 35 ºC'de 24 saat inkube edildi. RVB, SCB ve TTB'un 18 saatlik kültürlerinden 1'er ml eppendorflara alındı ve kapiller PCR ile yapay kontamine örneklerde arama limiti hesaplanması için –20 ºC'de saklandı.

Yapay Kontamine Örnekten Standart Bakteriyoloji ile Arama Limiti Saptanması: 18 saatlik TTB, SCB ve TTB kültürlerinin 10^{0}'dan 10^{-7}'ye kadar olan sulandırmalarının XLT4 agarda 35 ºC'de 24 saat inkubasyon sonrasında üremeler değerlendirilerek, *Salmonella* koloni sayıları belirlendi.

2. Kapiller Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonu ve Arama Limiti Saptanması

Optimize Edilen Kapiller PCR Reaksiyonu: Tavuk etlerinden *Salmonella* PCR

deteksiyonu için test standart *S.* Enteritidis 64K suşu TTB'da üretilerek ve XLT4 agar üzerinde ve %5 koyun kanlı agarda saflık kontrolleri yapılarak kullanıldı ve farklı annealing sıcaklıklarında ve farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında kapiller PCR uygulanarak optimal parametreler saptandı.

25 µl'lik total reaksiyon hacmi içerisinde; 0.3 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ µl'lik) (Roche, 1 418 432, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2.5 µl 10X PCR buffer (3.5 mM $MgCl_2$) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.5 µl dNTP (deoxynucleotide triphosphate) karışımı (2mM) (Roche, 1 888 412, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 1'er µl her primerden (5 pmol/ml) (Iontek, Merter, İstanbul), 4 µl templete DNA, 0.25 µl bovine serum albumine (2.5 mg/ml) (Roche, 711 454, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 15.45 µl deiyonize su bulunmaktadır. Bu karışım brosilikat kapiller tüplere (Idaho Technologies, USA) çekildi. PCR inkubasyonları Model 1605 (Idaho Technologies, USA) marka bir DNA air thermal cycler kullanılarak gerçekleştirildi. Siklus şartları şu şekildedir: 94 ˚C'de 20 sn bir başlangıç inkubasyonunu (ön denaturasyon) takiben, 94 ˚C'de 5 sn denaturasyon, 50 ˚C'de 5 sn primer bağlanması (annealing) ve 72 ˚C'de 20 sn primer uzaması (extension) 30 siklus devam ettirildi. Son siklusu takiben, 72 ˚C'de 5 dk final bir uzama inkubasyonu daha uygulandı. PCR ürünleri 5 dk. buz üzerinde tutuldu.

Agaroz Jel Hazırlanışı: 15x10 cm GT UVTP Gel Tray (BIO-RAD, 170-4416, Sub-Cell GT Systems, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy)'de 0.75 cm yükseklikte %1.8'lik agaroz jel hazırlamak amacıyla, 1.62gr MP Agarose (Roche, 1 388 991, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) tartıldı ve 90 ml 1X TAE bulunan 250 ml'lik erlenmayer içine kondu ve 25 ml'lik erlenmayer ters çevrilerek 250 ml'lik erlenmayerin üzerine manyetik karıştırıcıda çözünme esnasında buharlaşma dolayısıyla hacim kaybını önlemek amacıyla kapak vazifesi görmesi için kapatıldı. Partikül kalmayıncaya dek manyetik karıştırıcı da (Janke&Kunkel, IKAMAG RH, IKA- Labortechnik) çözdürüldü ve sıcaklığı 60 ˚C'ye gelinceye dek soğutuldu ve ardından üzerine 2 adet (BIO-RAD, 170-4445, 170-4447, Sub-Cell Systems Combs, Bio-rad Laboratories, Milano, Italy) tarak yerleştirilen 15x10 cm GT UVTP Gel Tray (BIO-RAD, 170-4416, Sub-Cell GT Systems, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy) üzerine balon oluşmasına izin vermeksizin özenli bir şekilde döküldü. 20 dk kadar oda sıcaklığında jelin katılaşması için beklendi. Katılaşma şekillendikten sonra taraklar özenli bir şekilde jelden çıkarıldı.

PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Jel Elektroforezi: Ürünün gözlenmesi amacıyla agaroz jel üzerindeki kuyucuklara 4µl yükleme solusyonundan ve 10µl PCR ürünü konuldu. Elektroforez işlemi, 60 dk 60 V'da PowerPac Basic™ Power Supply (BIO-RAD, 164-5050, PowerPac Basic™ Power Supply, Bio-Rad Laboratories, Milano, Italy)'la gerçekleştirildi.

Ethidium Bromide ile Boyama: Elektroforez tamamlandıktan oluşan ürünlerin gözlenebilmesi için bir konteynır içinde karıştırıcı (Stuart, Mini Orbital Shaker S05, Staffordshire, UK) üzerinde 10 dk ethidium-bromide ile boyama yapıldıktan sonra UV (Vilber Lourmat, 4 x 6 W- 312 nm tube, Power: 50 W, France)cihazında bantlar gözlendi. Ürünün büyüklüğünü belirlemek için 100 bp'lık DNA Ağırlık Belirleyicisi 50µg (0,25µ/ µl) (Roche; DNA Molecular Weight Marker; XIV, 100 bp ladder, 1 721 933, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanıldı. Jel elektroforezi sonrasında PCR ürünleri Polaroid GelCAm (Polaroid Corp., Cambridge, USA) fotoğraf makinası ile görüntülendi.

Yapay Kontamine Örneklerde Kapiller Polimerize Zincir Reaksiyonu ile Arama Limiti : İzolasyon sonrası *Salmonella*-ari olduğu teyit edilen bütün tavuk etinden alınan 25'er gr 8 adet tavuk eti örneğinin her biri steril parçalayıcı kap içine koyularak her örnek üzerine 225'er ml steril LB eklenerek, 2 dk karıştırıldı. Homojenat içine *S.* Enteritidis 64K saf stok kültürünün 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}'lik PBS sulandırmalarından 0.1 ml inokule edildi ve ön-zenginleştirme amacıyla 1 saat oda sıcaklığında inkube edildi. Aynı gün, LB'deki herbir ön-zenginleştirme kültüründen, 1'er ml 10 ml TTB ve 10 ml SCB içeren tüplere, 0.1'er ml 10 ml RVB içeren tüplere aktarıldı. TTB 37 ºC'de, SCB 35 ºC'de su banyosunda ve RVB 42 ºC'de 18 saat zenginleştirme amacıyla inkube edildi. TTB, SCB, RV'nin 10^{0}'dan 10^{-7}'ye kadarki sulandırmalarından 1'er ml eppendorflara alındı ve yapay kontamine örneklerde arama limiti hesaplanması için optimize edilen kapiller PCR uygulandı.

3. Kanatlı Eti Örneklerinden Templeyt DNA hazırlanması: Bu amaçla**,** Soumet ve

arkadaşları (56) tarafından tanımlanan bakteri lizis metodunun, Çarlı ve arkadaşları (179) tarafından modifiye edilmiş şekli kullanıldı.

TTB, SCB ve RVB'un 18 saatlik zenginleştirme kültürlerinden *Salmonella* DNA'sı, Soumet ve arkadaşları (56) tarafından tanımlanan metodun modifikasyonu ile hazırlandı. Her örnek için, üç zenginleştirme broth'unun 18 saatlik kültürlerinden 1'er ml 8000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Dipte oluşan pelete dokunulmadan süpernatant atıldı. Pelet üzerine 1 ml FTS ilave edilip vortexlendi ve tekrar 3 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletin büyüklüğüne göre 50 µl veya 20 µl deionize su ilave edilip, pelet iyice süspanse edildi. Süspansiyon 200 µl'lik ince duvarlı PCR tüplerine (Axygen, 321-02-051, Axygen Scientific, Inc., Union City, USA) aktarıldı ve Air Thermal Cycler (Model 1605, Idoha Technology, USA)'da 95 °C'de 10 dk. kaynatıldıktan sonra, 14.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantın 4 µl'si PCR'da "template" olarak kullanıldı.

4. Kanatlı Eti Örnekleri için Kapiller PCR: 100 adet tavuk eti ve 100 adet hindi eti örneği olmak üzere toplam 200 adet kanatlı eti örneğinin FDA'nın BAM'ında tanımlanan metoda göre hazırlanan 18 saatlik RVB, TTB, SCB kültürlerine kapiller PCR uygulanmıştır (131).

5. Kanatlı Etleri için Bakteriyolojik İnceleme: Bu amaçla, "FDA'ın BAM'ında tanımlanan *Salmonella* izolasyon işlemi uygulandı (131). Aseptik olarak alınan 25 gr tavuk eti örneği, steril bir parçalayıcı kabı içine konuldu ve ön-zenginleştirme amacıyla üzerine 225 ml steril LB broth eklenerek, 2 dk karıştırıldı. Homojenat ön-zenginleştirme amacıyla 1 saat oda sıcaklığında inkube edildi. Aynı gün, LB'deki ön-zenginleştirme kültüründen, 1ml 10 ml TTB içeren tüpe aktarıldı. TTB 37 ºC'de, 18 saat zenginleştirme amacıyla inkube edildi. Zenginleştirme işlemi sonrasında, zenginleştirme kültüründen 20 µl alınarak XLT4 agara geçildi ve 35 ºC'de 24 saat inkübe edildi. İnkubasyon süresi sonunda pleytler üzerinde *Salmonella* şüpheli koloniler biyokimyasal ve antijenik olarak karakterize edildi (203).

BULGULAR

***S*. Enteritidis 64K Saf Stok Kültüründeki Bakteri Sayısı:** 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} sulandırmalarda sırasıyla, 901, 84, 2 bakteri sayıldı. *S*. Enteritidis 64K saf stok kültüründeki bakteri sayısı $6x10^{8}$ cfu ml^{-1} olarak hesaplandı.

Yapay Kontamine Örnekten Standart Bakteriyoloji ile Arama Limiti: TTB ve SCB'nin 10^{0}'dan 10^{-7}'ye kadar olan sulandırmalarına ait pleytlerde H_2S pozitif olan tipik *Salmonella* kolonileri gözlenirken, RVB'nin 10^{0}'dan 10^{-5}'e kadar olan sulandırmalarına ait pleytlerde üreme olmasına rağmen, 10^{-6} ve 10^{-7} sulandırmalarına ait pleytlerde üreme gözlenmedi (Tablo-3). Dolayısıyla standart bakteriyolojinin arama limiti TTB ve SCB için 6 cfu ml^{-1}, RVB için 600 cfu ml^{-1} olarak hesaplandı.

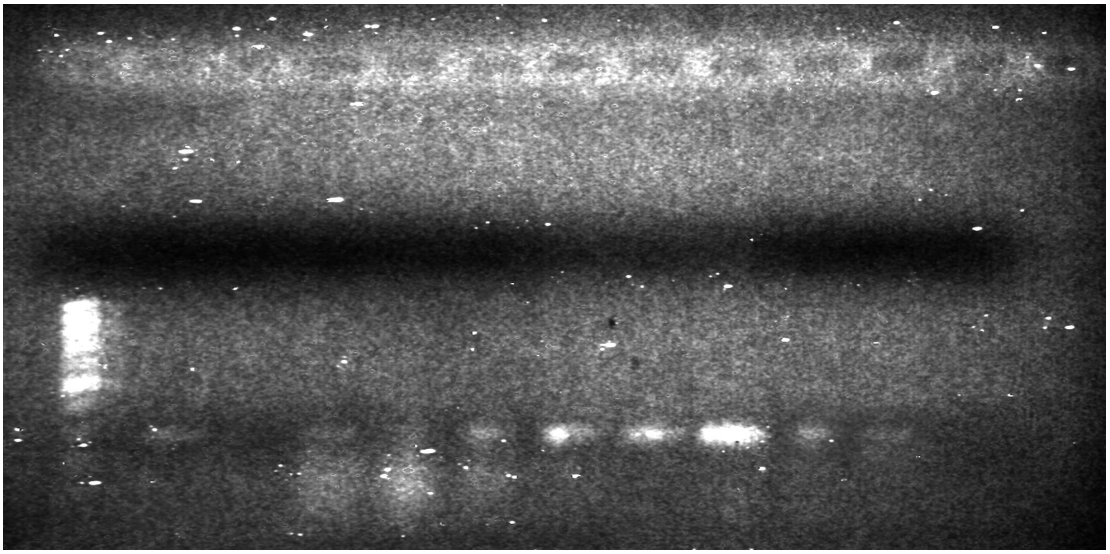
Yapay Kontamine Örneklerde Kapiller Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Arama Limiti: TTB kültürlerin tüm dilusyonlarında kapiller PCR ile *Salmonella* DNA'sı belirlendi. SCB kültürlerin sadece 10^{0}-10^{-3} sulandırmalarında kapiller PCR ile *Salmonella* DNA'sı detekte edilebilirken, 10^{-4}-10^{-7} dilusyonlarda herhangi bir bant oluşumu gözlenmedi. RVB kültürlerinde ise, 10^{0}-10^{-6} dilusyonlarda *Salmonella* DNA'sı belirlenirken, 10^{-7}'lik dilusyonda bant gözlenmedi (Tablo-3, Şekil-1, 2). Dolayısıyla kapiller PCR'ın TTB için arama limiti 6 cfu ml^{-1}, RVB için 60 cfu ml^{-1}, SCB için $6x10^{4}$ cfu ml^{-1}, olarak hesaplandı.

Tavuk ve Hindi Etlerinde Standart Bakteriyoloji ve Kapiller PCR ile *Salmonella* Kontaminasyon Oranları: Bursa'da Temmuz ve Eylül ayları arasında marketlerde satışa sunulan 100 adet tavuk eti örneği ve 100 adet hindi eti örneği olmak üzere toplam 200 adet kanatlı eti örneğinin; kapiller PCR ile % 4'ü (8 adet) , bakteriyoloji ile % 3'ü (6 adet) *Salmonella* spp. ile kontamine bulundu. Kapiller PCR ile tavuk etlerinde *Salmonella* kontaminasyon oranı, % 8 bulunurken, bakteriyoloji ile tavuk etlerindeki *Salmonella* yükü % 6 olarak tespit edildi. Hindi etlerinde ise bakteriyoloji ve kapiller PCR ile *Salmonella* tespit edilmedi (Tablo-4).

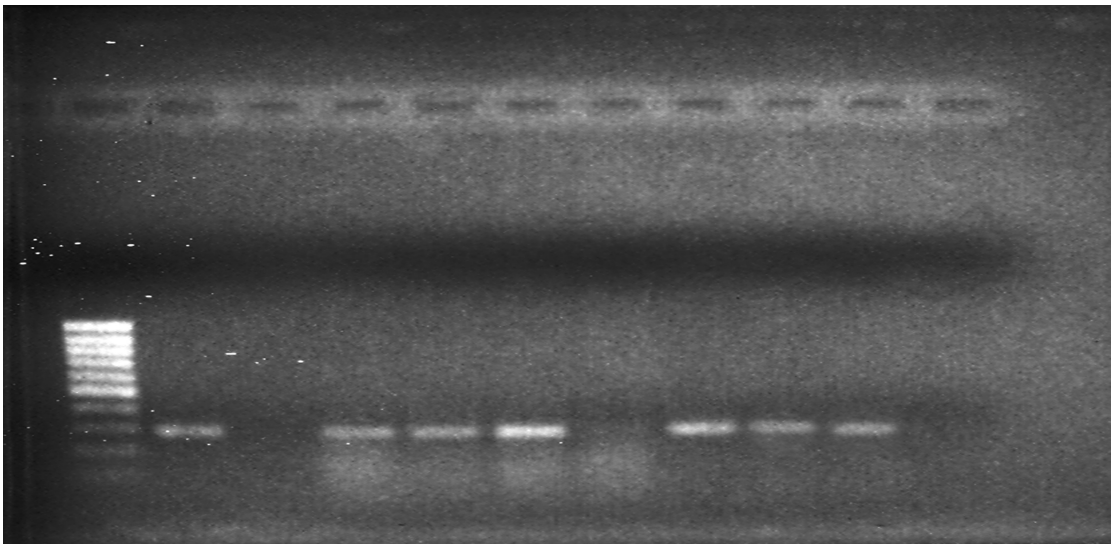
Tablo-3 *Salmonella* Enteritidis 64K saf kültürü ile yapay kontamine edilen tavuk eti örneklerinin 10 katlı sulandırmalarından kapiller PCR ve reizolasyon sonuçları (deteksiyon limitleri)

Sulandırmalar ve SE* sayıları	PCR¥	Reizolasyon
TTBø 10^0 ($6x10^7$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-1} ($6x10^6$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-2} ($6x10^5$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-3} ($6x10^4$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-4} ($6x10^3$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-5} ($6x10^2$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-6} ($6x10^1$ cfu ml^{-1})	+	+
TTB 10^{-7} ($6x10^0$ cfu ml^{-1})	+	+
SCBδ 10^0 ($6x10^7$ cfu ml^{-1})	+	+
SCB 10^{-1} ($6x10^6$ cfu ml^{-1})	+	+
SCB 10^{-2} ($6x10^5$ cfu ml^{-1})	+	+
SCB 10^{-3} ($6x10^4$ cfu ml^{-1})	+	+
SCB 10^{-4} ($6x10^3$ cfu ml^{-1})	-	+
SCB 10^{-5} ($6x10^2$ cfu ml^{-1})	-	+
SCB 10^{-6} ($6x10^1$ cfu ml^{-1})	-	+
SCB 10^{-7} ($6x10^0$ cfu ml^{-1})	-	+
RVB¢ 10^0 ($6x10^7$ cfu ml^{-1})	+	+
RVB 10^{-1} ($6x10^6$ cfu ml^{-1})	+	+
RVB 10^{-2} ($6x10^5$ cfu ml^{-1})	+	+
RVB 10^{-3} ($6x10^4$ cfu ml^{-1})	+	+
RVB 10^{-4} ($6x10^3$ cfu ml^{-1})	+	+
RVB 10^{-5} ($6x10^2$ cfu ml^{-1})	+	+
RVB 10^{-6} ($6x10^1$ cfu ml^{-1})	+	-
RVB 10^{-7} ($6x10^0$ cfu ml^{-1})	-	-

*SE: *Salmonella* Enteritidis
δ SCB: Selenite Cystine broth
øTTB: Tetrathionate broth
¢RVB: Rappaport Vassiliadis broth
¥PCR: Polymerase chain reaction; Polimeraz zincir reaksiyonu



Şekil-1 Yapay kontamine edilen tavuk etinin 18 saatlik TTB (Tetrathionate broth) kültürlerinin kapiller PCR ile arama limitleri;
1. Kulvar: DNA Moleküler Ağırlık Marker'ı, Roche, XIV, 100 bp; Kulvar 2: *S.* Enteritidis 64K DNA'sı (pozitif kontrol) kullanılarak izole edilen 284 bp PCR ürünü; Kulvar 3: deiyonize su (negatif kontrol) kullanılarak elde edilen PCR ürünü; Kulvar 4-11: sırasıyla $6x10^{7}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{6}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{5}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{4}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{3}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{2}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{1}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{0}$ cfu ml^{-1}'lik kültür kullanılarak elde edilen PCR ürünleri



Şekil-2 Yapay kontamine edilen tavuk etinin 18 saatlik RVB (Rappaport Vassiliadis) kültürlerinin kapiller PCR ile arama limitleri;
1. Kulvar: DNA Moleküler Ağırlık Marker'ı, Roche, XIV, 100 bp; Kulvar 2: *S.* Enteritidis 64K DNA'sı (pozitif kontrol) kullanılarak izole edilen 284 bp PCR ürünü; Kulvar 3: deiyonize su (negatif kontrol) kullanılarak elde edilen PCR ürünü; Kulvar 4-10: sırasıyla $6x10^{7}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{6}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{5}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{4}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{3}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{2}$ cfu ml^{-1}, $6x10^{1}$ cfu ml^{-1}'lik kültür kullanılarak elde edilen PCR ürünleri

Tablo-4 Tavuk eti ve hindi eti örneklerinden kapiller PCR ve *Salmonella* izolasyonu sonuçları

Örnek Tipi	Örnek sayısı (adet)	PCR[¥] adet (%)	Bakteriyoloji adet (%)
Tavuk eti	100	8 (% 8)	6 (% 6)
Hindi eti	100	0 (% 0)	0 (% 0)
TOPLAM	200	8 (% 4)	6 (% 3)

[¥]PCR: Polymerase chain reaction; Polimeraz zincir reaksiyonu

C firmasının 10 adet derili kanat eti örneğinden, standart bakteriyoloji ve kapiller PCR ile sırasıyla 4 adet (% 13.33) Serogrup D'de yer alan *Salmonella* izole edilirken, kapiller PCR ile toplam 8 adet (% 26. 66) *Salmonella* pozitif örnek belirlendi (Tablo-5). Bakteriyoloji ile pozitif bulunan 4 kanat eti örneği kapiller PCR'la da tespit edildi.

Birincil Zenginleştirme kültürlerinin kapiller PCR üzerine etkinliği yönünden sonuçlar; TTB-PCR kombinasyonuyla 8 adet (% 26.66), SCB-PCR kombinasyonu ile 5 adet (% 16.66), RVB-PCR kombinasyonu ile 7 adet (% 23.33) kanat eti örneğinde *Salmonella* kontaminasyonu belirlendi (Tablo-5).

Aynı firmanın (C firması) toplam 15 adet derili boyun eti örneğinden; bakteriyoloji ile 2 adet (% 6.66) *Salmonella* spp. izole edilirken, kapiller PCR ile bu örneklerde herhangi bir *Salmonella* kontaminasyonu (% 0.00) belirlenmedi. C firmasının 2 adet boyun eti örneğinden izole edilen *Salmonella* spp. izolatlarının her ikisi de, *Salmonella* "O" Antiserum Poly A (Difco, 2534-47-6, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) ve *Salmonella* O Antiserum Factor 5 (2660-47-2, Difco) ile aglutinasyon veren Serogrup B'de yer alan *Salmonella* olarak belirlendi.

Toplam 100 adet tavuk eti örneğinde TTB-PCR, RVB-PCR, SCB-PCR ve bakteriyoloji ile *Salmonella* kontaminasyon oranları sırasıyla; % 8, % 7, % 5 ve % 6 bulundu (Tablo-5).

Tablo-5 Tavuk eti örneklerinin TTB, RVB, SCB olmak üzere 3 farklı zenginleştirme yapılarak kapiller PCR ve TTB'de zenginleştirmeden sonraki bakteriyoloji sonuçları

Örnek Tipi	Örnek Sayısı (adet)	TTB[ø]-PCR adet (%)	RVB[¢]-PCR adet (%)	SCB[ð]-PCR adet (%)	Bakteriyoloji adet (%)
Kanat	30	8 (% 26.66)	7 (% 23.33)	5 (% 16.66)	4 (% 13.33) *Salmonella* Serogrup D
But	20	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)
Boyun	30	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	2 (% 6.66) *Salmonella* Serogrup B
Göğüs	15	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)
Bütün tavuk	5	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)	0 (% 0)
TOPLAM	100	8 (% 8)	7 (% 7)	5 (% 5)	6 (% 6)

[ø]TTB: Tetrathionate broth
[¢]RVB: Rappaport Vassiliadis broth
[ð]SCB: Selenite Cystine broth
PCR: Polymerase chain reaction, polimerize zincir reaksiyonu

İncelenen hindi eti örneklerinde farklı zenginleştirme besiyerlerinden alınan örneklerle uygulanan kapiller PCR ve bakteriyoloji ile *Salmonella* bulunamadı.

İncelenen toplam 75 adet derili tavuk eti örneğinden, 8'i kanat, 2'si boyun eti olmak üzere 10'nunda *Salmonella* kontaminasyonu tespit edildi. Derisiz tavuk eti örneklerinde hem kapiller PCR hem de bakteriyoloji ile *Salmonella* saptanmadı..

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmanın ilk basamağında kullanılan test sistemlerinin (standart bakteriyoloji ve kapiller PCR) arama sınırlarını (deteksiyon limitlerini) ölçmenin anlamlı olacağı düşünüldü. *Salmonella* izolasyonu amacıyla standart 2 uluslararası yöntem olarak FDA ve ISO'da tanımlananlardan, FDA yönteminin kullanımına daha önceki bir çalışmamız dikkate alınarak karar verildi (183). *Salmonella* taramalarında standart olarak kullanılan, FDA bakteriyolojisinin saptadığı minimum *Salmonella* sayısı değişik birincil zenginleştirme besiyerinde farklı bulundu. Bu sonuçlara göre, bakteriyoloji ile birincil zenginleştirme TTB ve SCB kullanımının, diğer birincil zenginleştirme besiyeri olan RVB'tan daha duyarlı bir biçimde *Salmonella* saptayabildiği görüldü. TTB ve SCB'nin bakteriyoloji ile saptama limiti RVB'den100 kat daha fazlaydı. Böylece, yapay kontamine örneklerden standart bakteriyoloji ile arama limitinin saptanma deneyi sonucunda, TTB ve SCB'nin RVB'ye göre bakteriyoloji ile daha güvenilir ve duyarlı bir biçimde kullanılabileceği saptandı. Daha sonra sadece TTB'nin birincil zenginleştirme besiyerleri olarak doğal tavuk eti örneklerinden *Salmonella* izolasyonu amacıyla kullanımı tercih edildi. Bunun yanısıra kapiller PCR çalışmalarında ise 3 farklı birincil zenginleştirme besiyerini de kullanmaya ve sonuçlarının nasıl olacağını görmeye karar verildi.

Gıdalardan PCR ile *Salmonella* aranması amacıyla templeyt hazırlamada birçok yöntem kullanılmıştır (56, 178). Bazı çalışmalarda hiçbir önzenginleştirme yapılmaksızın gıda örneklerinden templeyt hazırlanmış (55, 101), bazılarında birincil zenginleştirme ve immunomanyetik separasyon yöntemleri ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır (153, 194). Daha önceki deneyimlerimize (179, 204) dayanarak, bu çalışmada bakteriyolojinin birincil zenginleştirme basamağından kapiller PCR örneği ve templeyt hazırlamanın anlamlı olacağını düşünerek bu çalışmanın ikinci basamağı olarak, optimize edilen kapiller PCR'nun *Salmonella* yapay kontamine TTB, RVB, SCB birincil zenginleştirmelerinden hazırlanan templeytlerle yapılan kapiller PCR'nda *Salmonella* arama sınırlarının sırasıyla, 6 cfu, 60 cfu ve $6x10^4$ cfu ml^{-1} olduğu hesaplandı. Bu sonuçlara dayanarak TTB'den kapiller PCR için templeyt hazırlamanın daha anlamlı olacağı belirlenmiş oldu.

Bu araştırmada birincil zenginleştirme besiyerlerinden TTB'nin *Salmonella* ile yapay kontamine tavuk eti örneklerinden templeyt hazırlanarak yapılan kapiller PCR'da verdiği üstün duyarlılık, aynı şekilde doğal kontramine gıda örneklerinden kapiller PCR yapıldığı

zamanda saptandı (Tablo-5). Bu durum TTB'un tavuk etlerinden *Salmonella* aramada, kapiller PCR içinde templeyt hazırlamak için iyi bir ortam olduğunun teyiti niteliğindeydi. Benzer sonuçlara örnek olarak, Lin ve Tsen (191)'in yaptığı çalışma verilebilir. Araştırmacılar bu çalışmalarında Laktoz-TTB kombinasyonu içinde yapay kontamine örnek hazırlayarak templeyt hazırlamışlar ve testin duyarlılığını 1 cfu bulmuşlardır. Yine Makino ve arkadaşları (191)'nın yaptığı bir başka çalışmada sığır dışkısı ve et örneklerini TTB'nin bir modifikasyonu olan TTB-Hajna ile yaptıkları birincil zenginleştirmelerde PCR duyarlılığını aynı şekilde 1 cfu gr^{-1} olarak tespit etmişlerdir. Çarlı ve arkadaşları (179), tavuk barsak örnekleri içeren TTB-Hajna ve TTB'yi yapay olarak *Salmonella* suşları ile kontamine ederek yaptıkları denemelerinde PCR duyarlılıklarını, *S*. Enteritidis ile 3 cfu, *S*. Typhimurium ile 3 cfu, *S*. Gallinarum ile 7 cfu olarak saptamışlardır. Eyigör ve arkadaşları (183), yapay kontamine ettikleri barsak örneklerinin TTB'de zenginleştirmenin ardından saptama limitini bu çalışmayla örtüşür şekilde 6 cfu ml^{-1} olarak bulmuşlardır. Çalışmamız ve yukarıdaki araştırma sonuçları PCR için templeyt hazırlamada, birincil zenginleştirme besiyeri olarak TTB'yi kullanmanın yararlı olduğunu gösterir niteliktedir. Bu sonuçların aksine, Stone ve arkadaşları (192), hayvan dışkılarından *Salmonella* PCR için primer zenginleştirme besiyeri olarak RVB, TTB, SCB ve BHI broth'u kullanmışlar ve sadece SCB ile 100 cfu ml^{-1}, BHI ile ise 80 cfu ml^{-1} duyarlılık saptamışlardır. Araştırmacılar, TTB ve RVB'nin PCR için inhibitör olduğunu bildirmişlerdir. Lin ve arkadaşları (171), süt ve tavuk eti örnekleri ile yaptıkları çalışmada sadece SCB'yi birincil zenginleştirmede kullanmışlar ve PCR duyarlılığını 1-9 cfu olarak saptamışlardır. TTB'nin kanatlı eti örneklerinde üstün seçiciliği, *Salmonella* üremesini provoke ederken, yarışmacı mikroflorayı inhibe etmesi ve bundan dolayı PCR ile daha fazla pozitif sonuç elde edilmesi nedenlidir. Aynı zamanda, *Salmonella* PCR için zenginleştirme broth'u seçimi örnek tipine de bağlı olabilir (54, 192). Çünkü örnekteki kompozisyon farklılıkları zenginleştirme ortamını değiştirebilir ve hatta *Salmonella* üremesini inhibe edebilir. Örneğin Stone ve arkadaşları (192), memeli (sığır, at) dışkıları ve doku örneklerinde BHI broth'u *Salmonella* üremesi için en iyi zenginleştirme besiyeri olarak tanımlarken, Lin ve Tsen (191), insan dışkı örnekleri ve gıda örnekleri için Laktoz-TTB kullanımının avantajlı olacağını rapor etmişlerdir. Bu çalışmaların dışında, Schrank ve arkadaşları (205), SCB ve TTB kullanımının, tavuk tüyü tozlarından PCR ile *Salmonella* duyarlılığını değiştirmediğini ve duyarlılığın her iki zenginleştirme broth'u ile PCR yapıldığında 5.7 cfu olduğunu bildirmişlerdir. Ancak yazarlar, TTB'nin *Salmonella* ile deneysel infekte edilen

bir günlük civcivlerden alınan sekum ve iç organ örneklerinin zenginleştirmelerinde daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Doğal kontamine farklı kanatlı örneklerinin ve gıda örneklerinin önzenginleştirme ve birincil zenginleştirmelerinde kullanılan farklı besiyerlerinin *Salmonella* izolasyonu ve PCR'ı üzerine birçok çalışma vardır (57, 59, 171, 132, 133, 206, 207). Son yıllarda birçok araştırıcı primer zenginleştirme yerine önzenginleştirme besiyerlerinden direk örnek alarak PCR templeyti hazırlamışlardır (208-210). Bu çalışmada, gıdalardan *Salmonella* izolasyonunun doğal süreci içinde bir basamak olan önzenginleştirmede LB kullanıldığı halde, bu aşamada PCR için templeyt örneklemesi yapmadığından, bu konuda bir yoruma gitmemiz olanaklı olmamıştır.

Bu çalışmada, kapiller PCR ile bakteriyoloji sonuçları karşılaştırıldığında TTB ve RVB birincil zenginleştirmelerden yapılan kapiller PCR'ın bakteriyolojiden daha duyarlı bir biçimde *Salmonella* saptadığı gözlendi (Tablo-5). Ancak SCB'den yapılan kapiller PCR ile *Salmonella* aranması, standart bakteriyolojinin altında kalmıştır. Bu durum, Eyigör ve arkadaşları (183)'nın kanatlı örnekleri ile yaptıkları çalışmalarının bulgularının bir kısmı ile örtüşür gözükmektedir. Bunun bir nedeni araştırmalarında primer zenginleştirme besiyeri olarak bu çalışmadaki besiyerlerinden biri olan TTB kullanmaları olabilir. Bir diğer benzerlik ise kullandıkları PCR sisteminin kapiller PCR'ın modifikasyonu oluşudur. Aynı durum ayrıca, laboratuvarımızda daha önce tavuk dışkılarıyla yapılan bir başka çalışmada da rapor edilmiştir (179). Kapiller PCR olmasa da, PCR ile bakteriyolojiyi *Salmonella* taramalarında kullanan ve karşılaştıran birçok araştırmacı vardır (201, 202, 205, 207).

Salmonella aranmasında PCR'unun bakteriyolojiye göre etkin olduğunu saptayan araştırmalara ilk örnek Fratamico (166)'nun çalışmasını verebiliriz. Bu çalışmalarında hindi etlerinde kültür ile % 16.8 oranında *Salmonella* saptarken, PCR ile % 24 oranında pozitivite saptamışlardır. Aynı araştırmacılar kültür ve PCR ile tavuk etlerinde % 18 ve % 28.5 oranlarında pozitiflik belirlemişlerdir. Yine başka bir araştırmada 103 değişik kanatlı örneği tümüyle değerlendirildiğinde *Salmonella* varlığı PCR ile 41 adet örnekte, bakteriyoloji ile 18 adet örnekte saptanmıştır (211). PCR'nun bakteriyolojiye göre benzer sonuçları farklı klinik ve doğal örnekler içeren başka araştırmaları da literatürde görmek olanaklıdır (200, 201, 204). Genel olarak PCR'ın *Salmonella* bakteriyolojisine göre etkinliğinin nedeni olan faktörler şu şekilde sıralanmaktadır: Doğal kontamine örneklerdeki salmonellalar atipik biyokimyasal karakter gösterebilirler ve *Salmonella*

hücreleri canlı fakat kültürleri yapılabilir statülerde olmayabilirler (101, 180).

Salmonella aranmasında PCR'ın bakteriyolojiye göre daha etkin olduğunu rapor eden çalışmaların tersine, bakteriyolojinin daha duyarlı olduğunu saptayan araştırmalar da bulunmaktadır (157, 179). Örneğin Soumet ve arkadaşları (157), 207 tavuk eti örneğini analiz etmişler ve bu örneklerin kültür ile 7 adedinde daha fazla *Salmonella* izole etmişlerdir. Çarlı ve arkadaşları (179), 50 ileosekal örneğin 35'ini PCR ile pozitif bulurken, bakteriyoloji ile 42 pozitivite saptamışlardır. Bu çalışmalarda yazarlar, bakteriyolojinin PCR üstünlüğünün nedenlerini gıda ve barsak örneklerinde PCR'unu inhibe edici maddelerin, tüm purifikasyon işlemlerinden sonra bile kalıcı olması ve örnekler içinde PCR deteksiyon limiti altında *Salmonella* DNA'sının PCR reaksiyonuna girmesi şeklinde vermişlerdir.

PCR ve bakteriyolojinin biribirine üstünlüklerinin yanısıra, sonuçlarının aynı şekilde rapor edildiği çalışmalar da bulunmaktadır (185, 197). Bu çalışmaların içinde de birincil zenginleştirme basamağından PCR templeyt örnekleri alındığı için, eğer örnek içinde yeterli sayıda *Salmonella* içerilirse, PCR ve bakteriyoloji de hata yapılmadığı da var sayıldığında, bu tip bir sonucun normal olacağı da bildirilmektedir.

Bu çalışmada, kanat, but, boyun, göğüs ve bütün tavuk olmak üzere toplanan tavuk eti örneklerinden, en çok *Salmonella* izolasyonu, kanat (derili) bölgesinden yapılmıştır. Bu bölgeyi ikinci sırada boyun (15'i derili, 15'i derisiz) bölgesi izlemektedir. Bu çalışma ile paralel olarak, araştırmacılar, boyun ve kanatlarda *Salmonella* izolasyon oranının yüksek olmasının nedenini; kesim aşamasında hayvanların baş aşağı ayaklardan asılması sonucu suyun ayaklardan akarak, su damlalarının en son boyun ve kanatlara toplanması ve kontamine mikrofloranın potansiyel olarak buralarda lokalizasyon göstermesi şeklinde açıklamışlardır (42, 43, 91).

Bu çalışmada, FDA'ın BAM'ında yer alan etlerden *Salmonella* izolasyon prosedürüne bağlı kalarak 25'er gr kanatlı eti örneği alındı (131). Kotula ve arkadaşları (42), broiler derilerinden yaptıkları *Salmonella* izolasyon çalışmasında 1, 5, 10'ar gr aldıkları boyun, göğüs, vent derisi örneklerinde, 5-10'ar gram örnekten *Salmonella* izolasyon şansının 1 gr örneğe göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, alınan deri miktarının fazla olmasının intrasellüler bakteri olan *Salmonella*'nıun izolasyon şansını arttırdığını bulmuşlardır. Buna karşın; FDA'ın BAM'ında alınması gereken miktarı 25 gr belirtilse de, araştırmacılar 25 gr deriyi örnek başına toparlamanın güçlüğünden dolayı örnekleme miktarını en fazla 5-10 gr tutulmasının daha uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Araştırmacılar *Salmonella* izolasyon oranının 5 ve 10 gr göğüs derisinde sırasıyla; 3.77 $\log_{10}$ cfu/gr, 3.82 $\log_{10}$ cfu/gr, boyun derisinde ise sırasıyla; 3.55 $\log_{10}$ cfu/gr, 3.66 $\log_{10}$ cfu/gr olduğunu ve karkas kalitesine zarar vermemesi açısından boyun derisinden yapılacak örneklemenin *Salmonella* izolasyonu için uygun lokalizasyon olduğu kararına varmışlardır. Tüm araştırmalardan ve çalışmamızdan çıkan sonuç; kanatlı et örneklerinde örneklemenin yapılacağı yer kadar, alınması gereken örnek miktarının *Salmonella* izolasyon şansını arttırdığı yönündedir.

Çalışmamızda, C firmasına ait derili boyun eti ve derili kanat eti örneklerinde *Salmonella* kontaminasyonuna rastlanırken, derisiz boyun eti örneklerinde *Salmonella* yüküne rastlanmamıştır. Derili et örneklerinde izolasyonun daha yüksek olmasının sebebi şu şekilde açıklanabilir: tavuklar yetiştirme ve taşınma şekillerinden dolayı, işleme ünitelerine derileri üzerinde *Salmonella*'yı taşımaktadır. *Salmonella* bakterileri öncelikle deri üzerindeki su tabakası ile yakalanmakta ve ardından suya daldırıldıktan sonra sırt ve deri üzerinde yarık ve çatlaklar tarafından tutuldukları yerlerde deri içerisine göç etmektedir (212). Çalışmaya paralel olarak, Uyttendaele ve arkadaşları (43), Belçika'da perakende kanatlı eti satan dükkanlarda yaptıkları izolasyon çalışması sonucunda; derili kanat ve but örneklerinden 183 örneğin 86'sını *Salmonella* ile kontamine bulurken, derisiz işlenmiş tavuk eti örneklerinde *Salmonella* kontaminasyon oranını 63/182 bulmuşlardır.

Bu çalışma ile Bursa'da Temmuz-Eylül ayları arasında perakende satış yapan dükkanlardan örneklenen tavuk ve süper marketlerde satışa sunulan hindi etlerinde *Salmonella* insidensi sırasıyla, % 8 ve % 0 bulundu. Tavuk etlerinden yapılan izolasyon sonucunda serogrup D ve serogrup B'de yer alan *Salmonella*'lar tespit edilmiştir. Dünyada kanatlı etlerinden *Salmonella* izolasyon çalışmaları ile ilgiler veriler genel bilgiler kısmında verildiği için burada tekrar yinelenmeyecektir. Fakat ülkemizde konuyla ilgili çalışmalardan birkaç örnek vermek gerekirse; Bekar ve arkadaşları (213), tavuk mezbahalarını *Salmonella* yönünden taradıkları çalışmalarında, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Pendik Araştırma Enstitüsü, Bornova Hayvan Aşıları Merkez Kontrol Enstitüsü ve Adana Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nde sırasıyla inceledikleri 1704 örnekte *Salmonella* kontaminasyon oranını % 5.046, 1356 örnekte % 1.17, 1580 örnekte % 0.69 ve 1598 örnekte % 0.18 olarak tespit etmişlerdir. Sarımehmetoğlu ve arkadaşları (214), 3 farklı kesimhanenin farklı platformlarından topladıkları tavuk etleri ile yaptıkları çalışmada toplam 270 örnekten 89'unun *Salmonella* ile kontamine olduğunu bildirirken, Kalender ve Muz (215), 365'i kesimhaneden toplanan ve 162'si hastalık

şüphesiyle Elazığ Veteriner ve kontrol Araştırma Enstitüsüne getirilen toplam 527 tavuğun %57'sinden *Salmonella* izole etmişlerdir. Çalışmamızda kanatlı etlerinden *Salmonella* aranması konusunda kapiller PCR kullanımı literatürde yapılmış ilk denemedir. Bu çalışma ile toplam PCR süresi, konvansiyonel PCR'a göre 3-4 saat arasında azaltılmış oldu (179, 216). Kapiller PCR'da zamanın kısa olmasının nedeni, kapiller borucuklar çevresinde dönen havanın ısıtılmasıdır. Konvansiyonel PCR'da ise bilindiği gibi, PCR tüpleri çevresini saran metal bloklar çevresinde dönen sıvı ısıtılmaktadır (161, 216, 217). Bu durum annealing, ekstensiyon ve denaturasyon sürelerinin uzamasına neden olmaktadır. Kapiller PCR'da, PCR basamaklarında oluşan zaman kısalmasıyla primerlerin yanlış bağlanması şansı en aza indirgendiği için, spesifik PCR ürünü alma miktarında da artış oluşu bir başka özelliğidir. (161, 216, 217).

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla tavuk ve hindi etlerinde bakteriyolojik yönteme paralel olarak *Salmonella* aranması için, diğer konvansiyonel PCR'lara göre çok daha kısa sürede ve etkin bir şekilde sonuç veren kapiller *Salmonella* PCR testi geliştirilmiş oldu.

KAYNAKLAR

1. BYRD JA, DELOACH JR, CORRIER DE, NISBET DJ, STANKER LH. Evaluation of *Salmonella* serotype distrubition from commercial broiler hatcheires and grower houses. Avian Diseases, 43: 39-47, 1999.
2. BARNHART HM, DREESEN DW, BASTIEN R, PANCORBO OC. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. Journal of Food Protection, 54: 488-491, 1991.
3. GIESSEN AW, PETERS R, BERKERS PA, JANSEN WH, NOTERMANS SH. *Salmonella* contamination of poultry flocks in the Netherlands. Veterinary Quarterly, 13: 41-46, 1991.
4. LIMAWONGPRANEE S, HAYASHIDANI H, OKATANI AT, ONO K, HIROTA C, KANEKO K, OGAWA M. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. Journal of Veterinary Medicine Science, 61: 255-259, 1999.
5. ÇARLI KT. Bursa bölgesinde yumurta ve broiler tipi tavuklardan izole edilen *Salmonella* türleri üzerinde bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Doğa Türk Veteriner Hayvancılık Dergisi, 14: 428-438, 1990.
6. ÖZDEMİR Ü. Kanatlılardan izole edilen *Salmonella* suşlarının identifikasyonunda kullanılan metotlar üzerinde araştırmalar. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Doktora Tezi, Bursa, 1995.
7. GONCAGÜL G, ÇARLI KT. Tavuklardan *Salmonella* izolasyonunda kloakal svab ve drag svab metotlarının karşılaştırılması. Veterinarium, 10: 31-33, 1999.
8. ÇARLI KT, KAHRAMAN MM, ŞEN A, SÖNMEZ G. Septicemia and blindness by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella essen* in adult chicken. III. International Poultry and Poultry Diseases Symposium, Manisa, page 56-57, 1996.
9. BETANCOR L, SCHELOTTO F, MARTINEZ A, PEREIRA M, ALGORTA G, RODRIQUEZ MA, VIGNOLI R, CHABALGOITY JA. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. Journal of Clinical Microbiology, 42: 1155-1162, 2004.
10. ZHAO S, OAIYUMI S, FRIEDMAN S, SINGH R, FOLEY SL, WHITE DG, McDERMOTT PF, DONKAR T, BOLIN C, MUNRO S, BARON EJ, WALKER RD. Characterization of *Salmonella* enterica Serotype Newport isolated from humans and food animals. Journal of Clinical Microbiology, 41: 5366-5371, 2003.
11. TANSEL Ö, EKUKLU G, OTKUN M, TATMAN-OTKUN M, AKATA F, TUĞRUL M. A food-borne outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis. Yonsei Medical Journal, 44: 198-202, 2003.
12. ANG-KÜÇÜKER M, TOLUN V, HELMUTH R, RABSCH W, BÜYÜKBABA BORAL Ö, TÖRÜMKÜNEY-AKBULUT D, SUSEVER S, ANĞ Ö. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in İstanbul, Turkey. Clinical Microbiology and Infection, 6: 593-599, 2000.
13. ÇİFTÇİ E, GÜRİZ H, AYSEV AD, İNCE E, ERDEM B, DOĞRU Ü. *Salmonella* bacteriaemia in Turkish children: 37 cases seen in a university hospital between

1993 and 2002. Annals of Tropical Pediatrics, 24: 75-80, 2004.
14. WEGENER HC, HALD T, WONG DLF, MADSEN M, KORSGAARD H, BAGER F, GERNER-SMIDT P, MOLBAK K. *Salmonella* Control Programs in Denmark. Emerging Infectious Diseases, 9: 774-780, 2003.
15. SHIVAPRASAD HL. Pullorum disease and fowl typhoid, In "Diseases of Poultry", 10th, Iowa State University Press, Iowa, USA, page 82-96, 1997.
16. EDEL W. *Salmonella enteritidis* eradication programme in poultry breeder flocks in The Netherlands. International Journal of Food Microbiology, 21: 171-178, 1994.
17. MCLLROY SG, MCCRACKEN RM, NEILL SD, O'BRIEN JJ. Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. Veterinary Record, 125: 545-548, 1989.
18. GAST RK. Paratyphoid infections, In "Diseases of Poultry", 11th, Iowa State University Press, Iowa, USA, page 583-613, 2004.
19. HUMBERT F, CARRAMINANA JJ, LALANDE F, SALVAT G. Bacteriological monitoring of *Salmonella* enteritidis carrier birds after decontamiantion using enrofloxacin, competititve exclusion and movement of birds. Veterinary Record, 141: 297-299, 1997.
20. NOTERMANS S, VAN DE GIESSENA, HENKEN AM. Future reqirement for diagnosis and monitoring of pathogenic microorganisms in poultry and eggs, p. 9-14. In C. J. Thorns and p. Jones (ed.), COST Action 97 pathogenic microorganisms in poultry and eggs. Monitoring prodcedures, rapid detection methods and techniques. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg, Belgium.
21. United States Dpartment of Agriculture Animal and Plant health Inspection Service. 1996. The National Poultry Improvement Plan. Subpart B. Bacteriological examimnation procedure. § 147-11. Laboratory procedure recommended for the bacteriological examination of *Salmonella*, p. 14-19. United States Department of Agriculture, Washington DC.
22. BÄUMLER AJ, TSOLIS RM, FICHT TA, ADAMS LG. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. Infection and Immunity, 66: 4579-4587, 1998.
23. MARCUS SL, BRUMELL JH, PFEIFER CG, FINLAY BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes and Infections, 2: 145-156, 2000.
24. GOOSNEY DL, KNOECHEL DG, FINLAY BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: Masters of Host Cytoskeletal Exploitation. Emerging Infectious Diseases, 5: 216-223, 1999.
25. GALAN JE. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. Current Opinion in Microbiology, 2: 46-50, 1999.
26. WIGLEY P, JONES MA, BARROW PA. *Salmonella enterica* serovar Pullorum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system for virulence and carriage in the chicken. Avian Pathology, 31: 501-506, 2002.
27. JONES MA, WIGLEY P, PAGE KL, HULME SD, BARROW PA. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. Infection and Immunity, 69: 5471-5476, 2001.
28. HENSEL M. *Salmonella* pathogenicity island 2. Molecular Microbiology, 36: 1015-1023, 2000.
29. ROTGER R, CASADESUS J. The virulence plasmids of *Salmonella*. International Microbiology, 2: 177-184, 1999.

30. KINGSLEY R, RABSCH W, STEPHENS P, ROBERTS M, REISSBRODT R, WILLIAMS PH. Iron supplying systems of *Salmonella* in diagnostics epidemiology and infection. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 11: 257-264, 1995.
31. MUIR WI, BRYDEN WL, HUSBAND AJ. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. Development and comperative Immunology, 24: 325-342, 2000.
32. METHNER U, BARROW PA, BERNDT A, STEINBACH G. Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. International Journal of Food Microbiology, 49: 35-42, 1999.
33. ZHANG-BARBER L, TURNER AK, BARROW PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. Vaccine, 17: 2538-2545, 1999.
34. MEAD GC. Prospects for "Competitive Exclusion" treatment to control Salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. The Veterinary Journal, 159: 111-123, 2000.
35. LEE Y-J, KANG M-S, WOO Y-K, MO I-P, TAK R-B. Competitive exclusion against *Salmonella gallinarum* of *Salmonella enteritidis* infected chickens. Journal of Veterinary Science, 2: 33-36, 2001.
36. BAUMLER AJ, HARGIS BM, TSOLIS RM. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. Science, 287: 50-52, 2000.
37. RABSCH W, HARGIS BM, TSOLIS RM, KINGSLEY RA, HINZ K-H, TSCHAPE H, BAUMLER AJ. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in Poultry. Emerging Infectious Diseases, 6: 443-448, 2000.
38. MASTROENI P, CHABALGITY JA, DUNSTANT SJ, MASKELL DJ, DOUGAN G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. The Veterinary Journal, 161: 132-164, 2000.
39. BERRANG ME, FRANK JF, BUHR RJ, BAILEY JS, COX NA. Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella typhimurium.* Journal of Food Protection, 62: 73-76, 1999.
40. CARRAMINANA JJ, HUMBERT F, ERMEL G, COLIN P. Molecular epidemiological investigation of *Salmonella typhimurium* strains related to an egg-borne outbreak. Research in Microbiology, 148: 633-636. 1997.
41. BAILEY JS. Detection of *Salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymersae chain reaction BAX syastem. Journal of Food Protection, 61: 792-795, 1998.
42. KOTULA KL, DAVIS ME. Broiler skin sampling for optimum recovery of *Salmonella* spp. Journal of Food Protection, 62: 284-286, 1999.
43. UYTTENDAELE M, DE TROY P, DEBEVERE J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. Journal of Food Protection, 62: 735-740, 1999.
44. HOOP RK, POSPISCHIL. Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in layin hens with naturally aquired *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection. Veterinary Record, 133: 391-393, 1997.
45. NICHOLAS RAJ. Serological response of chickens naturally infected with *Salmonella typhimurium* detected by ELISA. British Veterinary Journal, 148: 241-248, 1992.
46. LUK JM, KONGMUANG U, TSANG RSW, LINDBERG AA. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of *rfb*S gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. Journal of Clinical Microbiology, 35:

714-718, 1997.
47. WIDJOJOATMODJO MN, FLUIT AC, TORENSMA R, KELLER BH, VERHOEF J. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10: 935-938, 1991.
48. RAHN K, DE GRANDIS SA, CLARKE RC. Amplification of *inv*A gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as specific method of detection of *Salmonella*. Molecular and Cellular Probes, 6: 271-279, 1992.
49. MAHON J, LAX A. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian feces of salmonellas carrying *spv*R gene. Epidemiology and Infection, 111: 455-464, 1993.
50. BAUMLER AJ, HEFFRON F, REISSBRODT R. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iro*B. Journal of Clinical Microbiology, 35: 1224-1230, 1997.
51. KWANG J, LITTLEDIKE ET, KEEN JE. Use of polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. Letters in Applied Microbiology, 22: 46-51, 1996.
52. JOYS TM. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparasion with other flagellins. Journal of Biological Chemistry, 260: 15758-15761, 1985.
53. WOODWARD MJ, KIRWAN SE. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. Veterinary Record, 138: 411-413, 1996.
54. CHIU C-H, OU J-T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *inv*A and *spv*C, by enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. Journal of Clinical Microbiology, 34: 2619-2622, 1996.
55. TUCHILI LM, KODAMA H, SHARMA RN, TAKATORI I, PANDEY GS, KABILIKA S, MUKAMOTO M, TSUJI S, BABA T. Detection of *Salmonella* DNA in chicken embryos and enviromental samples by polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Medicine Science, 58: 881-884, 1996.
56. SOUMET C, ERMEL G, FACH P, COLIN P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 19: 249-298, 1994.
57. AABO S, ANDERSEN JK, OLSEN JE. Reseach note: Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymease chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 21: 180-182, 1995.
58. BENNETT AR, GREENWOOD D, TENNANT C, BANKS JG, BETTS RP. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. Journal of Applied Microbiology, 26: 437-441, 1998.
59. CHEN S, YEE A, GRIFFITHS M, WU KY, WANG C-N, RAHN K, DE GRANDIS SA. A rapid, sensitive and automated method for detection of *Salmonella* species in food using AG-9600 AmpliSensor Analyzer. Journal of Applied Microbiology, 83: 314-321, 1997.
60. POPOFF MY, BOCKERNÜHL J, GHEESLING LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White Scheme. Research in Microbiology, 155: 568-570, 2004.
61. GAST RK. Paratyphoid Infections, In "Diseases of Poultry", 10th, Iowa State University Press, Iowa, USA, page 97-121, 1997.
62. HUDSON CR, QUIST C, LEE MD, KEYES K, DODSON SV, MORALES C, SANCHES S, WHITE DG, MAURER JJ. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southern United States. Journal of Clinical Microbiology, 38: 1860-1865, 2000.

63. ABOUZEED YM, HARIHARAN H, POPPE C, KIBENGE FSB. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edwards Island. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 23: 253-266, 2000.
64. DAUM L, BARNES WJ, McAVIN JC, NEIDERT MS, COOPER LA, HUFF WB, GAUL L, RIGGINS WS, MORRIS S, SALMEN A, LOHMAN KL. Real-time PCR detection in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerry County, Texas. Journal of Clinical Microbiology, 40: 3050-3052, 2002.
65. MOORE JE, MURRAY L, FANNING S, CORMICAN M, DALY M, DELAPPE N, MORGAN B, MURPHY PG. Comparasion of phenotypic characteristics of *Salmonella* Breedeney associated with a poultry-related outbreak of gastroenteritis in Northern Ireland. Journal of Infection, 47: 33-39, 2003.
66. TAUXE RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerging Infectious Diseases, 3: 425-427, 1997.
67. ALTEKRUSE SF, COHEN ML, SWERDLOW DL. Emerging Foodborne Diseases. Emerging Infectious Diseases, 3: 285-293, 1997.
68. BERCHIERI A, WIGLEY P, PAGE K, MURPHY CK, BARROW PA. Further studies on vertical transmission of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. Avian Pathology, 30: 297-310, 2001.
69. COX NA, BAILEY JS, MAULDIN JM, BLANKENSHIP LC. Presence and impact of salmonellae contamination in the commercial integrated broiler hatchery. Poultry Science, 69: 1606-1609, 1990.
70. JONES FT, AXTELL RC, RIVES DV, SCHEIDELER SE, TARVER FR, WALKER RL, WINELAND MJ. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. Journal of Food Protection, 54: 502-507, 1991.
71. ROSE N, BEAUDEAU F, DROUIN P, TOUX JY, ROSE V, COLIN P. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive Veterinary Medicine, 39; 265-277, 1999.
72. BEMRAH N, BERGIS H, COLMIN C, BEAUFORT A, MILLEMAN Y, DUFOUR B, BENET JJ, CERF O, SANAA M. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establihments. International Journal of Food Microbiology, 80: 17-30, 2003.
73. SLADER J, DOMINGUE G, JORGENSEN F, McALPINE K, OWEN RJ, BOLTON FJ, HUMPHREY TJ. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Camphylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. Applied and Enviromental Microbiology, 68: 713-719, 2002.
74. KHAKHRIA R, WOODWARD D, JOHNSON WM, POPPE C. *Salmonella* isolated from humans and other sources in Canada, 1983-92. Epidemiology and Infection, 119: 15-23, 1997.
75. ATANASSOVA V, MATTHES S, MUHLBAUER E, HELMUTH R, SCHROETER A, ELLENDORFF F. Plasmid profiles of different *Salmonella* serovars from poultry flocks in Germany. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 106: 404-407, 1993.
76. DAVIES RH, NICHOLAS RAJ, McLAREN IM, CORKISH JD, LANNING DG, WRAY C. Bacteriological and serological investigation of persistent *Salmonella enteritidis* infection in an integrated poultry organisation . Veternary Microbiology, 58: 277-293, 1997.
77. SOERJADILIEM AS, CUMMING RB. Studies on the incidence of *Salmonella*

carriers in broiler flocks entering a polutry processing plant in Australia. Poultry Science, 63: 892-895, 1984.
78. SASIPREEYAJAN J, JERNGKLINCHAN J, KOOWATANANUKUL C, SAITANU K. Prevalence of *Salmonella* in broiler, layer, breeder flocks in Thailand. Tropical Animal Health and Production, 28: 174-180, 1996.
79. CARLI KT, EYIGOR A, CANER V. Prevalence of *Salmonella* serovars in chickens in Turkey. Journal of Food Protection, 64: 1832-1835, 2001.
80. VAN DUJKAREN E, WANNET WJB, HOUWERS DJ, VAN PELT W. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in Netherlands from 1984 to 2001. Journal of Clinical Microbiology, 40: 3980-3985, 2002.
81. BELI E, DURAKU E, TELO A. *Salmonella* serotypes isolated from chicken meat in Albania. International Journal of Food Microbiology, 71: 263-266, 2001.
82. CAPITA R, ALVARES-ASTORGA M, ALONSO-CALLEJA C, MORENO B, DEL CAMINO GARCIA-FERNANDEZ M. Ocurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. Internatioanal Journal Food Microbiology, 81: 169-173, 2003.
83. BOONMAR S, BANGTRAKULNONTH A, PORNRUNANGWONG S, MARNRIM N, KANEKO K, OGAWA M. Salmonellae in broiler chickens in Thailand with special reference to contamination of retail meat with *Salmonella* Enteritidis. Journal of Veterinary Medicine Science, 60: 1233-1236, 1998.
84. SAKAI T, CHALERMCHAIKIT T. The major sources of *Salmonella enteritidis* in Thailand. International Journal of Food Microbiology, 31: 173-180, 1996.
85. BOONMAR S, BANGTRAKULNONTH A, TERAJIMA P, WATANABE H, KANEKO K, OGAWA M. Epidemiological analysis of *Salmonella* enteritidis isolates from human and broiler chickens in Thailand by Phage Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 36: 971-974, 1998.
86. DOMINQUEZ C, GOMEZ I, ZUMALACARREQU I. Prevalence of *Salmonella* and *Camphylobacter* in retail chicken meat in Spain. International Journal of Food Microbiology, 72: 165-168, 2002.
87. NUNES I, HELMUTH R, SCHROETER A, MEAD G, SANTOS MAA, SOLARI CA, SİLVA OR, FERREİRA AJP. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. Journal of Food Protection, 66: 324-327, 2003.
88. BOONMAR S, BANGTRAKULNONTH A, PORNRUNANGWONG S, MARNRIM N, KANEKO K, OGAWA M. Predominant serovars of *Salmonella* in humans and foods from Thailand. Journal of Veterinary Medicine Science, 60: 877-880, 1998.
89. MIKOLAJCZYK A, RADKOWSKI M. *Salmonella* spp. on chicken carcasses in processing plants in Poland. Journal of Food Protection, 65: 1475-1479, 2002.
90. RODRIQUE DC, TAUXE RV, ROWE B. International increase in *Salmonella* enteritidis: A new pandemic? Epidemiology and Infection, 105; 21-27, 1990.
91. GONCAGÜL G, GÜNAYDIN E, ÇARLI KT. Prevelence of *Salmonella* serogroups in chicken meat. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 29: 103-106, 2005.
92. COAGAN TA, HUMPHREY TJ. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. Journal of Applied Microbiology, 94: 114-119, 2002.
93. GAST RK, BEARD CW. Serological detection of experimental *Salmonella enteritidis* infection in laying hens. Avain Diseases, 34: 721-728, 1990.
94. HASSAN JO, BARROW PA., MOCKETT APA, MCLEOD S. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA.

Veterinary Record, 126: 519-522, 1991.
95. BARROW PA. Further observations on the serological response to experimental *Salmonella typhimurium* in chickens measured by ELISA. Epidemiology and Infection, 108: 231-241, 1992.
96. NICHOLAS RAJ, CULLEN GA. Development and application of ELISA for etecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. Veterinary Record, 128: 74-76, 1991.
97. THORNS CJ, BELL MM, SOJKA MG, NICHOLAS RA. Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infections in chickens based on antibodies to SEF 14 fimbrial antigens. Journal of Clinical Microbiology, 34: 792-797, 1996.
98. SHAW SJ, BLAIS BW, NUNDY DC. Performance of the Dynabeads anti-*Salmonella* system in the detection of *Salmonella* species in foods, animal feeds, and enviromental samples. Journal of Food Protection, 61: 1507-1510, 1998.
99. SAFARIK I, SAFARIKOVÁ M, FORSTSHE SJ. The application of magnetic separations in applied microbiology. Journal of Applied Bacteriology, 78: 575-585, 1995.
100. GOPO JM, MELIS R, FILIPSKA E, MENEVERI R, FILIPSKI J. Development of a Salmonella-specific biotinylated DNA probe for rapid rutine identification of Salmonella. Molecular Cellular Probes, 2: 271-279, 1988.
101. KNIGHT IT, SHULTS S, KASPAR CW, COLWELL RR. Direct detection of Salmonella spp. in estuaries by using a DNA probe. Applied and Enviromental Microbiology, 56: 1059-1061, 1990.
102. ROSE B, LIABRES CM, BENNET B. Evaluation of a colorimetric DNA hybridization test for the detection of Salmonella in meat and poultry products. Journal of Food Protection, 54: 127-130, 1991.
103. INSALATA NF, MHNKE CW, DUNLAP WC. Direct fluorescent-antibody technique for the microbiological examination of food and enviromental swabs for salmonellae. Applied Microbiology, 26: 268-270, 1973.
104. MANSFIELD LP, FORSTYHE SJ. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. Letters in Applied Microbiology, 16: 122-125, 1993.
105. SKJERVE E, OLSVIK Ø. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. International Journal of Food Microbiology, 15: 11-18, 1991.
106. CURIALE MS, CLATT MJ, BARLETT CL. Colorimetric deoxyribonucleic acide hybridization assay for rapid screening of *Salmonella* in foods: collaborative study. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 73: 248-256, 1990.
107. FITTS R, DIAMOND M, HAMILTON C, NERI M. DNA DNA hybridization assay for the detection of *Salmonella* spp. in foods. Applied and Enviromental Microbiology, 46: 1146-1151, 1983.
108. ÇARLI KT, CANER V, EYIGOR A. *Salmonella* profile of chicken flocks in Turkey. World Poultry, 17: 32-33, 2001.
109. COOPER GL, NICHOLAS RA, BRACEWELL CD. Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*. Veterinary Record, 125: 567-572, 1989.
110. MALLINSON ET, TATE CR, MILLER RG, BENNETT B, RUSSEK-COHEN. Monitoring poultry farms for *Salmonella* by drag-swab sampling and antigen capture immunoassay. Avian Diseases, 33: 684-690, 1989.
111. RIGBY CE. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolisaccharide in poultry specimens. Applied and Enviromental Microbiology,

47: 1327-1330, 1984.
112. KELLER LH, BENSON CE, GARCIA V, NOCKS E, BATTENFELDER P, ECKROADE. Monoclonal antibody-based detection system for *Salmonella enteritidis*. Avian Diseases, 37: 501-507, 1993.
113. TAN S, GYLES CL, WILKIE BN. Comparasion of an LPS-specific competitive ELISA with a motility enrichment culture method (MSRV) for the detection of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in chickens. Veterinary Microbiology, 56: 79-86, 1997.
114. WYATT GM, LEE HA, DIONYSIOU S, MORGAN MRA, STOKELYDJ, AL-HAJJI AH, RICHARDS J, SILIS AJ, JONES PH. Comparasion of a microtitration plate ELISA with astandart cultural procedure for the detection of *Salmonella* spp. in chicken. Journal of Food Protection, 59: 238-243, 1996.
115. BECKERS HJ, TIPS PD, SOENTORO PSS, DELFGOU-VAN ASCH EHM, PETERS R. The efficiacy of enzyme immunoassays for the detection of salmonellas. Food Microbiology, 5: 147-156, 1988.
116. WORLD HEALTH ORGANİZATION. 1988. Salmonellosis control: the role of animal and product hygeniene: report of a WHO committee. WHO technical report series, no. 774. World Health Organization,Geneva.
117. MALLINSON ET, SNOEYENBOS GH. Salmonellosis, In "A Laboratory Manual for the isolation and Identification of Avian Pathogens", 3rd, Kendall/Hunt Publishing Co., Iowa, USA, page 3-11, 1989.
118. VOOGT N, NAGELKERKE NJD, VAN DE GIESSEN AW. Differences between reference laboratories of the European Community in their ability to detect *Salmonella* species. European Journal of Clinical Infectious Diseases, 21: 449-454, 2002.
119. DUSCH H, ALTWEGG M. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. Journal of Clinical Microbiology, 33: 802-804, 1995.
120. HERBERT D, ALTWEGG M. Comparasion of Rambach Agar, SM-ID Medium and Hectoen Enteric Agar for primary isolation of non-typhi salmonellae from stool samples. Journal of Clinical Microbiology, 31: 410-412, 1993.
121. CASSAR R, PAUL C. Comparasion of *Salmonella* chromogenic medium with DCLS agar for the isolation of *Salmonella* species from stool samples. Journal of Clinical Microbiology, 41: 3229-3232, 2003.
122. NYE KJ, FALLON D, FRODSHAM D, GEE B, GRAHAM C, HOWE S, MESSER S, TURNER T, WARREN RE**.** An evaluation of the performance of XLD, DCA, MLCB and ABC agars as direct plating media for the isolation of *Salmonella enterica* from faeces. Journal of Clinical Pathology, 55: 286-288, 2002.
123. MADDOKS S, OLMA T, CHEN S. Comparasion of CHROMagar *Salmonella* Medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and *Salmonella-Shigella* Agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. Journal of Clinical Microbiology, 40: 2999-3003, 2002.
124. COOKE VA, MILES RJ, PRICE RG, RICHARDSON AC. A novel choromogenic ester agar medium for the detection of Salmonellae. Applied and Enviromental Microbiology, 65: 807-812, 1999.
125. FREYDIERE AM, GILLE Y. Detection of salmonellae by using Rambach Agar and by a C8 Esterase Spot Test. Journal of Clinical Microbiology, 29: 2357-2359, 1991.
126. PERRY JD, FORD M, TAYLOR J, JONES AL, FREEMAN R, GOULD FK. ABC Medium, A new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. Journal of Clinical Microbiology, 37: 766-768, 1999.

127. FARMER JJ, McWORTHER AC, BRENNER DJ, MORRIS GK. The *Salmonella arizona* group of *Enterobactericeae*: nomenclature, classification and reporting. Clinical Microbiology. Newsletter, 6: 63-66, 1984.
128. D'AOUST JY, SEWELL AM, WARBURTON DW. A comparasion standart cultural methods for the detection of food-borne *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology, 16: 41-50, 1992.
129. WORCMAN-BARNINKA D, DESTRO MT, FERNANDES SA, LANDGRAF M. Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiladis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods. International Journal of Clinical Microbiology, 64: 387-393, 2001.
130. ZDRAGAS A, TSAKOS P, MAVROGENI P. Evaluation of two assays, MSRV and RV, for the isolation of *Salmonella* spp. from the waste water samples and broiler chickens. Letters in Applied Microbiology, 31: 328-331, 2000.
131. WALLACE HA, JUNE G, SHERROD P, HAMMACK TS, AMAGUANA RM. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration bacteriological analytical manual. LA Tomlinson, ed. Hypertext source: http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/bam-5.html#Intro. 1999.
132. HAMMACK T, AMAGUANA RM, JUNE GA, SHERROD PS, ANDREWS WH. Relative effectiveness of Selenite Cystine broth, Tetrathionate broth, and Rappaport Vassiliadis Medium for the recovery of *Salmonella* spp. from food with a a low microbial load. Journal of Food Microbiology, 1: 16-21, 1999.
133. MICHEAL GB, CARDOSO M, COSTA M. Comparasion of Selenite Cystine broth, Tetrathionate broth, and Rappaport Vassiliadis broth for the recovery from swine feces. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Washington D.C., page 5-7, 1999.
134. CUDJOE KS, KRONA R, GRON B, OLSEN E. IMS: A new selective enrichment technique for the detection of *Salmonella* in foods. International Journal of Food Protection, 23: 159-165, 1994.
135. CUDJOE KS, KRONA R. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads7 anti-*Salmonella* and a conventional reference method. International Journal of Food Microbiology, 37: 55-62, 1997.
136. FAVRIN SJ, JASSIM SA, GRIFFITHS MW. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Broth. Applied and Enviromental Microbiology, 67: 217-224, 2001.
137. HOLT PS, GAST RK, GREENE CR. Rapid detection of *Salmonella enteritidis* in pooled liquid egg samples using a magnetic bead-ELISA system. Journal of Food Protection, 58: 967-972, 1995.
138. RIPABELLI G, SAMMARCO ML, GRASSO GM. Evaluation of immunomagnetic separtion and plating media for recovery of *Salmonella* from meat. Journal of Food Protection, 62: 198-201, 1999.
139. COTTER PF, MURPHY JE, KLINGER JD, TAYLOR RL. Identification of *Salmonella enteritidis* from experimentally infected hens using colorimetric DNA hybridization method. Avian Diseases, 39: 873-878, 1995.
140. HASAN JAK, KNIGHT IT, TATE CR, MALINSON ET, MILLER RG, COLWLL RR, JOSEPH SW. Evaluation of radiolabelled and colorimetric DNA probes in comparasion with antigen screening assay for the detection of *Salmonella* from poultry farms. Avaian Diseases, 35: 397-402, 1991.
141. D' AOUST JY, SEWELL AM, GRECO P, MOZOLA MA, COLVIN RE. Performance assessment of GENE TRAK colorimetric probe assay for the

detection of food borne *Salmonella* spp. Journal of Food Protection, 58: 1069-1076, 1995.
142. SOUMET C, ERMEL G, ROSE N, DROUIN P, SALVAT G, COLIN P. Identification by a multiplex-PCR based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from enviromental swabs of poultry houses. Lettres in Appllied Microbiology, 29: 1-6, 1999.
143. MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SIAKI R, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA invitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263-273, 1986.
144. VANEECHOUTTE M, VAN ELDERE J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. Journal of Medical Microbiology, 46: 188-194, 1997.
145. JINNEMAN KC, TROST PA, HILL WE. Comparasion of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O157 shiga-like toxins type I and II DNA by multiplex polymerase chain reaction. Journal of Food Protection, 58: 722-726, 1995.
146. RAFII F, HOLLAND MA, HILLWE, CERNIGLIA CE. Survival of *Shigella flexneri* on vegetables and detection of polymerase chain reaction. Journal of Food Protection, 58: 727-732, 1995.
147. RASMUSSEN HN, RASMUSSEN OF, CHRISTENSEN H, OLSEN JE. Detection of *Yersinia enterocolitica* O-3 in fecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. Journal of Applied Microbilogy, 78: 563-568, 1995.
148. SIMON MC, GRAY DI, COOK H. DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. Applied and Enviromental Microbiology, 62: 822-824, 1996.
149. SAILS AD, FOX AJ, BOLTON FJ, WAREING DRA, GREENWAY DLA. A Real-Time Assay for the detection of *Camphylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. Applied and Enviromental Microbiology, 69: 1383-1390, 2003.
150. HONG Y, BERRANG ME, LIU T, HOFACRE CL, SANCHEZ S, WANG L, MAURER JJ. Rapid detection of *Camphylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-Enzyme –Linked Immunosorbent assay. Applied and Enviromental Microbiology, 69: 3492-3499, 2003.
151. AABO S, RASMUSSEN OF, ROSSEN L, SORENSEN PD, OLSEN JE. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Molecular Cellular Probes, 7: 171-178, 1993.
152. STENOVICOVA A, REHACOVA H, SKARKOVA, A, RIJPENS N, KUCHTA T. Confirmation of presumptive *Salmonella* colonies by the polymerase chain reaction. Journal of Food Protection, 61: 1381-1383, 1998.
153. FLUIT AD, WIDJOJOATMODJO MN, BOX ATA, TORENSMA R, VERHOEF J. Rapid detection of Salmonellae in poultry with immuno-polymerase chain reaction assay. Applied and Enviromental Microbiology, 59: 1342-1346, 1993.
154. BEJ AK, MAHBUBANI MH, BOYCE MJ, ATLAS RM. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. Applied and Enviromental Microbiology, 60: 368-373, 1994.
155. MAHON J, MURPHY CK, JONES PW, BARROW PA. Comparasion of multiplex PCR and standart bacteriological methods of detecting *Salmonella* in chicken skin. Letters in Applied Microbiology, 19: 169-172, 1994.
156. COHEN ND, MARTIN LJ, SIMPSON B, WALLIS DE, NEILBERGS HE. Comparasion of polymerase chain and microbiological culture for detection of salmonellae in equine feces and enviromental samples. American Journal of

Veterinary Research, 57: 780-786, 1996.
157. SOUMET C, ERMEL G, SALVAT G, COLIN P. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. Letters in Applied Microbiology, 24: 113-116, 1997.
158. CANO RJ, RASMUSSEN SR, SACHEZ FRAGA G, PALOMARES JC. Fluorescent detection-polymerase chain reaction (FD-PCR) assay on microwell plates as a screening test for salmonellas in foods. Journal of Applied Bacteriology, 75: 247-253, 1993.
159. LIN C-K, TSEN HY. Use of two targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. Journal of Applied Bacteriology, 80: 659-666, 1996.
160. WANG RF, CAO WW, CERNIGLIA CE. A universal protocol for the detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. Journal of Applied Microbiology, 83: 727-736, 1997.
161. WITTWER CT, FILLMORE GC, GARLING DJ. Minimazing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Analytical Biochemistry, 186: 328-331, 1990.
162. WILSON IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Enviromental Microbiology, 63: 3741-3751, 1997.
163. WAN J, KING K, CRAVEN H, McAULEY C, TAN SE, COVENTRY MJ. Probelia PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese. Letters in Applied Microbiology, 30: 267-271, 2000.
164. FACH P, DILASSER F, GROUT J, TACHE J. Evaluation of a polymerase chain reaction- based test for detecting *Salmonella spp*. in food samples: Probelia *Salmonella* spp. Journal of Food Protection, 62: 1387-1393, 1999.
165. KIMURA B, KAWASAKI S, FUJII T, KUSUNOKI J, TAKESHI I, FLOOD SJA. Evaluation of TaqMan PCR Assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. Journal of Food Protection, 62: 329-335, 1999.
166. FRATAMICO PM. Comparasion of culture, PCR, TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. Molecular and Cellular Probes, 17: 215-221, 2003.
167. BAILEY JS, COSBY DE. Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with tha automated BAX PCR system. Journal of Food Protection, 66: 2138-2140, 2003.
168. LIN CK, TSEN HY. Development and evaluation of two novel oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequence for the identification of *Salmonella* in foods. Journal of Applied Microbiology, 78: 507-520, 1995.
169. TRKOV M, AVGUSTIN G. An improved 16S rRNA PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. International Journal of Food Microbiology, 80: 67-75, 2002.
170. CHRISTENSEN H, MOLLER PL, VOGENSEN FK, OLSEN JE. 16S to 23S rRNA spacer fragment length polymorphism of *Salmonella ente*rica at subspecies and serotype level. Journal of Applied Microbiology, 89: 130-136, 2000.
171. LIN C-K, HUNG C-L, HSU S-C, TSAI C-C, TSEN H-Y. An improved PCR primer pair based on 16S rDNA for the specific detection of *Salmonella* serovars in food samples. Journal of Food Protection, 67: 1335-1343, 2004.
172. GISSENDORF BAJ, QUINT WGV, HENKENS MHC, STEGEMAN H, HUF FA, NIESTERS HGM. Rapid and sensitive detection of *Camphylobacter* spp. in chicken products by using polymerase chain reaction. Applied and Enviromental

Microbiology, 58: 3804-3808, 1992.
173. CHEVRIER D, POPOFF MY, DION MP, HERMANT D, GUESDON JL. Rapid detection of *Salmonella* subspecies I by PCR combined with non-radioactive hybridization using covalently immobilised oligonucleotide on a microplate. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 10: 245-251, 1995.
174. TSEN H-Y, LIOU J-W, LIN C-K. Possible use of polymerase chain reaction method for specific detection of *Salmonella* in beef. Journal of Fermentation and Bioengineering, 77: 1477-1485, 1994.
175. OYOFO BA, ROLLINS DM. Efficiacy of filter types for *detecting Camphylobacter jejuni* and *Camphylobacter coli* in enviromental samples by polymerase chain reaction. Applied and Enviromental Microbiology, 59: 4090-4095, 1993.
176. WIJOJOATMODJO MN, FLUIT AC, TORENSMA R, VERDONK GPHT, VERHOEF J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of Salmonellae in fecal samples. Journal of Clinical Microbiology, 30: 3195-3199, 1992.
177. KONGMUANG U, LUK JMC, LINDERG AA. Comparasion of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 32:3072-3074, 1994.
178. LI Y, MUSTAPHA A. Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. Letters in Applied Microbiology, 35: 508-512, 2002.
179. ÇARLI KT, UNAL CB, CANER V, EYIGOR A. Detection of salmonellae in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 39: 1871-1876, 2001.
180. HOORFAR J, BAGGESEN DL, PORTING PH. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. Journal of Microbiological Methods, 35: 77-84, 1999.
181. COCKERILL FR, SMITH TF. Rapid cycle raeltime PCR: a revolution for clinical microbiology. American Society of Microbiology News, 68: 77-83, 2002.
182. TSENG SY, MACOOL D, ELLIOT V, TICE G, JACKSON R, BARBOUR M, AMORESE D. An homogeneous Fluorescence Polymerase Chain Reaction Assay to Identify *Salmonella*. Analytical Biochemistry, 245: 207-212, 1997.
183. EYIGOR A, CARLI KT, UNAL CB. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. Letters in Applied Microbiology, 34: 37-41, 2003.
184. KNUTTSON R, LOFSTROM C, GRAGE H, HOORFAR J, RADSTROM P. Modeling of 5' nuclease real-time PCR responses for optimisation of a high-throughput enrichment procedure for *Salmonella enterica*. Journal of Clinical Microbiology, 40: 52-60, 2002.
185. EYIGOR A, ÇARLI KT. Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. Avian Diseases, 47; 380-386, 2003.
186. KRICKA LJ. Nonisotopic DN1A probe techniques. Academic Press, Newyork, page 1, 1992.
187. DOS SANTOS LR, DO NASCIMENTO P, DE OLIVEIRA SD, FLORES ML, PONTES AP, RIBEIROAR, SALLE CTP, LOPES RFF. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 43: 247-250, 2001.

188. MAKINO S-I, KURAZONO H, CHONGSANGUAM M, HAYASHI H, CHEUN H-I, SUZUKI S, SHIRAHATA T. Establishment of PCR system specific to *Salmonella* spp. application of food and fecal samples. Journal of Veterinary Medicine Science, 6: 1245-1247, 1999.
189. FERRETI R, MANNAZZU I, COCOLIN I, COMI G, CLEMENTI F. Twelve-hours PCR-based method for the detection of *Salmonella* spp. in food. Journal of Applied and Enviromental Microbiology, 67: 977-978, 2001.
190. QUINN C, WARD J, GRIFFIN M, YEARSLEY D, EGAN J. A comparasion of conventional culture and three rapid methods for the detection of *Salmonella* in poultry feed and enviromental samples. Letters in Applied Microbiology, 20: 89-91, 1995.
191. LIN J-S, TSEN H-Y. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. Journal of Food Protection, 62: 1103-1110, 1999.
192. STONE GG, OBERST RD, HAYS MP, McVEY S, CHENGAPPA MM. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. Journal of Clinical Microbiology, 32: 1472-1479, 1994.
193. STONE GG, OBERST RD, HAYS MP, McVEY S, GALLAND JC, CURTISS III R, KELLY SM, CHENGAPPA MM. Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR-hybridization. Journal of Clinical Microbiology, 33: 1292-1295, 1995.
194. RIJPENS N, HERMAN L, VEREECKEN F, JANNES G, DE SMEDT J, DE ZUTTER L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. International Journal of Food Microbiology, 46: 37-44, 1999.
195. LOFSTROM C, KNUTSSON R, AXELSON CE, RÄDSTROM P. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. Applied and Enviromental Microbiology, 70: 69-75, 2004.
196. MACIOROWSKI KG, PILLAI SD, RICKE SC. Efficiacy of a commercial polymerase chain reaction-based assay for detection of *Salmonella* spp. in animal feeds. Journal of Applied Microbiology, 89: 710-718, 2000.
197. GOUWS PA, VISSER M, BRÖZEL VS. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. Journal of Food Protection, 61: 1039-1042, 1998.
198. WHYTE P, GILL KM, COLLINS JD, GORMLEY E. The prevalence of *Salmonella* contamination in raw poultry. Veterinary Microbiology, 89: 53-60, 2002.
199. MALKAWII HI, GHARAIBEH R. Multiplex PCR for the direct dtection of *Salmonella enterica* from chicken, lamb, and beef food products. Journal of Basic Microbiology, 43: 328-336, 2003.
200. WAAGE AS, VARDUND T, LUND V, KAPPERUD G. Detection of low numbers of *Salmonella* in enviromental water, sewage and food samples by anested polymerse chain reaction assay. Journal of Applied Microbiology, 87: 418-428, 1999.
201. VANTAKARIS A, KOMNINOU G, VENIERI D, PAPPETROPOUIOU M. Development of a multiplex PCR detection *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. Letters in Applied Microbiology, 31: 105-109, 2000.
202. CROCI L, DELIBATO E, VOLPE G, DE MEDICI D, PALLESCHI G. Comparasion of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standart culture method for the detecting *Salmonella* in meat products. Applied

and Enviromental Microbiology, 70: 1393-1396, 2004.
203. DIFCO LABORATORIES: *Salmonella* serology, In Difco Manual; dehydrated cultura media and reagents for Microbiology, 10th, Michigan, USA, page 784-837, 1984.
204. EYİGÖR A, GONCAGÜL G, GÜNAYDIN E, ÇARLI KT. *Salmonella* profile in chickens determined by real-time polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000 to 2003 in Turkey. Avian Pathology, 34: 101-105, 2005.
205. SCHRANK IS, MORES MAZ, COSTA JLA, FRAZZON APG, SONCINI R, SCHRANK A, VAINSTEIN MA, SILVA SC. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. Veterinary Microbiology, 82: 45-53, 2001.
206. THOMASON BM, DODD DJ. Enrichment procedures for isolating salmonellae from raw meat and poultry. Applied and Enviromental Microbiology, 36: 627-628 1978.
207. OLIVERIRA SD, RODENBUSCH CR, CÉ MC, ROCHA SLS, CANAL CW. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection, Letters in Applied Microbiology, 36: 217-221, 2003.
208. MALORNY B, HOORFAR J, HUGAS M, HEUVELINK A, FACH P, ELLERBROEK L, BUNGE C, DORN C, HELMUTH R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. International journal of Food Microbiology, 89: 241-249, 2003.
209. MALORNY B, PACCASSONI E, FACH P, BUNGE C, MARTIN A, HELMUTH R. Diagnostic real-time PCR for the detection of *Salmonella* in food. Applied and Enviromental Microbiology, 70: 7046-7052, 2004.
210. JIN U-H, CHO S-H, KIM M-G, HA S-D, KIM K-S, LEE K-H, KIM K-Y, CHUNG DH, LEE Y-C, KIM C-H. PCR method based on the ogdH gene for the detection *Salmonella* spp. from chicken meat samples. The Journal of Microbiology, 42: 216-222, 2004.
211. OLIVEIRA SD, SANTOS LR, SCHUCH DMT, SILVA AB, SALLE CTP, CANAL CW. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by pCR. Veterinary Microbiology, 87: 25-35, 2002.
212. LILLARD HS. Factors affecting persistence of *Salmonella* during the processing of poultry. Journal of Food Protection 52: 829-832, 1989.
213. BEKAR M, AYAZ Y, AKMAN A, YAZICIOĞLU N, UYSAL Y, TEKİN C, ERGÜN A, İLDEŞ Z, KORKUT N, MİROĞLU M, ASLAN A. Tavuk mezbahalarının *Salmonella* yönünden taranması. Derginin adı, 4: 1-22, 1993.
214. SARIMEHMETOĞLU B, EROL İ, KÜPLÜLÜ Ö, ÖZDEMİR H. Tavuk kesimhanelerinde *Salmonella* kontaminasyonu ve serotip dağılımı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 43: 85-90, 1996.
215. KALENDER H, MUZ A. Typping of *Salmonella* spp. isolated from chickens in Elazığ region. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28; 297-303, 1999.
216. WITTWER CT, FILLMORE GC, HILLYARD DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. Nucleic acids Research, 17: 4353-4357, 1989
217. WITTWER CT, GARLING DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temprature optimization. Biotechniques, 10: 76-83, 1990.

ÖZGEÇMİŞ

18. 03. 1975 tarihinde Kocaeli'de doğdum. İlkokul öğrenimimi Ankara Yücetepe İlkokulu'nda, ortaokulu öğrenimimi Diyarbakır Özel Karacadağ Lise'sinde, lise öğrenimimi ise Bolu İzzet Baysal Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1994 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitimime başladım ve 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosunda görev yapmaktayım.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve yazım aşamasında bana yol gösterip, zaman ayıran saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. K. Tayfun ÇARLI'ya, tezim boyunca bir an olsun dahi gerek manevi gerek se bilimsel anlamda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ayşegül EYİGÖR'e, Araştırma Görevliliğimin başından beri bana yol gösteren Sağlık Teknikeri Şevket GÜNAY'a, Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyelerine, Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma, teknik kadromuza en derin sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Fakültem dışında bana yardımcı olan Yenişehir İbrahim Orhan Yüksekokulu öğretim görevlisi Dr. Gülşen GONCAGÜL'e, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Suna GEDİKOĞLU ve Doç. Dr. Cüneyt ÖZAKIN'a, Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Özhan EYİGÖR'e, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Laborant Binnaz GÜNGÖR'e, Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda çalışan Kimya Mühendisi Sami AYDIN'a ve her zaman her koşulda yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.