Ayşegül DEMİRCİOĞLU

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

BROYLER KESİM SÜRECİNİN FARKLI AŞAMALARINDAN ALINAN ÖRNEKLERDE *SALMONELLA* VARLIĞI VE SAYISININ REAL TİME PCR VE ISO 6579-2:2012 İLE BELİRLENMESİ

Ayşegül DEMİRCİOĞLU

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2023

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

BROYLER KESİM SÜRECİNİN FARKLI AŞAMALARINDAN ALINAN ÖRNEKLERDE *SALMONELLA* VARLIĞI VE SAYISININ REAL TİME PCR VE ISO 6579-2:2012 İLE BELİRLENMESİ

Ayşegül DEMİRCİOĞLU

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Seran TEMELLİ

TGA-2021-398- Bursa Uludağ Üniversitesi Genel Araştırma Projesi (GAP)

BURSA-2023

T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum "Broyler kesim sürecinin farklı aşamalarından alınan örneklerde *Salmonella* varlığı ve sayısının real-time PCR ve ISO 6579-2:2012 ile belirlenmesi" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Ayşegül DEMİRCİOĞLU
14.04.2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

14/04/2023

Adı Soyadı: Ayşegül DEMİRCİOĞLU

Anabilim Dalı: Besin Hijyeni ve Teknolojisi

Tez Konusu: Broyler Kesim Sürecinin Farklı Aşamalarından Alınan Örneklerde *Salmonella* Varlığı ve Sayısının Real Time PCR ve ISO 6579-2:2012 ile Belirlenmesi

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvan Adı Soyadı: Prof. Dr. Seran TEMELLİ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak
ETİK BEYANI I
KABUL ONAY II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU III
İÇİNDEKİLER IV
TÜRKÇE ÖZET V
İNGİLİZCE ÖZET VI
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 9
2.1. Tarihçe 9
2.2. Taksonomi ve Nomenklatür 10
2.3. Etiyoloji 14
2.4. Epidemiyoloji 17
2.5. Patogenez 20
2.6. *Salmonella* Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Tanı Yöntemleri 21
2.6.1. Geleneksel yöntemler 21
2.6.2. Hızlı yöntemler 23
2.6.3. Nükleik asit temelli uygulamalar 24
2.6.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulamaları 24
2.6.5. Real time PCR (r-PCR) sistemleri 25
2.6.6. Minyatürize biyokimyasal testler 25
2.7. Salmonellalarda Tiplendirme Metotları 26
2.8. *Salmonella* Sayısının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. Gereç 32
3.1.1. Örnekler 32
3.1.2. Standart suşlar 32
3.1.3. Cihazlar 32
3.2. Yöntem 33
3.2.1. Karkastan örnek alınması (Boyun derisinden) 33
3.2.2. Karkas Örneklerinden ISO 6579-2:2012 ile *Salmonella*'nın Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı (mEMS) Tekniği ile Sayımı 34
3.2.2.1. Test edilecek miktar – Başlangıç süspansiyonunun hazırlanması 34
3.2.2.2. Dilüsyon ve selektif olmayan sıvı besi yerinde ön zenginleştirme (Preenrichment) 34
3.2.2.3. Selektif yarı katı besi yerinde zenginleştirme (Enrichment) 36
3.2.2.4. Selektif katı besi yerine ekim 37
3.2.2.5. Doğrulama 38
3.2.2.6. Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayının (mEMS) hesaplanması 38
3.2.3. *Salmonella* spp. Spesifik r-PCR (Salm-PCR) Analizi ile Doğrulama 40
3.2.3.1. *Salmonella* spp. spesifik r-PCR (Salm-PCR) için templeyt hazırlama 40
3.2.3.2. *Salmonella* spp. spesifik r-PCR (Salm-PCR) 40
3.2.4. İstatistiksel Analizler 41
4. BULGULAR 42
4.1. Örnekleme Sonuçları 42
4.2. *Salmonella* spp. İzolasyon, İdentifikasyon ve Doğrulama Sonuçları 43

4.2.1. Birinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı 44
4.2.2. İkinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı 45
4.2.3. Üçüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı 45
4.2.4. Dördüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı 45
4.2.5. Beşinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı 45
4.3. Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı (mEMS) Tekniği ile *Salmonella* spp. Sayım Sonuçları 53
4.3.1. Birinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı 55
4.3.2. İkinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı 55
4.3.3. Üçüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı 55
4.3.4. Dördüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı 55
4.3.5. Beşinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı 56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 64
5.1. Karkas Örneklerinde *Salmonella* spp. Varlığı 64
5.2. Karkas Örneklerinde *Salmonella* spp. Sayısı 68
6. KAYNAKLAR 76
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 87
8. TEŞEKKÜR 89
9. ÖZGEÇMİŞ 90

TÜRKÇE ÖZET

Broyler kesim prosesinde soğutma öncesi (SÖ) ve soğutma sonrası (SS) karkas örneklerindeki *Salmonella* spp. varlığı ve sayısının belirlenmesi amacı ile 2021 yılında gerçekleştirilen çalışmada, Balıkesir'de faaliyet gösteren bir kanatlı kesimhanesinde kesilen toplam 480 broylere ait 96 adet birleştirilmiş boyun derisi örneği (48 SÖ ve 48 SS), ISO 6579-2:2012 Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı (mEMS) Tekniği kullanılarak *Salmonella* spp. varlığı ve seviyesi yönünden analiz edildi. İzolasyon sonrasında elde edilen izolatlar, *Salmonella* spp. spesifik r-PCR (Salm-PCR) analizi ile doğrulandı.

Çalışmada incelenen SÖ örneklerin %97,92'sinin ve SS örneklerin %85,42'sinin toplam 96 örneğin ise 88'inin (%91,67) *Salmonella* spp. varlığı yönünden pozitif olduğu belirlendi. Örneklerdeki ortalama *Salmonella* sayısı ise SÖ'nde 1,84 $\log_{10}$ mEMS ve SS'nda 1,48 $\log_{10}$ mEMS değerlerinde bulundu. Hava soğutma sistemi kullanılarak yapılan soğutma işleminin patojenin sayısında 0,36 $\log_{10}$ mEMS'lık bir azalma oluşturduğu ve bu azalmanın da istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0,05$).

Ülkemizde uluslararası referans metot ISO 6579-2:2012 ile bir kanatlı işletmesinde kesilen broyler karkaslarındaki *Salmonella* spp. yükünün ilk kez belirlendiği bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, ilgili literatüre güncel ve orijinal veri katkısı sağladı. Ayrıca bu somut veriler, kanatlı işletmesinin son üründeki *Salmonella* yükünü azaltabilmesi için mevcut kesim prosesine yönelik yapılması gereken iyileştirmelerin planlamasında da yönlendirici bir rol oynadı.

Anahtar Sözcükler. *Salmonella*, varlık, yük, sayım, broyler, karkas, EMS, mEMS, ISO, PCR

İNGİLİZCE ÖZET

DETERMINATION OF *SALMONELLA* PRESENCE AND LEVELS BY REAL TIME PCR AND ISO 6579-2:2012 IN SAMPLES OBTAINED FROM VARIOUS STAGES OF BROILER SLAUGHTER

In this study, which was carried out in 2021 in a poultry slaughterhouse operating in Balıkesir, aiming to determine the presence and numbers of *Salmonella* spp. in pre-chill (PreC) and post-chill (PosC) carcasses of broiler slaughter process, a total of 96 pooled neck skin samples of 480 broilers (48 PreC and 48 PosC) were analyzed by ISO 6579-2:2012 Miniaturized Most Probable Number (mEMS) Technique. The isolates obtained after isolation were confirmed by *Salmonella* spp. specific r-PCR (Salm-PCR) analysis.

Salmonella spp. was found in 97,92% in PreC and 85,42% in PosC carcasses, from 88 (91,67%) of 96 total samples. The mean count of *Salmonella* was determined as 1,84 $\log_{10}$ mMPN in PreC, and 1,48 $\log_{10}$ mMPN in PosC samples. The chilling process utilizing an air chill system was found to have a statistically significant decline of 0,36 $\log_{10}$ mMPN in the counts of the pathogen ($p<0,05$).

First time results on the *Salmonella* spp. load in broiler carcasses from a poultry slaughterhouse, unveiled by using the international reference method ISO 6579-2:2012 in this study in our country, contributed up to date and original data to relevant literature. In addition, this tangible information gathered was used as a guide by the poultry slaughterhouse to plan for revisions in the current slaughter process to reduce the *Salmonella* load in the final product.

Key Words. *Salmonella*, presence, load, enumeration, broiler, carcass, MPN, mMPN, ISO, PCR

1. GİRİŞ

Hayvansal ürünler, insan sağlığı için gerekli olan esansiyel besin maddelerini ihtiva etmesinden dolayı beslenme açısından oldukça önemlidir. Kanatlı eti, kırmızı ete göre daha sağlıklı ve fiyatının ekonomik olması bakımından alternatif bir tüketim kaynağı olmakta ve Dünya genelinde tüketiciler tarafından daha fazla tercih edilmektedir. Ülkemizde de kanatlı eti tüketimi, Dünya'daki artışına paralel olarak artmaktadır (Civaner, 2007; Kawataa, & Kubota, 2018). Türkiye'de kanatlı sektörü (yumurta ve piliç eti), hayvancılık alanında Avrupa Birliği (AB) ile rekabet edebilen birkaç sektörden biri durumundadır. Kanatlı etleri içerisinde ülkemizde en çok üretim ve tüketim payına sahip olan piliç (broyler) etleridir. Piliç etlerinin bileşimi; hayvanın ırk, yaş, cinsiyet, besi durumu, vücut bölgesi, etin derili/derisiz ve çiğ/pişmiş olmasına göre değişmektedir. Kırmızı et ile kıyaslandığında yapısında daha fazla protein (%21), daha az yağ (%4,5) ve kolesterol (75mg/100g) içermesi ile beslenme ve diyet yönünden ön plana çıkmaktadır. Esansiyel amino asitleri yeterli ve dengeli miktarda bulundurması ve sindirilebilirliğinin yüksek olması (%97) nedeniyle içerdiği proteinlerin biyolojik değerliği yüksek olup tam proteinler içerisinde yer almaktadır. Yapısındaki yağların %68'inin doymamış yağ asitlerinden ve bunların da %80'inin esansiyel yağ asitlerinden oluşması, piliç etini hem besleyici yönden hem de kalori (130 kal/100g) yönünden kırmızı ete göre üstün kılmaktadır. Ayrıca özellikle B1, B2 ve B3 olmak üzere B grubu vitaminler açısından ve demir, çinko, fosfor ile potasyum yönünden de zengin bir içeriğe sahiptir (Erol, 2007; Hasipek, & Aktaş, 1991; Saucier, 1999).

Hızla artan Dünya nüfusu göz önüne alındığında, yeterli ve dengeli beslenme ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanatlı yetiştiriciliğinin az zamanda yüksek verim sağlaması ve piliç etinin ucuz ve kaliteli protein kaynağı olup, zengin vitamin, mineral ve dengeli yağ asitlerini içermesi ve ekonomik olarak ulaşılabilir olması tüketiminin önemini artırmaktadır (Akbay, Yalçın, Ceylan, & Olhan, 2000; Civaner, 2007; Dokuzlu, Barış, Hecer, & Güldaş, 2013; Hasipek, & Aktaş, 1991; Türkoğlu ve ark., 2004). Piliç etinin tek başına tüketilmesinin yanı sıra, füme, sucuk, salam ve sosis gibi işlenmiş et ürünü ile köfte, döner gibi hazırlanmış et karışımı ve nugget, şinitzel gibi ileri işlenmiş ürün çeşitlerinin fazla olmasına bağlı olarak

tüketilebilmesi ile de tercih sebebi olmaktadır (Petracci, Mudalal, Bonfiglio, & Cavani, 2013).

Geçtiğimiz yarım yüzyılda piliç eti üretim değerinin Dünya'da yaklaşık 9 kat, Türkiye'de ise yaklaşık 22 kat artmış olduğu gözlenmektedir. Bu değerler dikkate alınarak 2030 yılında Dünya'da piliç eti üretiminin %1,46 artarak 153.479,000 ton, Türkiye'de ise %1,60 artarak 2.882,000 ton olabileceği öngörülmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nün 2022 yılı istatistik verilerine göre; Dünya'da toplam kanatlı eti üretiminin 134,6 milyon ton olduğu bildirilmiştir (OECD/FAO, 2022). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nun açıkladığı Ocak-Aralık 2022 yılı verilerine göre ise; kanatlı eti üretim miktarının 2.471,641 ton olduğu, bu miktarın içerisinde en büyük payı 2.417,995 ton ile piliç etinin oluşturduğu rapor edilmiştir (TÜİK, 2022). Dünya'da ve Türkiye'de kanatlı eti üretimi ve kişi başına düşen tüketimi Tablo 1'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi hem Dünya'da hem de Türkiye'de üretimin ve kişi başına tüketimin yıllara göre arttığı görülmektedir.

Tablo 1. Dünyada ve Türkiye'de yıllara göre kanatlı eti üretimi ve kişi başına düşen tüketim miktarı (FAO, 2021; TÜİK, 2021)

	Dünya		**Türkiye**	
Yıl	**Üretim (milyon ton)**	**Tüketim (kg/kişi)**	**Üretim (ton)**	**Tüketim (kg/kişi)**
2021	133,3	-	2.297,071	21,19
2020	132,1	-	2.194,475	21,10
2019	129,4	16,9	2.198,090	21,02
2018	124,8	16,3	2.226,207	21,62
2017	121,8	16,2	2.189,097	22,29
2016	119,7	15,9	1.925,518	20,52

Günümüzde artan tüketime bağlı olarak kanatlı ürünlerinin kalite standartlarının artırılması için de yoğun çaba sarf edilmektedir. Ülkemizde endüstriyel kanatlı eti sektörü, gerek iç pazarda gerekse dış pazarda ekonomiye olan katkısı bakımından Dünya ile rekabet edebilen öncü sektörlerimizdendir. Entegre kanatlı işletmelerindeki kesimhanelerde, modern ve hijyenik kesim teknolojileri kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda tüy ıslatma ve soğutma aşamalarında kullanılan sıcak ve soğuk suya daldırma (immersiyon) yöntemi, modern kesim teknolojisinde güncelliğini kaybetmiş olup, yerini sıcak ve soğuk havaya maruz bırakma (air scalding-air chilling) yöntemlerine bırakmıştır. Hava soğutma sistemleri

(air chilling) AB başta olmak üzere ülkemizde de entegre kanatlı kesimhanelerinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Kesim prosesinin sonunda ve kritik öneme sahip olan soğutma aşaması ile en kısa sürede (4-8 saat içerisinde) karkas sıcaklığının +4˚C ve altına düşürülmesi hedeflenmektedir. Bu soğutma sistemi ile herhangi bir kimyasal dekontaminasyon ajanı kullanılmaksızın immersiyon yönteminde gözlenebilen olası çapraz kontaminasyonun ve patojen yükünün azaltılması amaçlanmaktadır. Benzer şekilde, kanatlı et kalitesi ve uzun raf ömrü sağlaması nedeniyle tüy ıslatma aşamasında da immersiyon yöntemi yerine buhar püskürtme (air scalding) yöntemini kullanan işletme sayısı da her geçen gün artmaktadır (Hekimoğlu, & Altındeğer, 2009).

Kanatlı eti, besleyici değeri ile beslenmedeki öneminin yanı sıra kanatlı hayvanın yetiştirilmesinden kesimi ve sonrasında et veya ürün halinde tüketicilere sunulmasına kadar geçen süreçte, patojenlerle kontaminasyona maruz kalabilmektedir. Halk sağlığı açısından bu patojenlerden kanatlı hayvan ve ürünleri kaynaklı gıda zehirlenmelerinden sorumlu olan non-tifoidal salmonellalardır *(Salmonella* typhi ve *Salmonella* paratyphi haricindeki salmonellalar- NTS). Bu zoonoz etkenlerin en önemli taşıyıcısı kanatlı eti ve ürünleridir (Kao ve ark., 2010; Sampedro, Wells, Bender, & Hedberg, 2019). 20.yy'ın ikinci yarısından itibaren *Salmonella* kaynaklı salgınlar artarak halk sağlığını tehdit etmeye başlamıştır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority-EFSA, 2018)'ne göre kontamine olan gıda ve su sebepli salgınlar içerisinde *Salmonella*'nın %30.7'lik oranda rapor edildiği bildirilmiştir. Avrupa Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC, 2019) tarafından yayınlanan *Salmonella* kontrol programında da birincil hayvansal kaynağın kanatlı eti olduğu belirtilmiştir. *Salmonella*'nın her yıl Dünya çapında yaklaşık 1,3 milyar salmonelloz vakasından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Desai ve ark., 2013).

Salmonella enfeksiyonu, yetiştiricilik safhasının her döneminde ortaya çıkabilmekte ancak sıklıkla kuluçkadan sonraki erken dönemde enfestasyon gerçekleşmektedir (Byrd, DeLoach, Corrier, Nisbet, & Stanker, 1999). *Salmonella* civcivlere, ebeveynlerinden vertikal veya çevresel yollardan horizontal aktarım yolu ile bulaşmaktadır (Rothrock ve ark., 2015). Kanatlı yetiştiriciliğinde Hazard Analysis and Critical Control Point-Tehlike Analizi Kritik Kontrol Programı (HACCP)

uygulamaları, kesimhanelerde kullanılan dekontaminasyon metotları kanatlı karkas ve etinde *Salmonella* varlığına karşı kısmen etkili olmasına rağmen, tam bir eradikasyon sağlayamamaktadır (White ve ark., 2007). Özellikle son yıllarda birçok antimikrobiyal ajana karşı direnç geliştirmiş olan *Salmonella heidelberg* salgını, etkili bir Salmonella Kontrol Programı'nın son derece önemli ve elzem olduğunu ortaya koymuştur (Vugia ve ark., 2004). Ulusal Salmonella Kontrol Programları, üretim prosesinin en başından tüketiciye ulaşıncaya kadar tüm basamaklarda, uygun örnekleme yöntemine göre izlenmektedir. Bu izlemede damızlık sürüler, ticari üretim kümesleri, kesimhaneler ve kanatlı ürünleri materyal olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmaların sonucunda elde edilen epidemiyolojik veriler ışığında bulaşma kaynakları analiz edilmekte ve bu bulgulara bağlı olarak bu patojeni azaltma programları geliştirilmektedir. Birçok ülkede uygulanan "Ulusal Salmonella Kontrol Programı"nın temel amacı; öncelikle üretim aşamasında *Salmonella* yükünün belirlenmesi, elde edilen verilere ve üretim şekline göre *Salmonella* azaltma programının uygulanmasıdır. Ülkemizde, Salmonella ve Belirlenmiş Diğer Gıda Kaynaklı Zoonotik Etkenlerin Kontrol Altına Alınması Yönetmeliğinin 12. maddesi gereği bu programın geliştirilmesi için ihtiyaç duyulan sörvey çalışması, 2014-2017 yılları arasında Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenerek Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü işbirliği ile yürütülen 113R036/113R037 no'lu 'Kanatlı Hayvanlardan ve Gıdalardan Salmonella İzlenmesi ve Kontrol Programlarının Geliştirilmesi' projesi kapsamında yapılmış ve bu proje ile elde edilen bilimsel veriler ışığında "Ulusal Salmonella Kontrol Programı" hazırlanmıştır (GKGM, 2018).

Salmonella kontrol programlarında, temelde kalitatif (var/yok) ve kantitatif (en muhtemel sayı yöntemi) olmak üzere iki ana yöntem kullanılmaktadır. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (TGK, 2011)'nde 2018 yılında yapılan değişiklik ile; damızlık tavuk (*Gallus gallus*) sürülerinden, yumurtacı tavuklardan, broyler ve damızlık ve etlik hindi sürülerinden elde edilen çiğ etlerde (25 g) uluslararası kabul görmüş referans bir metot ile monofazik *Salmonella* typhimurium 1,4,[5],12:i: dahil olmak üzere *Salmonella* Typhimurium (*S*. Typhimurium) ve *Salmonella* Enteritidis (*S*. Enteritidis) serovarlarının sadece varlığının kontrolünün (var/yok) yapıldığı kalitatif yöntem kullanılması ve etlerde bulunmaması gerektiği

belirtilmiştir (TGK, 2018). Bu yöntem, söz konusu enfeksiyonla kontamine olmuş tonlarca kanatlı eti ve et ürününü etkilemesi ve gerek insan gerekse hayvan sağlığını tehdit etmesi düşünüldüğünde yeterli olmamaktadır. Bunun yanı sıra kantitatif yöntem analizlerinin de yapılması gerektiği, birçok bilimsel çalışmayla da kanıtlanmıştır (Sampedro ve ark., 2019).

Hem ekonomik hem de halk sağlığı açısından bu denli önemli olan *Salmonella* enfeksiyonu, kontrol programları, bilimsel araştırmalar ve yasal düzenlemeler vasıtasıyla kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Bu programların ve araştırmaların amacı, *Salmonella* spp.'nin gıdalardaki varlığının ve prevalansının belirlenmesinin yanı sıra bu patojenlerin sayısının düşürülmesi ile halk sağlığı açısından oluşabilecek risklerin de azaltılmasını sağlamaktır. Kanatlı karkaslarında bulunan patojenlere ilişkin insan sağlığı risklerini değerlendirmek için, nicel mikrobiyal risk değerlendirmeleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır.

Non-typhoid salmonellozda, etkenin enfeksiyon dozu 1 CFU'ya kadar inebilmektedir (Silva, Magalhaes, Freire, & Delerue-Matos, 2018). Halk sağlığı açısından mikrobiyolojik risklerin değerlendirilmesinde, etkenin prevalansının belirlenmesindense, mikroorganizmanın kontaminasyon seviyesinin belirlenmesi, kontamine gıdanın tüketilmesiyle hastalık oluşturabilecek en düşük canlı mikroorganizma sayısı ve alınan dozda ne kadar canlı mikroorganizmanın bulunduğunun saptanması daha çok önem arz etmektedir (Mead ve ark., 2010; McEntire, Acheson, Siemens, Eilert, & Robach,2014). Sampedro ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada, patojenlerin halk sağlığına etkilerinin belirlenmesinde kantitatif risk değerlendirme metodunu kullanarak, patojenlerin etkisini belirlemiş ve bunun sonucunda risk değerlendirme ve yönetimi için patojen sayımının gerekli olduğunu bildirmiştir. Machado ve ark. (2017) ise, benzer bir ifade ile *Salmonella* kontrol programlarının etki değerlerinin incelenmesinde, patojenlerin varlığının var-yok testi ile prevalans değerlendirilmesinin yanı sıra mikroorganizmaların sayısının ve yoğunluk seviyelerinin de birlikte ölçülmesi gerekliliğini rapor etmiştir. Bu şekilde uygulanacak metodoloji ile yani hem kalitatif hem de kantitatif analizlerin birlikte değerlendirilmesi neticesinde, çiftlikten sofraya gıda güvenliği kapsamında etkili bir koruma ve kontrol sağlanmış olacaktır. Yapılan diğer çalışmalarda da (Straver ve ark., 2007; WHO, 2012), kontamine bir gıdada patojen yoğunluğunun azalmasının, halk

sağlığı açısından direkt etki gösterdiği ortaya konulmuş olup, üretimden tüketime her aşamada *Salmonella* seviyesinin azaltılması veya en aza indirilmesinin, tüketim halinde ortaya çıkabilecek halk sağlığı riskleri yönünden büyük oranda azalma sağlayacağı görüşü bildirilmiştir. *Salmonella* spp.'nin ham maddedeki seviyesinin düşük olmasının, halk sağlığını korumanın yanı sıra, kontamine ürünlerin imhasını da engelleyerek ekonomik kayıpların da önüne geçilmesini sağlayacağı belirtilmiştir (Lee, Runyon, Herrman, Phillips, & Hsieh 2015).

Salmonella enfeksiyonlarının tanısı için serolojik ve genetik tabanlı analiz yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemlerin temelinde "Gold Standart" olarak da adlandırılan yöntem, kültür yöntemidir. *Salmonella* tanısında antikorların belirlenmesi için kullanılan testler ve Polimerase Chain Reaction (PCR) analizi, hızlı sonuç vermesi nedeniyle, gıdaların nakledilmesi ve kesim sırasındaki kontaminasyonların belirlenmesinde oldukça önemlidir. Fakat bu yöntemler, tek başına yeterli olamayacağından tamamlayıcı amaçla klasik kültür yöntemiyle kombine olarak kullanılması gerekmektedir (Lee ve ark., 2015).

Salmonella spp.'nin, özellikle *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium serovarlarının prevalansının var-yok düzeyinde tespit edildiği yasal düzenlemelerde, karkasta bulunabilen bu patojenlerin sayısının belirlenmesi ve bulunan sayılar ile ilgili limitler ve standartlar bulunmamaktadır. Söz konusu patojenin gıdalardaki varlığını, bulunup bulunmamasını tespit etmek tam anlamıyla etkin bir koruma sağlamamaktadır. Bu nedenle, aynı zamanda patojenin sayısı ve konsantrasyonunun da belirlenmesi, dolayısı ile yasal yönetmeliklerdeki risk analizlerinin, gıda güvenliği ve halk sağlığına yönelik tasarlanmasının gerekli olduğu bildirilmektedir (Guillier ve ark., 2013; Machado ve ark., 2017).

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Salmonella* spp.'nin sayısının belirlenmesi için, farklı gıda ve çevresel örneklerde farklı metotlar uygulandığı görülmektedir. Bunlardan bazılarında; kesim prosesinde broyler karkas ve parçalarında (Borges ve ark., 2019; Hardie, Guerin, Ellis, & Leclair, 2019; Waghamare, Paturkar, Vaidya, Zende, & Ingole 2019), buzlarda ve içeceklerde (Waturangi, Wiratama, & Theresia, 2019), tüketime sunulan kırmızı etlerde (sığır, koyun, domuz) (Thung ve ark., 2018; Yang ve ark., 2019), tavuk göğüs eti ve karaciğerinde (Jung ve ark., 2019; Kim, Park, Lee, & Ricke 2017), serbest sistem

yetiştiricilik yapılan tavuk işletmelerinden alınan yumurta ve çevresel örneklerde (Gole ve ark.,2017; McWhorter, & Chousalkar, 2019), kesimhane sanitasyon ajanlarının etkinliğinde (Mohammed, Hasan, Kerth, Riley, & Taylor, 2018), atık sularda (Zappelini ve ark., 2017) *Salmonella* sayıları belirlenirken, USDA-FSIS, FDA-BAM, ISO 6579:2002 ve ülkelerin kendi ulusal standartları veya valide edilmiş modifikasyonlarının kullanıldığı bildirilmiştir.

Bu metotlar içerisinde, Türkiye ve AB'nde geçerli görülen 'Microbiology of Food and Animal Feed - Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella - Part 2: Enumeration by a Miniaturized Most Probable Number Technique' (ISO 6579-2:2012 Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi - Salmonella Sayımı ve Serotiplerinin Belirlenmesi için Yatay Yöntem - Bölüm 2 - Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı (EMS) Tekniği ile Sayım) standardı metodu kullanılarak yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan; Roccato ve ark. (2015), kanatlı burger ve sosislerinde, Pesciaroli ve ark., (2017) domuzlarda sekum içeriği ve karkas örneklerinde, Massacci ve ark., (2020) domuz fekal örneklerinde, Machado ve ark. (2020), broyler karkaslarında ve Perin ve ark. (2020) ise broyler parça etlerinde, ISO 6579-2:2012 metodu ile *Salmonella* yükünün belirlenmesini araştırmıştır. Bu standart, 2002 yılındaki standardın revize edilmesi sonrasında 2012'de yürürlüğe girmiş ve geleneksel En Muhtemel Sayı (EMS) yönteminin iş gücü ve sarflarının azaltıldığı minyatür bir format geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, ülkemizde kanatlı karkas örneklerinde, güncel ve uluslararası referans metot olan ISO 6579-2:2012 ilk kez kullanılarak *Salmonella* seviyesi belirlenecektir. Özellikle, kesim prosesindeki kritik iki aşamanın *Salmonella* kontaminasyon düzeyleri üzerindeki olası etkisi tespit edilerek kanatlı işletmesinin karkas soğutma prosedürünün etkinliği değerlendirilecektir. Ülkemizde ekonomik ve üstün bir hayvansal protein kaynağı olması nedeni ile diğer etlere göre daha fazla tercih edilen bu et tipinde en önemli gıda patojenlerini barındırabilme olasılığının yüksek olması bu çalışmanın gerekliliğini bir kez daha öne çıkarmaktadır. İnsan salmonellozlarında önde gelen olası taşıyıcı gıdalar arasında en başta yer alan broyler etlerinde *Salmonella* varlığı kadar seviyesinin ortaya konulması, etkenin hem hastalık oluşturma riskinin öngörülebilmesi hem de işletmenin alması gereken önlemleri tespit edebilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Aynı zamanda, *Salmonella*

seviyesinin azaltılması ile birlikte son üründeki (kanatlı eti ve ürünleri) tehlikenin büyük ölçüde azaltılması sağlanabilecektir. Dolayısı ile bu çalışmada elde edilecek verilerin, gıda güvenliği konusunda yetkili birimler ve yasal düzenleyiciler açısından kanatlı et ve ürünlerindeki *Salmonella* seviyesinin tespitine yönelik bir yönetmelik ve/veya tebliğ hazırlanması durumunda tarafsız bir referans olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Salmonella, ilk kez Karl Joseph Eberth tarafından 1880 senesinde tifodan hayatını kaybeden bir insanın dalağında ve mezenteriyal lenf yumrusunda tifo basili olarak bulunmuştur (Agbaje, Begum, Oyekunle, Ojo, & Adenubi, 2011). Bu etkenin tifo hastalığına sebebiyet vermesi, bu organizamaya karşı bilimsel ilgi ve yoğunluğu artırmıştır (Cunha, 2004). Bundan dört yıl sonra George Gaffky, *Salmonella* serovar *typhi*'yi saf kültür olarak Alman hastalardan izole etmiştir (Ellermeier, & Slauch, 2006; Hardy, 2015). 1886 yılında, Daniel Elmer Salmon ile Theobald Smith birlikte yaptıkları çalışmada, domuz bağırsaklarından günümüzde *S. choleraesuis* olarak adlandırılan etkeni izole ederek, yaban domuzu kolera basili olarak adlandırmıştır. 1888 yılında, August Gartner ani olarak kesilen bir sığırda *S.* Enteritidis olduğunu ve bunu tüketen 58 insanda gıda zehirlenmesi vakası gözlendiğini tespit etmiş ve bu hastalardan etkeni izole ederek insanlara bulaşan salmonellozun ilk laboratuvar teşhisini yapmıştır (Bell, & Kyriakides, 2002; Hardy, 2015). 1900 yılına gelindiğinde ilk olarak *Salmonella* cins ismi Joseph Léon Ligniéres tarafından önerilmiştir. Bu yılın başında, günümüzde *typi* olarak bilinen *typhosum* ve yine şimdilerde *paratyphi* olarak bilinen *paratyphosum* A ve B, *gallinarum* ve *typhimurium* tipleri tanımlanmıştır (Bell & Kyriakides, 2002; Brands, 2006). 1929 yılında laktozu fermente edemeyen, dekstroz ve diğer şekerlerden asit ve gaz oluşturan bu basilin isimlendirilmesinde, *Salmonella* adının kullanılması, Topley ve Wilson tarafından da kabul edilmiştir. Bulunan serotipler, Dünya üzerinde farklı yerlerde tespit edilirken, tifoidal olmayanlar Afrika ülkelerinde, tifoidal olanlar ise daha çok Güneydoğu Asya'da yaygınlık göstermektedir (WHO, 2015).

Günümüze gelindiğinde uluslararası alanda, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri ve Dünya Sağlık Örgütü iş birliğinde önerilen sınıflandırmalar kullanılmakta olup, yeni türler eklenebilmekte ve isimler değişebilmektedir (Issenhuth-Jeanjean, ve ark., 2014; Popoff, Bockemühl, & Gheesling, 2003). *Salmonella* türleri gıda zehirlenmeleri, tifo, paratifo, septisemi gibi gıda ve su kaynaklı salgınlara neden olmakta ve halk sağlığını tehdit etmektedir (Bell, & Kyriakides, 2002; Brands, 2006).

2.2. Taksonomi ve Nomenklatür

20.yy'ın ilk yarısına kadar, Gram negatif, sporsuz olan, insan, hayvan, bitki ve toprakta var olan saprofit ve patojen/kommensal bakteriler, çubuk olarak adlandırılmaktaydı. *Salmonella*'nın da bu grupta yer aldığı çubuk grubu bakteriler, *Bacterium* ve *Bacillus* olarak bilinmekteydi. *Salmonella* ismi 1960'lı yıllarda kabul görülmüş olup, 1980 yılında uluslararası bir kuruluş olan International Journal of Systematic Bacteriology Dergisi'nde, Approved Lists of Bacterial Names (Bakteri İsimlerinin Onaylanmış Listesi)'de *Enterobacteriaceae* familyasında spesifik bir cins olarak sınıflandırıldığı yayınlanmıştır (Bell, & Kyriakides, 2002; Skerman, McGowan, & Sneath, 1980).

Salmonella cinsinde bulunan diğer üyelerin sınıflandırılması gelişen tanısal teknolojilerle birlikte güncellenmektedir. Bu cins içerisindeki ayrımlar homolog antiserumlar vasıtasıyla meydana gelen aglütinasyon reaksiyonlarına göre antijenik olarak birbirinden ayrılabilmektedir (Guibourdenche ve ark., 2010; Grimont, & Weill, 2007). *Salmonella* cinsi, rRNA dizi analizlerine göre *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere ikiye, *Salmonella enterica* ise, genomik ve biyokimyasal farklılık/benzerliklerine göre 6 alt türe ayrılmaktadır (Crosa ve ark., 1973) (Tablo 2). *S. enterica* subsp. *enterica* (I) büyük oranda memelilerde bulunur, insan ve sıcakkanlı hayvanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının yaklaşık %99'unu oluşturur (Reeves, Evins, Heiba, Plikaytis, & Farmer, 1989).

Tablo 2. *Salmonella enterica* alt türleri (Crosa ve ark., 1973)

I	*S. enterica* subsp. *enterica*
II	S. *enterica* subsp. *salamae*
IIIa	*S. enterica* subsp. *arizonae*
IIIb	*S. enterica* subsp. *diarizonae*
V	*S. enterica* subsp. *houtenae*
VI	*S. enterica* subsp. *indica*

Salmonella'nın alt türlerinin antijen farklılıklarının belirlenmesi, 1920'li yıllarda başlamış olup, bakterilerin üzerinde bulunan O (somatik-yüzey), H (flagella), H1, H2 ve Vi (kapsül) antejinleri temel alınarak sınıflandırma gerçekleştirilmektedir.

Bu antijenler, her *Salmonella* için spesifiktir (antijenik formül). 1920 yılının sonlarına doğru yaklaşık 20 *Salmonella* serotipi identifiye edilmiş ve ilk izole edildiği yer, bulunduğu konak, oluşturduğu semptoma göre isimlendirilmiştir. İlk izole edildiği yere göre yapılan adlandırma, geleneksel bir hal alarak yeni tespit edilen serotipler buna göre isimlendirilmiştir. *Salmonella* cinsine halen yeni serotipler eklenmekte olup en güncel serotip sayısının 2659 olduğu bilinmektedir (Grimont, & Weill, 2007; Guibourdenche ve ark., 2010; Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014). *Salmonella* taksonomisi ile güncel serotip sayıları Tablo 3'te gösterilmektedir. 1980'li yılların sonuna doğru, Portekiz'de kümes hayvanlarında izole edilen, *S.* Typhimurium'un monofazik varyantı olarak (antijenik formül: 1,4,[5],12:i:-) farklı bir serotip izole edilmiş olup, hızla tüm Dünya'da yaygınlık göstermeye başlamıştır. AB ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde domuz eti ve ürünlerinde bu serotipin gıda enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmektedir (Machado, & Bernardo, 1990).

Salmonella serotiplerinin bir başka şekilde sınıflandırılması da filogeniye göre yani Kauffman ve White sınıflandırma sistemi ile alt türlerinin belirlenmesidir (Kauffmann, 1941; White, 1925). İlk kez 1926 senesinde, Phillip Bruce White tarafından gerçekleştirilmiş olan antijenlerin identifikasyonu ve isimlendirilmesi 1930'ların başlarında Fritz Kauffmann tarafından bir adım daha geliştirilerek oluşturulan White-Kauffmann şemasında, her bir *Salmonella* serotipi ve ilgili antijenik formülü gösterilmiş olup 1934 yılında ilk kez International Uluslararası Mikrobiyologlar Birliği (Association of Microbiologist) özel alt komitesince genel kullanıma açılmış ve o günden bu yana kullanılır hale gelmiştir (Bell, & Kyriakides, 2002). Birçok *Salmonella* türü olduğu için neden olduğu kompleks nomenklatür yaklaşımı sebebiyle *Salmonella* cinsinin üç türe ayrılması önerilmiştir: 1. *S. choleraesuis* (tip tür), 2. *S. typhosa* (*S. typhi*) ve 3. diğer tüm serovarları içeren *S. kauffmannii*. Bunun üzerine Kauffmann ve Edwards tüm salmonellaları içerecek *Salmonella enterica* adını önermiştir. 1966'larda Ewing tarafından bir diğer üçlü tür modeli yeniden önerilmiş; 1. *S. typhi*, 2. *S. choleraesuis* ve bunların haricindeki tüm serovarları temsil eden 3. *S. enteritidis* olarak bildirilmiştir. Özellikle bu son nomenklatür yaklaşımı ABD'nde uzun bir süre kullanılmıştır (Agbaje ve ark., 2011; Brenner ve ark., 2000).

Salmonellaların Kauffman White şemasına göre serotiplendirilmesinde, üç ana antijenik yapı olarak, somatik (O), kapsül (V) ve flagella (H) antijeni kullanılmaktadır. Somatik antijen, bakterilerin dış hücre zarında bulunmakta ve hücrenin lipopolisakkaritinin (LPS) oligosakkarit bileşenini meydana getirmektedir. Flagellar antijenler ise konakçı immun yanıtının aktivasyonunda görev almaktadır (McQuiston, Fields, Tauxe, & Logsdon, 2008).

Tablo 3. *Salmonella* taksonomisi ile güncel serotip sayıları (Grimont, & Weill, 2007; Guibourdenche ve ark., 2010; Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014)

Tür	**Alt tür (subsp.)**	**Sayı**
	enterica (I)	1586
	salamae (II)	522
Salmonella enterica	*arizonae* (IIIa)	102
	diarizonae (IIIb)	338
	houtenae (IV)	76
*Salmonella bongori**		22
Toplam		**2659**

*: Eskiden alt tür V olarak bilinirdi.

1970 senesinde alt cinsin tür olarak düşünülmesini tavsiye eden diğer bir yaklaşımda, örneğin *S. kauffmannii*'nin "alt cins I", *S. salamae*'nin "alt cins II", *S. arizonae*'nin "alt cins III" ve *S. houtenae*'nin "alt cins IV" olması önerilmiştir. Bu öneride "*S. kauffmannii*" nin serovarlarının, tür isimleri ve sonrasında serovar isimleri ile isimlendirilmeleri (örneğin "*S. kauffmannii*" serovar typhi) ve diğer üç türün serovarlarının ise kendi tür adları sonrasında antijenik formüllleri ile adlandırılmaları gündeme gelmiştir. *Salmonella* taksonomisindeki bu yoğun çalışmalara rağmen nomenklatürde dönüm noktası, 1970'lerin başında olmuş ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ve diğer moleküler analizler sonrasında cinsin içerisindeki nükleotid dizi ilişkileri ortaya konulmuştur (Agbaje ve ark., 2011; Brenner ve ark., 2000).

1987'de ise Le Minor ve Popoff (1987)'un önerisi ile *Salmonella*'nın yedi alt cinsi, alt tür (I, II, IIIa, IIIb, IV, V ve VI) olarak adlandırılmış ve alt cins III, genomik yakınlık ve biyokimyasal reaksiyonları bazında IIIa ve IIIb olarak ikiye ayrılmıştır. Alt tür IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*) monofazik "Arizona" serotiplerini, alt tür IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*) ise difazik serotipleri içermektedir.

Salmonella cinslerinin neredeyse %60'ı *S. enterica* subs. *enterica*'ya ait olup, alt türlerinin en yaygınları A, B, C1, C2, D ve E serogruplarıdır. Gıda hijyeni ve

güvenliği bakımından da *S. enterica* subsp. *enterica* en önemli alt türdür. Pasteur Enstitüsü ile Dünya Sağlık Teşkilatı Salmonella Referans ve Araştırma Merkezi (World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, WHOCC-Salm) tarafından yayınlanan raporda (Supplement 2008-2010 (No.48)) 63 adet yeni *Salmonella* serotipi ve 25 yeni varyant Multilocus Sequence Typing (MLST) analizi kullanılarak tanımlanmıştır. Bu serovarların, *Salmonella enterica* subs. *enterica*'ya ait olan 44, *Salmonella enterica* subs. *salamae'*ye 12, *Salmonella enterica* subs. *arizonae*'ya iki, *Salmonella enterica* subs. *diarizonae*'*ya* iki, *Salmonella enterica* subs. *houtenae*'ya ise üç adedinin ait olduğu tespit edilmiştir (Issenhuth-Jeanjean ve ark., 2014).

Tablo 4'te görüldüğü gibi güncel olarak; sadece alt tür I'deki serotip adları ile alt tür II, III, IV, VI ve *S. bongori*'ye ait serotipler antijenik formülleri ile 1996 yılından önce adlandırılan serotiplerden II, IV, VI ve *S. bongori*'ye ait serotipler ise antijenik formülleri ile birlikte adları da yazılarak kullanılmaktadır. Karışıklıkları önlemek amacıyla serovar ile tür arasındaki serovar ismi italik olmayıp büyük harfle başlamaktadır (Brenner ve ark., 2000).

Tablo 4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'de kullanılan güncel *Salmonella* nomenklatürü (Brenner ve ark., 2000)

Taksonomi	**Güncel Nomenklatür**
Cins (İtalik)	*Salmonella*
Tür (İtalik)	• *enterica* (I, II, IIIa, IIIb, IV ve VI) • *bongori* (Eskiden alt tür V olarak bilinirdi)
Serotip (Büyük harf, italik değil)	✓ Serotip metin içerisinde ilk defa kullanılacak ise; serotip adı 'serotip' ya da 'ser.' kısaltmasından sonra yazılır (*Salmonella* serotip (ser) Typhimurium) ✓ Alt tür I'e ait serotipler adları ile alttür II, III, IV, VI ve *S. bongori*'ye ait serotipler antijenik formülleri ile tanımlanır (*Salmonella* II 50:b:z_6, *Salmonella* IIIb 60:k:z) ✓ Alt tür II, IV, VI ve *S.* bongori'ye ait serotiplerden 1966 yılından önce adlandırılan varsa adları da yazılır [*Salmonella* ser. Marina (IV 48:g,z_{51}:-)]

2006 yılında Amerika Mikrobiyoloji Derneğinin yayınladığı *Salmonella* nomenklatürüne göre, türlerin yazılışında metin içerisinde ilk defa geçecekse "*Salmonella enterica*" şeklinde tam olarak yazılacağı, sonrasında geçen kısımlarda kısaltma yapılarak "*S. enterica*" olarak yazılması gerektiği, alt tür ayrımında da aynı şekilde ilk defa geçecekse tam olarak yazılması, sonrasında ise kısaltma kullanılabileceğini bildirmektedir. Örneğin; ilk kez "*Salmonella* enterica subsp.

diarizonae" yazılırken sonrasında "*S. enterica* subsp. *diarizonae*" şeklinde yazılmalıdır. Serovarlarda ise ilk defa "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium", sonra geçen kısımlarda ise "*Salmonella* serotype Typhimurium" şeklinde olması gerektiği belirtilmektedir (Lin-Hui Su, 2007). Alt tür I serotiplerde, kullanımı kolaylıştırmak adına *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *typhimurium* yerine *Salmonella* Typhimurium veya *S.* Typhimurium olarak kullanılabileceği de ifade edilmektedir (Bell, & Kyriakides, 2002; Brenner ve ark., 2000).

2.3. Etiyoloji

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan, fakültatif anaerob, çubuk şeklinde Gram negatif basildir. Boyutları 0,2-1,5×2-5 µm'dir. *Salmonella gallinarum* ve *Salmonella pullorum* haricinde diğer üyeler flagella ile hareket eder. Bu cins içerisinde yer alan tür ve alt türler solunum ve fermentatif yollarla besinlerini metabolize eder yani kemoorganotrofiktir (Popoff, & Le Minor, 2005). *S. paratyphi* A ve *S. choleraesuis* serovarları haricinde çoğu hidrojen sülfür üretir, cinsin büyük çoğunluğu laktozu fermente edemez, metilen mavisi veya karbolfuksin gibi yaygın boyalarla kolayca boyanabilmektedir. Bu özellikler, *Salmonella*'nın kültüre edilmesi, izolasyonu ve tanımlanmasında oldukça fayda sağlamaktadır (Rambach,1990).

Salmonella üremesi için gerekli olan optimal sıcaklık 37°C olup, 5°C- 45°C aralığında da gelişme gözlendiği bildirilmektedir. Yüksek pH değerlerinde, flagella ve fimbria gibi hücresel bileşenlerini kullanamayan salmonellalar için optimal pH değeri 6,5-7,5 arasında değişen oranlarda olup 4,0-9,0 pH aralığında gelişebilmektedir. Salmonellalar asidik ortama uyum sağlayabilirken ısıl işleme karşı duyarlıdır. Dondurulduğu takdirde uzun yıllar canlılığını devam ettirebilir. Desimal indirgenme süresi (D65˚C) 0,02-0,25 dakika arasındadır. Salmonellaların çoğu serotipi, 0,94-0,99 su aktivitesi (a_w) aralığında çoğalabilir. Oksidasyon-Redüksiyon (Eh) potansiyeli de gelişim için önemli olan diğer bir faktördür. *Salmonella* aerobik koşulların yanı sıra anaerobik koşullarda da gelişebilmesine rağmen, gelişme -30 mV'nin altındaki potansiyel değerlerde engellenebilmektedir. Salmonellalar özel bir besin maddesine ihtiyaç duymamakta, basit glukoz-tuz ortamında üreyip gelişebilmektedir. Salmonellalar karbon ve nitrojen kaynağı olan birçok besi yerinde besin ihtiyaçlarını

karşılayarak gelişebilir. Bunun yanı sıra, kompleks besi yerlerinde hızla üreyebilmekte, düşük pH değerine karşı daha dayanıklı olabilmektedir. Bulunduğu ortamdaki diğer salmonellaların miktarı da, gelişimini ve üremesini etkilemektedir. Başlangıçtaki seviyesi 10 adet/g olan *Salmonella* sayısına göre 10^7 adet/g sayıda bulunması, *Salmonella*'nın daha düşük bir pH değerinde gelişebilmesine imkan sağlamaktadır.

Bu bakterilerin katı besi yerinde oluşturduğu koloniler, ortalama 2-4 mm çapında, yuvarlak, parlak, düzgün kenarlı ve hafif kabarık görünümdedir. Aynı zamanda sıvı besi yerinde, hafif bulanık ama homojen bir görünüm meydana getirerek üreyebilmektedir. Tipik paratifoid *Salmonella*, glukozu, dulsitolü, mannitolü ve maltozu fermente ederken, laktoz, sakkaroz, malonatı fermente edemez. *S. arizonae* ise laktozu hızlı fermente edemez (Cliver, 1990; İzgür, 2006). Salmonellaların biyokimyasal özellikleri Tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Salmonellaların temel biyokimyasal özellikleri (Bell, & Kyriakides, 2002)

Özellik	**Reaksiyon**
Katalaz	+
Oksidaz	-
Laktozdan asit üretimi	-
Glukozdan gaz üretimi*	+
İndol	-
Üreaz üretimi	-
Triple Sugar Iron agardan Hidrojen sülfit üretimi	+
Karbon kaynağı olarak sitrat kullanımı*	+
Metil Red	+
Voges Proskauer	-
Lizin dekarboksilasyonu	+
Ornitin dekarboksilasyonu	+

+ : pozitif reaksiyon; - : negatif reaksiyon
*Bu testlerde *S. typhi* negatif reaksiyon gösterir.

Salmonella yüksek içerikli tuz konsantrasyonlarında (yaklaşık %8'e kadar) canlılığını sürdürebilmekte, bu nedenle deniz suları ve sahillerden izole edilebilmektedir. Üremesi ve hayatta kalması yönünden çevre koşullarından fazla etkilenmeyen ve doğada, bitki ve hayvanlardan izole edilebilen bu güçlü bakterinin, dezenfektanlara (formaldehit, hidrojen peroksit, ozon, laktik asit, peroksidaz katalizli bileşikler, kuarterner amonyum bileşikleri ve biguanidler) ve gıda koruyucularına karşı çoğunlukla duyarlı olması, halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından koruma ve

kontrolde büyük avantaj sağlamaktadır (Buhr ve ark., 2012; Cox ve ark., 2007). Söz konusu dezenfektanlar fumigasyon, püskürtme, daldırma yöntemleriyle kuluçkada yumurtalara uygulanabilmektedir. Yapılan çalışmalar, dezenfektanlara etil alkol ve çinko türevleri ile organik asitlerin katılmasının kanatlı yemlerinde *Salmonella* yükünde azalmalara neden olduğunu göstermektedir (Ha, Maciorowski, & Ricke, 1997; Park, Birkhold, Kubena, Nisbet, & Ricke, 2004). Smyser & Snoeyenbos (1979) yaptıkları çalışmada kanatlı yemlerinde organik asitlerle birlikte formalinin sürekli ve en etkili sonucu verdiğini rapor etmiştir.

Gıda zehirlenmeleri içerisinde salmonellalar ilk sıralarda yer almaktadır. Bunun nedeni, birçok çevre şartlarında yaşamını devam ettirebilmesi ve gıda maddelerinin üzerinde uzun süre canlı kalabilmesidir (Erol, 2007). Salmonelların farklı çevrelerde ve gıdalarda canlı kalabilme süreleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. *Salmonella*'nın bazı çevre şartları ve gıdalarda canlı kalabilme süreleri (Erol, 2007)

Ortam	**Süre**
Toprak	360-480 gün
Su	20-200 gün
Atık su	500-1000 gün
Sığır karkası	930 gün
Taze et	14 gün
Dondurulmuş et	>1500 gün
Süt	60-140 gün
Peynir	240 gün
Tereyağı	105 gün
Süt tozu	590 gün
Dondurma	2500 gün
Kurutulmuş yumurta	4700 gün
Balık unu	360 gün

Salmonella serovarlarının geleneksel Kauffmann-White şemasıyla sınıflandırması, hem somatik hem de flagellar antijenlere dayanmaktadır. Salmonellalarda genel olarak 3 tip antijen bulunmaktadır. Bunlar; (1) somatik 'O' antijenleri ve (2) flagellar 'H' antijenleri ile (3) yüzey 'Vi' antijenidir. Salmonellalar O antijenleri ile serogruplara, H antijenleri ile de serovarlara ayrılmaktadır. Hareketli veya hareketsiz tüm salmonellalar en az bir adet O antijeni taşımaktadır. Somatik O antijenik yapısı, salmonellaların 60'dan fazla serogruba ayrılmasına sebep olan değişik faktörler içermektedir (İzgür, 2006).

Flagellar antijenleri birbirlerinden farklı yapı ve karakterde değişik komponentlerden oluşmaktadır. Bu antijenlerin salmonellalar için özgün olanlarına spesifik faz veya Faz-1 antijenleri adı verilmektedir. H antijenlerinin diğer bir kısmı ise kültürde üreme sırasında farklılaşarak yerlerine yeni yapıda antijenler oluşmaktadır. Bu tür antijenler birçok *Salmonella*'da görülebildiklerinden dolayı bunlara non-spesifik veya Faz-2 antijenleri adı verilmektedir. Salmonellalarda bulunan kapsüler 'Vi' antijeni, somatik O antijeninin en dışında glikolipid yapısında yüzeysel bir antijen olup tüm salmonellalarda bulunmamaktadır (Jay, 2000).

2.4. Epidemiyoloji

Gıda kaynaklı bulaşan hastalıkların en önemli etkenlerinden biri de *Salmonella* olup her yıl ortaya çıkan diyare semptomlarının yaklaşık %9'unun nedeni olduğu belirtilmektedir. Dünya genelinde enterit ile seyreden enfeksiyonların morbiditesi ve mortalitesi oldukça yüksektir. EFSA 2019 raporunda, 2018 yılında Avrupa'da görülen doğrulanmış toplam salmonelloz vaka sayısı 91.857 olarak bildirilmiştir (EFSA, 2019). Her yıl Dünya'nın farklı ülkelerinde görülen 94 milyon *Salmonella* kaynaklı enfeksiyon vakalarının 155.000'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmektedir. Genellikle bu vakaların yaklaşık %85'i kontamine gıdaların vücuda alınmasıyla oluşmaktadır (Majovicz ve ark., 2010). Bu hastalıklara neden olan en yaygın *Salmonella* etkeni ise NTS olduğu belirtilmektedir. Salgın etkenleri bulundukları coğrafyaya göre farklılık gösterebilmektedir. 2016-2018 yılları arasında, Avrupa'da en sık görülen dört serovar olan Enteritidis, Typhimurium, monophasic Typhimurium, 1,4,[5],12:i:- ve Infantis'in bu senelerde tespit edilen toplam vakanın %73'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir (EFSA, 2019). Az gelişmiş ve alt yapının büyük sorun oluşturduğu (özellikle temiz içme suyu bulmanın zor olduğu) ülkelerde enterik ateşle seyreden ve halk arasında tifo olarak bilinen sistemik hastalık sık gözlenmekte iken gelişmiş ülkelerde daha çok *S.* Typhimurium'un neden olduğu gıda zehirlenmeleri ile karşılaşılmaktadır (Hardy, 2004).

Endüstrileşme ve insan nüfusunun artması sonucunda, gıdaya erişimin zorluğu da beraberinde gelmiştir. Aynı zamanda küreselleşen Dünya'da gıda arzı geleneksel tarzdan daha çok yemeye hazır, fast food, çiğ veya az pişmiş gıdalara dönmüştür. Bu tarz beslenme alışkanlıkları, insanların gün geçtikçe immun sisteminin zayıflamasına

neden olup, gıda teknolojisinde uygulanan hatalı işlemler, insan ve hayvan sağlığını tehlikeye sokmuştur. Tüm bu nedenlerden dolayı *Salmonella* başta olmak üzere diğer gıda kaynaklı patojenlerin kontaminasyon oranı da artmıştır (Newell ve ark., 2010; Tauxe, Doyle, Kuchenmüller, Schlundt, & Stein 2010; Quested, Cook, Gorris, & Cole, 2010).

Salmonella epidemiyolojik olarak, konak spesifik ve konak spesifik olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Konak spesifik olanlar da sadece insanlarda ve sadece hayvanlarda enfeksion oluşturan olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yalnızca insanlarda enfeksiyon oluşturan salmonellalar, tifo ve paratifo olarak bilinen *S. typhi, S. paratyphi* A, *S. paratyphi* C serotipleri olup, sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu grup içerisinde, mortalite ve morbiditenin en yüksek olduğu serotip, tifo (typhod fever) olup, inkübasyon süresi en uzun olan ve yüksek ateş ile karakterize septomlar gösteren tiptir. Paratifo (paratyphoid fever) sendromu ise tifoya göre daha yumuşak seyir göstermektedir. Yalnızca hayvanlarda enfeksiyon oluşturan serotipler, hayvanlar için patojen olup gıdalarda da bulunabilmektedir. Bu sınıfta; kanatlılarda *S. gallinarum*, sığırlarda *S. dublin*, atlarda *S. abortus equi,* koyunlarda *S. abortus-ovis* ve domuzlarda *S. choleraesuis* serotipleri bulunmaktadır. Konak spesifik olmayan salmonellalar ise, insan ve hayvanlar için patojen olan, gıda kaynaklı salgınlara ve enfeksiyonlara sebep olan serotipler olup, *S.* Enteritidis ve *S.* Typhimurium, bu grupta sınıflandırılan serotiplerdir. Konak spesifik özelliğin nedenleri ise halen tam olarak bilinmemektedir (Erol, 2007).

Salmonella'dan kaynaklanan gıda enfeksiyonlarının oluşum zincirinde yem maddesi, hayvanlar, gıda ve insanlar arasında bir etkileşim bulunmaktadır. *Salmonella* enfeksiyonlarının hayvanlardaki epidemiyolojisinde, evcil hayvanların sürüler halinde olması, yemlerin, yem katkı maddelerinin ve meraların kontamine olması, kontamine sular, atık sular, mezbaha atıkları, enfekte yabani hayvanlar, kuşlar, fareler, rodentler ve insektler enfeksiyon halkalarını oluşturur. Özellikle kanatlı hayvanlar ve diğer kasaplık hayvanlar da kesim öncesi aşamalarda enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırır. Salmonellalar, Dünya'nın her yerinde bulunan zoonotik enfeksiyon etkenleridir. *Salmonella typhi* ve diğer birkaç serotip dışındaki *Salmonella* serotiplerinin çoğuna doğal olarak hayvanların gastrointestinal sistemlerinde rastlanır. Dolayısı ile salmonellalar, gıda üretimi amacıyla yetiştirilen sığır, koyun, keçi, domuz, tavuk, hindi

ve ördek ile kedi, köpek gibi evcil hayvanların bağırsaklarında da bulunur. Evcil hayvanların %1-3'ü değişik *Salmonella* türleri ile enfektedir. Özellikle semptom göstermeyen taşıyıcılar, bulaşmada oldukça etkin bir rol oynar. Salmonellalar, ayrıca hemen her tür yabani hayvanlar ile fare, rat, reptil ve insektlerde bulunarak çevresel kontaminasyona neden olmak suretiyle de gıda üretim zincirinde kontrolü oldukça zorlaştırır.

Ülkemizde hayvansal gıdaların farklı *Salmonella* serotipleri ile çok yüksek oranda kontamine olduğu ve bu gıdaların tüketilmesine bağlı olarak gıda kaynaklı salmonelloz vakalarının görüldüğü bilinmektedir. Gıda üretim zincirinin tüm aşamalarında kontaminasyon riski yüksek olmasına karşın, kanatlı hayvanların kesim sürecinde tüy yolma, iç organların çıkarılması ve soğutma işlemlerinde, çapraz kontaminasyon riski iki katına kadar çıkmaktadır. Kanatlılarda transovaryal veya yumurta kabuğu ile oluşan bulaşlar sonucunda, etken canlı hayvanda hastalığa neden olmadan taşınabilmektedir. Sığır, koyun ve keçilerde de klinik semptom göstermeksizin yayılım gösterebilir, ayrıca kesim prosesinde deri yüzme, iç organların çıkartılması aşamasında çapraz kontaminasyona neden olabilir (Erol, 2007). Ulusal ve uluslararası düzeyde yem, canlı hayvan ve hayvansal ürün ticaretinin artmasına ve turizmin hızlı yaygınlaşmasına bağlı olarak, hayvansal gıdalardan kaynaklanan *Salmonella* enfeksiyonlarının sayısı da tüm Dünya'da belirgin bir yükseliş göstererek önemli halk sağlığı problemlerine neden olmaktadır. Günümüzde, gelişmiş ülkelerde dahi rapor edilen gıda kaynaklı salmonelloz vakalarının sayısının gerçek vaka sayısının çok aşağısında olduğu ve bu konuda ülkemizde sağlıklı veri tabanının bulunmadığı da bilinen bir gerçektir. Enterik ateş haricinde çoğu *Salmonella* enfeksiyonlarının çocuklar ve yaşlı insanlar dışında nispeten daha hafif görülmesi, bu hastalığa verilmesi gereken önemi azaltmamalı ve yine her yıl *Salmonella* enfeksiyonlarının sebep olduğu iş gücü ve tedavi harcamalarına ilişkin büyük ekonomik zararlar da göz ardı edilmemelidir.

Hayvansal gıdalar içerisinde başta kontamine kanatlı hayvan etleri ve yumurta ile bunlardan yapılan ürünler, kırmızı et ve ürünleri, kontamine süt, pastacılık ürünleri, krema, dondurma ve soslar ile kabuklu deniz ürünleri, çoğu insan enfeksiyonlarına neden olan en önemli kaynakları oluşturmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, farklı *Salmonella* serotiplerinden kaynaklanan gıda enfeksiyonlarının meydana gelmesinde

primer kontaminasyondan daha çok, gıdaların elde edilmesi, ambalajlanması, nakli ve muhafazası ile mutfaklarda hazırlanması aşamalarında oluşan sekonder ve özellikle çapraz kontaminasyonlar ile soğuk zincirin kırılmasının en önemli sebepleri oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca *Salmonella*'ya bağlı enterit olgularında iyileşme dönemindeki hastalar ile semptom göstermeden enfeksiyon geçiren kişiler de haftalarca ve hatta aylarca dışkılarıyla *Salmonella* etkenlerini saçmak yoluyla ciddi bir enfeksiyon kaynağı olmaktadır (Erol, 2007).

2.5. Patogenez

Salmonella serotiplerinin konakçılarda kalma süreleri ile konakçıda gösterdiği etkileri değişkenlik göstermekte ve virulansı yüksek olduğundan patogenez oldukça önem taşımaktadır (Bakowski, Braun & Brumell, 2008). *Salmonella*'nın birçok serotipi patojen olup insan konak hücrelerini istila etme, çoğalma, hayatta kalma, potansiyel olarak ölümcül olma yetenekleri bulunmaktadır (Hansen-Wester, Stecher, & Hensel 2002). Bu sayede konakçı hücreye erişmek için aslında kendi fagositozunu indüklemektedir. Bu dahiyane stratejinin altında yatan olağanüstü genetik, *Salmonella* patojenite adaları (SPI'ler), geniş kromozomal DNA bölgesinde bulunan ve istila sürecinde yer alan yapıları kodlayan gen kümelerinde bulunur (Grassl, & Finlay, 2008).

Salmonellozis, gerek konakçıya özgü olan gerekse konakçı spesifik olmayan *Salmonella* serotipleriyle kontamine gıda kaynaklarının tüketilmesi sonucunda oluşmaktadır. Kontamine gıdaların vücuda alınmasından itibaren semptomlar ortalama 12-14 saat içerisinde gözlemlenmesine rağmen, bu süre çok daha kısa veya uzun olabilmektedir. Semptomlar genellikle, bulantı, kusma, karın ağrısı (stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmesi kadar şiddetli değil), baş ağrısı, titreme ve ishalle karakterizedir. Bu semptomlara kas zayıflığı, baygınlık, orta derecede ateş, huzursuzluk ve uyuşukluk eşlik edebilir. Salmonellozisin şiddeti, ilgili serotipe ve konakçının immun durumuna bağlı olarak değişmektedir. *Salmonella* enfeksiyonu beş yaşın altındaki çocuklar, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda sağlıklı bireylere göre daha şiddetli seyredebilir. Semptomlar genellikle iki üç gün devam

etmektedir. Ölüm oranı, yaşamın ilk yılında %5.8'den, birinci ve 50. yıl arasında %2'ye ve 50 yaşın üzerindeki kişilerde %15'e kadar değişen oranlarda olmakla birlikte ortalama %4.1'dir. Hastalığı atlatanlarda semptomların kaybolmasına karşın, hastalar %5 oranında taşıyıcı olabilmektedir (Jay ve ark., 2008).

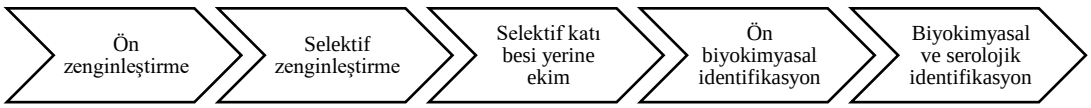
İnsanlarda mide asiditesinin azalmasına neden olan durumlarda, 1 kob'e kadar düşük sayılardaki etken, hastalık oluşumuna neden olabilmektedir (Silva ve ark., 2018). *Salmonella* midede kolonize olmayıp, ince bağırsağın distal kısmı ile kalın bağırsağın proksimal lümenine yerleşip koloni oluşturur ve hızla çoğalarak mezenteriyal lenf yumrularına erişir. Çoğu *Salmonella* serotipi bölgesel lenf yumrularının dışına çıkamaz ancak *S. typhi* ve *S. choleraesuis* gibi patojenler torasik lenf yumrularına da yayılım gösterebilmektedir. Bu yayılım neticesinde karaciğer, dalak, safra kesesi enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir. Enfekte olan safra, özellikle *S. typi* vücuda alındıktan iki hafta sonra ikinci kez bağırsak enfeksiyonu oluşturur. Ek olarak kemik ve diğer dokuları da enfekte edebilir (Finlay, 1994; Foley, & Lynne, 2008). *Salmonella* enfeksiyonlarında oluşan doku tahribatı, nötrofiller yardımıyla proteaz, miyeloperoksidaz ve NADPH oksidaz enzimlerinin salgılanmasıyla oluşmaktadır. Nadiren görülen bazı durumlarda, makrofaj yanıtı gerçekleşmeden önce kan dolaşımına etkenler geçebilmekte ve böyle bir durumda septik şok ve ölüm gözlenebilmektedir (Foley, & Lynne, 2008; Telli, 2006; Ünlü, 2011).

2.6. *Salmonella* Varlığının Belirlenmesinde Kullanılan Tanı Yöntemleri

2.6.1. Geleneksel yöntemler

Salmonella serotiplerinin izolasyonu için öncelikle örneğin belirli bir kısmının seçici olmayan ön zenginleştirmesi yapılır, sonrasında bunu selektif zenginleştirme adımı takip eder. Selektif zenginleştirme işleminden sonra selektif katı besi yerine geçiş ve şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve serolojik doğrulaması yapılır (Lee, Runyon,, Herrman,, Phillips, & Hsieh, 2015) (Şekil 1). Mikroorganizmaların farklı biyokimyasal özelliklerini kullanarak uygulanan *Salmonella* zenginleştirme yaklaşımları, Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO), Resmi Analitik Kimyagerler Birliği (AOAC), Food and Drug Administration-Bacteriological Analytical Manual

(FDA-BAM) ve Gıda Güvenliği ve Denetim Servisi (FSIS) gibi birlikler tarafından yapılmış ve standardize edilmiştir. ISO 6579:2002 metoduna göre, örneklere uygulanan tamponlanmış peptonlu su (BPW) ile ön zenginleştirme işleminden sonra Rappaport Vassiliadis (RVS) ve Muller-Kauffmann Tetrahionate-Novobiocin (MKTTn) içeren seçici zenginleştirme basamaklarından oluşur (ISO, 2002). Ön zenginleştirme (pre-enrichment) aşamasında zarar görmüş *Salmonella* hücrelerini tamir etmek ve canlandırmak amacıyla BPW ve Laktoz Broth gibi bazı selektif olmayan besi yerleri kullanılmaktadır. Daha sonraki aşama olan ve primary enrichment olarak da isimlendirilen basamakta ise ön zenginleştirme sıvı besi yeri, safra tuzları, thiosulphate, cycloheximide, nitrofurantoin ve sulphacetamide gibi birden fazla inhibitör madde içeren selektif zenginleştirme sıvı besi yerine aktarılmalıdır. Bu aşamada inhibitörlerin kullanılması, diğer bakterilerin çoğalmasını önlediğinden *Salmonella*'nın gelişmesi seçici olarak desteklenmektedir. Selektif sıvı besi yerlerinden bazıları, Rappaport-Vassiliadis (RV) broth ve Tetrathionate (TT) broth gibi, FDA-BAM ve Food Emergency Response Network (FERN) tarafından belirtilen ve kullanılan besiyerleridir. Bu sıvı besi yerlerinin *Salmonella* gelişiminin ve ortam seçiciliğinin artırılması amacı ile modifiye edilen formülleri de bulunmaktadır (Lee ve ark., 2015).



Şekil 1. *Salmonella* izolasyon ve identifikasyon şeması (Lee ve ark., 2015)

Salmonellalar, BPW'de ön zenginleştirmeyi takiben MKTTn ve RVS'de seçici zenginleştirme basamağının ardından selektif katı besi yerine aktarılır. Katı besi yerleri içerisinde en çok kullanılan besi yerleri, Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar, Salmonella-Shigella (SS) agar, Xylose-Lysine-Tergitol-4 (XLT4) agar, Bismuth-Sulfite agar, Brilliant Green agar, Hektoen Enteric agardır. Bazı serotiplerin ayırt edici özellikler göstermediği hatta XLD üzerinde üremediği için yanlış negatif sonuçlara neden olabildiği de bilinmektedir. Laktozu fermente eden *S. arizonae* serovarları, XLD üzerinde açık pembe-kırmızı, etrafı zonlu koloniler oluşturabilirken, *S. montevideo* ve

S. virchow gibi diğer serovarlar, bu agar üzerinde gelişim göstermeyebilmektedir. Dolayısıyla, iki veya daha çok selektif katı besiyerinin kullanılması veya novobiocin, thiosulphate, sulphamethazine ve malachite green gibi uygun supplementlerin besi yerine eklenmesiyle ortamın *Salmonella* yönünden seçiciliğinin ve etkenin spesifik besi yerinde üreyebilme olanağının artırılması sağlanmaktadır (Carrique-Mas, & Davies,, 2008; Lee ve ark., 2015).

Salmonella spp. olduğu belirlenen kolonilerden tipik bir-beş tanesi, ön biyokimyasal tanımlama amacıyla Triple Sugar Iron (TSI) agar ve Lysine Iron (LIA) agar içerisine inokule edilip üreme durumları incelenir. TSI ve LIA'da sırasıyla glukoz-fermantasyonu ve lizin dekarboksilaz reaksiyonları pozitif olan örneklere sonrasında yapılan üreaz testi sonucunda üreaz aktivitesi negatif olanlara, API 20E gibi diğer biyokimyasal testleri de içerisinde bulunduran identifikasyon testleri uygulanır. Biyokimyasal olarak *Salmonella* spp. olduğu belirlenen örneklere serolojik identifikasyon yani serotiplendirme aşamaları uygulanır. Bu aşamada, serogrup ve serotiplerin belirlenmesi için antijenik yapıya bağlı aglütinasyon reaksiyonlarından (lam ve tüp) yararlanılır (Sørensen, Alban, Nielsen, & Dahl, 2004). *Salmonella* örnekleri konvansiyonel (geleneksel) yöntemle serotiplendirilemiyorsa, Pulsed Field Gel Electrophorezis (PFGE) yöntemiyle tiplendirme yapılabilir. Konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler, güvenilir, hassasiyeti yüksek ve moleküler yöntemlere göre ucuz olması gibi nedenlerle gıda güvenliği ve halk sağlığı için vazgeçilmez referans yöntemlerdir (Gracias, & McKillip, 2004; Maciorowski, Herrera, Jones, Pillai, & Ricke, 2006).

2.6.2. Hızlı yöntemler

Klasik yöntemlerden başka *Salmonella* analizi için kullanılan bir diğer yöntem hızlı yöntemlerdir. Bu yöntemler içerisinde, klonlama ve rekombinant DNA kullanım prensibine göre geliştirilmiş ve validasyonları yapılmış birkaç tanı yöntemi bulunmaktadır. Hızlı yöntemlerin, klasik mikrobiyolojik yöntemlere göre sarf malzeme kullanımı, örnek işleme, depolama alanı oluşturma, zaman ve iş gücü alanlarında avantaj sağlayarak tercih edilme oranı artmaktadır.

Piyasada bulunan mevcut hızlı yöntemler, yeni seçici ortam, modifiye edilmiş geleneksel prosedürler, immunolojik testler ve nükleik asit temelli testler olmak üzere kategorilere ayrılır. ELISA ve PCR tabanlı yöntemlerde, ELISA testleri, 10^4-10^5 ml seviyesinde *Salmonella* konsantrasyonunu tespit edebilirken, PCR testleri, zenginleştirmeden sonra 10^4 ml düzeyinde hassasiyet derecesi sağlamaktadır. Bu yöntemlerin güvenilirliği; mikrofloraya, örnek matrisine, kültürü yapılamayan hücrelere ve engelleyici maddelere göre değişkenlik gösterebilmektedir (Alakomi ve Saarela, 2009; Lee ve ark., 2015).

2.6.3. Nükleik asit temelli uygulamalar

Nükleik asit tabanlı hızlı testler, mikroorganizmanın içerisinde bulunan belirli bir nükleik asit hedef dizisini kullanır. Bu testler, diğer yöntemlerden daha duyarlı, özgün ve kapsamlı olması gibi avantajları bulunduğundan *Salmonella* tespitinde son yıllarda sıklıkla tercih edilmekte olup, yöntemler hızla geliştirilmektedir (Glynn ve ark., 2006). Bu testlerde kullanılan iki ana teknik, hibridizasyon (DNA probu) ve amplifikasyon (PCR) yöntemleridir. Hızla geliştirilen ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılan bu yöntemler, örneklerde çok az sayıda etken olsa bile bunları belirleyebilir ve tek seferde fazla sayıda örnek analiz edilebilmesine imkan sağlar (Cohen ve ark., 1993).

2.6.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulamaları

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi, *Salmonella* tespitinde kullanılan kültür yapılmadan, DNA'nın spesifik bölgelerinin in vitro primerler aracılı enzimatik amplifikasyon prensibiyle çalışan tekniktir. PCR, ısıya dayanıklı DNA polimeraz kullanılarak, spesifik gen dizilimini DNA fragmanlarının bir milyon katına çıkarabilir. Bu yöntemle, etkenler düşük de olsa tespit edilebilmekte ve zenginleştirme gibi süreçlerin olmaması ve hızlı sonuç alınması yöntemin avantajlarındandır (Cocolin, Manzano, Cantoni, & Comi, 1998; Eijkelkamp, Aarts, & Van der Fels-Klerx, 2009).

PCR testleri, ISO (IOS 20838:2006, ISO/DIS 22119, ISO 16140:2003, ISO 6579:2002, ISO 22174) kriterlerine göre geliştirilmiş, validasyonları yapılmış, standartize edilmiştir. PCR tabanlı ticari kitler, endüstri alanında ve acil tespit edilmesi

gereken durumlar için geliştirilmiş ve alınan doğru neticelerden dolayı başarıyla kullanılmaktadır. Bu ticari kitlerden bazıları; ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Warrington, İngiltere), Probelia (Sanofi -Diagnostics Pasteur, Marnes-laCoquette, Fransa), BAX sistemi (DuPont Qualicon, Wilmington, DE), TagMan yer alır. (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA), Gene-Trak (Neogen Corporation, Lansing, MI), iQ-Check™ PCR (BioRad Laboratories, Hercules, CA), LightCycler (Roche Diagnostics, Manheim, Almanya) ve SmartCycler (Cepheid Inc., Sunnyville, CA)'dır. Ayrıca BAX sistemi, PCR'nin *Salmonella* spp.'nin hızlı amplifikasyonu ve teşhisi için gereken tüm primerleri, enzimleri ve DNA'ları birleştiren tek formda tablet olarak geliştirilmiş ticari bir PCR yöntemidir (Bennett, Greenwood, Tennant, Banks, & Betts, 1998).

2.6.5. Real time PCR (r-PCR) sistemleri

Floresan ışıma tekniğiyle çalışan bu sistem, floresan dedektör ve sisteme bağlı real time thermocycler parçalarından oluşur. r-PCR'nin, yüksek sensitivite ve özgüllük, yüksek verimlilik, azaltılmış amplikon boyutu bu sistemin avantajları arasında sayılabilir. Ayrıca PCR sonrası adımlarda meydana gelebilcek çapraz kontaminasyonun r-PCR'de minimize olması önemli bir ayrıcalık olarak görülmektedir. PCR'nin varyasyonları, SYBR Green gibi DNA bağlayıcı boyaları veya Scorpion primerleri gibi floresan oligonükleotitleri içerir. Ayrıca moleküler işaretleri, floresan rezonans enerji transferi (FRET) probları ve TaqMan® problarını da bulundurur (Maurer, 2011). Hayvan dışkıları gibi çeşitli örneklerde, *Salmonella* tespit etmek için r-PCR ekipmanlarıyla birlikte testler de geliştirilmiş olup kanatlı karkas, çiğ süt, kırmızı ve beyaz etler, çiftlik etrafından alınan çevresel sürüntüler, meyve, sebze ve süt çiftliğinden alınan örneklerde bu testler kullanılmaktadır (Bohaychuk, Gensler, McFall, King, & Renter ,2007).

2.6.6. Minyatürize biyokimyasal testler

Bu testler, biyokimyasal analizlerin hızlı formu olup, birim zamanda daha fazla sonuç elde edilerek, az hacimde reaktif, ortam ve ekipman kullanımı bakımından pratik testlerdir. Birçok minyatür biyokimyasal analiz tek kullanımlık steril mikrotitre

plaklarından, çoklu aşılama cihazlarından ve özel substratlardan oluşur. Testlerin uygulanması esnasında, mikrotitre plakasının oyuklarına saf kültürler yerleştirilir. Belirlenen sıcaklıkta 16-24 saat inkübasyonda bekletilir. Katı ortam veya sıvı ortam üzerinde *Salmonella*'nın varlığı veya yokluğu, bir manuel tanımlama kodu yardımıyla spesifik bileşimlerin ve metabolitlerin reaktiflerle reaksiyonunun neden olduğu renk değişikliklerinin izlenmesiyle belirlenebilir. Bilgisayar arayüzlü otomatik okuyucu yardımı ile okunarak değerlendirme yapılır.

API 20E dahil *Salmonella* hızlı biyokimyasal karakterizasyonu yapabilen ticari kitler piyasada bulunmaktadır. Bu kitlerden bazıları; (bioMerieux sa, Marcy-I'Etoile, Fransa), Enterotube II (BD Diagnostik, Sparks, MD), Enterobacteriaceae Set II (önceden Mnitek II, BBL Mikrobiyoloji Sistemleri, Cockeysville, MD olarak bilinir), MICRO-ID (Remel, Lenexa, KS), EPS (Enterik Patojenler Ekranı Kart) (Vitek Systems, Hazelwood, MO), GNI (Gram Negatif Kimlik Kartı) (Vitek Systems, Hazelwood, MO), Microscan (Baxter Diagnostics, West Sacramento, CA), Dörtlü Enterik Panel (Micro-Media Systems, San Jose, CA), Quantum II (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Abbott Park, IL), Sensititre (Sensititre, Salem, NH), Tri Panel (DifcoPasco Laboratories, Wheat Ridge, CA), Vitek 2 (bioMerieux sa, Marcy-I'Etoile, Fransa) ve Walk Away (Dade MicroScan, Batı Sacramento, CA)'dır (Fung, 2002; Stager, & Davis, 1992).

2.7. Salmonellalarda Tiplendirme Metotları

Salmonella izolatlarının tiplerinin belirlenmesi, daha etkili koruma ve kontrol programları uygulanması açısından önemlidir. Söz konusu izolatların tiplendirilmesinin yapılabilmesi, her laboratuvarda mümkün olmayabilir, bunun için referans laboratuvarlar olması gerekmektedir. Ribotiplendirme, bazı çalışmalarda genotiplendirmede altın standart yöntem olarak kabul edilen PFGE testi kadar duyarlı bulunamasa da, PFGE testinden çok daha hızlı bir şekilde sonuç vermesi, deneyimli personel ve laboratuvar şartlarına gereksinim göstermeyen kapalı otomotize bir sistem olması ile bir defada birden fazla numunenin işlenmesini gerektiren epidemiyolojik çalışmalarda alternatif olması yönünden sıklıkla kullanım alanı bulmaktadır (De

Cesare, Manfreda Dambaugh, Guerzoni, & Franchini 2001; Hollis, Bruce, Fritschel, & Pfaller, 1999).

Fenotipik metotlar: Fenotipik tiplendirme; biyotiplendirme, serotiplendirme ve faj tiplendirme olarak üç farklı şekilde yapılabilimektedir.

Biyotiplendirme: Bir gün 37^{o}C'de inkübasyondan sonra selektif besi yerinde üreyen kolonilerin identifikasyon işleminde, ilk olarak saf/ari kültürden Gram boyama ve hareket muayenesi yapılır. Sonraki aşamada dekstroz, laktoz, sükroz, mannitol, maltoz, dulsitol, malonat, jelatin, üre, sitrat kullanımı, ornitin dekarboksilaz, Metil-red ve Voges-proskauer, Potasyum siyanür (KCN) ve Onitrophenyl-beta-D-galaktopyranoside (ONPG) oluşumu, indol, hidrojen sülfür biyokimyasal testleri kullanılır (İzgür, 2006).

Serotiplendirme: Salmonellaların antijenik yapıları, identifikasyon işleminde gereklidir. Serotiplendirme bakteri yapısında bulunan O ve H antijenlerinin belirlenmesi ile yapılmaktadır. O antijeni bütün *Salmonella* serotiplerinde bulunmakta olup, polisakkarit yapıdadır. Bu antijen hücre duvarında protein ve lipitlere bağlı olarak bulunur. H antijeni ise hareketli salmonellalarda bulunur, protein yapıda ve ısıya duyarlırdır. *Salmonella*'nın antijenik özelliklerine göre identifikasyonu oldukça önemlidir. İdentifikasyon işleminde öncelikle serogruplandırmada, O antijenini belirlemek için *Salmonella* polivalan antiserumları ile lam aglütinasyon testi yapılır, pozitif sonuç çıkarsa incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilir ve daha sonra 'O' spesifik grup antiserumları (A, B, C, D, ….) ile bu etkene tekrar lam aglütinasyon testi uygulanır. Hareketli salmonellalarda ise bu testlere ek olarak öncelikle Spicers Edwards antiserumları ve sonrasında grup faktör antiserumları ile tüp aglütinasyon testleri yapılarak Faz-1 ve Faz-2 belirlenir ve böylece izole edilmiş etken serotip düzeyinde identifiye edilir. **(**İzgür, 2006**)**

Faj tiplendirme: Salmonellalara ait fajlar bulunmaktadır. *Salmonella*'da yaklaşık %97 oranında lize olabilen *Salmonella* O-1 fajı, özellikle *Salmonella* cinsininin identifikasyonunda güvenilir, cinse özgü spesifik bakteriyofajdır. Faj temelli tiplendirme günümüzde hala kullanılmaktır. Halk sağlığı için önem arz eden *S. paratyphi* B, *S. typhimurium, S. enteritidis, S. agona*, *S. hadar* ve *S. virchow* gibi serotiplerde kullanılır. Özellikle gıdaların neden olduğu *Salmonella* salgınlarının

gözlenmesinde ve epidemiyolojik çalışmalarda ana metot olarak kullanılmaktadır (İzgür, 2006; Malorny ve ark., 2004).

Moleküler metotlar: Salmonellaları moleküler bazda tiplendirmek için birçok yöntem bulunmaktadır.

Pulsed- field gel electrophoresis (PFGE): *Salmonella* suşları arasında moleküler ilişkiyi belirlemede ilk yöntem olarak PFGE yöntemi akla gelmektedir. Bu yöntem, Schwartz ve Cantor tarafından bulunmuştur. DNA parçalarının ayrılması için katı matris boyunca elektrik alanının birden fazla yönde değişmesi sağlanır. Bu yöntemde; kesilmemiş DNA'nın hazırlanması, restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak DNA'nın sindirilmesi, parçaların PFGE ile ayrılması ve bantlama modellerinin görselleştirilmesi ve yorumlanması gerekmektedir. Diğer yöntemlere göre daha yavaş ve pahalı olması, spesifik ekipman, yüksek kaliteli kimyasal ve sistem hazırlığında tecrübeli personele ihtiyaç duyulması yöntemin dezavantajları olarak sayılabilir (Kaufmann, 1998).

Ribotiplendirme: Ribotipleme, endonükleazla sindirilmiş kromozomal DNA'nın agaroz jeller üzerinde ayrılmasıyla başlar, DNA daha sonra bir zara aktarılır ve parçalar, 16S ve 23S rRNA'yı tanıyan bir proba hibritlenir. Ribotip analizi, bazı yaygın serotipler ve faj tiplerine giren izolatların bazılarını açıkça alt tiplendirebilir (Landeras, 1996).

Insersiyon dizisi (IS) tiplendirme: IS200, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Helicobacter* ve *Actinobacillus* gibi çeşitli bakterilerde var olan, tek bir gen içeren, hareketli bir elementtir. IS200 tiplendirmesi, *Salmonella* suşları arasındaki moleküler ilişkileri tespit etmek için kullanılmıştır (Imen ve ark.,2012).

Randomly amplified polimorphic DNA (RAPD): Standart RAPD teknolojisinin temel prensibi, PCR ile düşük bağlanma sıcaklıkları altında toplam genomik DNA'nın nanogram miktarlarını artırmak için primer olarak rastgele dizilerin kısa sentetik oligonükleotidlerini (10 baz uzunluğunda) kullanır. Tekniğin ileriki aşamalarında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenmektedir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Williams ve ark., 1990).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP): AFLP analiz yöntemi, adaptör spesifik primerlerle yapılan PCR amplifikasyonunun ardından genomik restriksiyon parçalarına probların bağlanmasıyla uygulanan bir yöntemdir (Imen ve ark., 2012).

DNA dizileme tabanlı analizler (Multi Locus Sekans Tiplendirmesi-MLST): MLST, temizlik veya virülans genlerinin bölümlerinden DNA sekanslarını ve/veya mutasyon veya rekombinasyon olaylarına bağlı olarak değişen rRNA sekanslarını karşılaştıran bir moleküler tipleme stratejisidir. Çok odaklı sekans tiplemesi olarak da adlandırılan, yüksek ayrım gücü ile minimum insan girdisi gerektiren güçlü bir veri analizi yöntemidir. MLST, multilokus enzim elektroforezi ile elde edilenlere benzer veriler sağlar, ancak incelenen enzimin genel yükündeki ve ifadesindeki değişiklikleri taramak yerine bireysel nükleotit değişikliklerini değerlendirme yeteneğine sahip olduğundan, önemli ölçüde daha ayrıntılıdır (Maiden et al., 1998). Salmonellalarda ilk MLST şeması, yedi housekeeping gen fragmanına spesifik olarak 2002 yılında *S.* Typhi ile *S.* enterica alt türünü birbirlerinden ayırt etmek için oluşturulmuştur. Bu housekeeping genler (*aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA* ve *thrA*) kromozom üzerinde yayılmış vaziyette bulunan ve bakterilerin çeşitlilik profillerini en iyi gösteren kısımlar olarak bilinmektedir (Malorny ve ark., 2011).

DNA mikroarray tabanlı analizler: Son yıllarda hızla artan bir gelişme gösteren bu analiz yöntemlerinde, biyolojik problar minyatürize gridler üzerinde bir yüzeye bağlanmış şekilde üretilmektedir. Bu şekilde farklı *Salmonella* DNA dizilerinden elde edilen probların kullanımı ile geliştirilerek üretilmiş olan mikroarrayler (tüm genom mikroarreyleri) bulunmaktadır (Bell ve Kyriakides, 2002).

2.8. *Salmonella* Sayısının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Gıdalardaki belirli bir patojenin varlığı ve sayısı ile insan popülasyonunda neden olduğu hastalığın oranı arasında bağlantı kurmak oldukça zordur. Ancak riskin büyüklüğünü tahmin etmek, halk sağlığının korunması ve enfektif dozun belirlenmesine yönelik kamuya iletilebilecek net hedefler belirlemek için bu bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (Mead ve ark., 2010).

Kanatlı karkaslarında *Salmonella* sayımı için kullanılan geleneksel yöntem, kültüre dayalı Most Probable Number-En Muhtemel Sayı (MPN-EMS) yöntemidir.

Ayrıca Miniaturized Most Probable Number-Minyatürize En Muhtemel Sayı yöntemi (mMPN-mEMS), quantitative-kantitatif PCR (qPCR) yöntemi ve immünofloresan temelli yöntemler de *Salmonella* sayısının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdendir. McCrady (1915), tarafından yapılan çalışmada, kullanılan MPN tekniğinde, birim başına organizma sayımı için Poisson'un dağılımından yararlanıldığı bilinmektedir. Kapsamlı olarak incelenen ve yaygın olarak kabul edilen bu yöntem, diğer numaralandırma yöntemleri pratik olmadığında kullanılmaktadır (Blodgett, & Garthright, 1998; Mead ve ark. 2010). Bununla birlikte, MPN testleri zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirdiği için eleştirilmektedir. Ayrıca, yöntemin büyük örnek kümeleriyle çalışıldığında, hataya açık olduğu belirtilmektedir. Bu metot, mikroorganizma sayımında kullanılacak örneğin, seyreltilerek koloni sayımı yapma ve sonuçtan yola çıkarak örnekteki toplam bakteriyi tahmin etmeye dayalı, yaklaşık sonuç veren bir metotdur. Örneğin; karkas durulama suyundan her biri 10 ml'lik üç alikot alınarak üç ayrı steril test tüpüne yerleştirilir ve her birinden dilüsyon yapılarak (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}) inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, bu ön zenginleştirme sıvıları selektif sıvı besi yerlerine aktarılır ve 24 saat daha inkübe edilir. Pozitif tüpler belirlenerek selektif sıvı besiyerinden sonra selektif katı besi yeri üzerine ekimi yapılarak inkübe edilir. Herhangi bir şüpheli *Salmonella* kolonisinin, *Salmonella* olarak tanımlanmasını doğrulamak için biyokimyasal testlere tabi tutulur. Pozitif örneklerdeki *Salmonella* sayılarının MPN tahminlerini belirlemek için bir MPN tablosuyla karşılaştırılır (USDA, 2014). Rigby (1982), yaptığı çalışmada, broyler karkas durulama sularından, MPN yöntemini kullanarak çoğu karkasın düşük sayıda *Salmonella* içerdiğini ve MPN yönteminin bu düşük bakteri düzeylerini tahmin etmek için uygun olduğunu belirlemiştir.

En muhtemel sayı yaklaşımı, örnekdeki bakteri kontaminasyonu hakkında nicel veriler elde etmek için farklı endüstrilerde kullanılmakta olup (Sutton, 2010), ABD'nde devlet kurumları tarafından resmi bir analitik yöntem olarak tavsiye edilmektedir. Bu yöntemi iyileştirmek, kanatlı hayvanlara ait örneklerde uygulamak ve etkinliğini artırmak için bazı revizyonlar yapılmıştır. Pavic, Groves, Bailey, & Cox (2010), kanatlı ürünlerinde *Salmonella* sayımı için minyatürleştirilmiş bir MPN metodu geliştirmiştir. Geleneksel MPN ile kıyaslandığında bu metodun, süre aynı

kalsa da, iş gücünü %56, kullanılan besi yeri sarf miktarını %64 ve ekipmanları ise %25 oranında azalttığı bildirilmiştir.

Salmonella sayımı için son gelişmelerin çoğu moleküler temellidir ve rutinde tüm genom diziliminin tanıtılmasıyla önemli gelişmeler gerçekleştirilmiştir (Ricke Kim, Shi, & Park, 2018). PCR ve qPCR yöntemi, gıda matrislerinde *Salmonella* hakkında bilgi sağlamaktadır. Gıdalardan *Salmonella* tespitinde, çeşitli gen hedefleri araştırılmış olup en çok kullanılan hedef genlerden birinin *invA* olduğu bilinmektedir (Cheng ve ark., 2015). *InvA* geni, bakterinin iç zarında konakçı bağırsak hücrelerinin istilasına izin veren bir proteini kodlamaktadır. *InvA* geni, *Salmonella* cinsine özgü diziler içermekte ve bu nedenle PCR için mükemmel bir hedef olmaktadır (El-Sebay, Shady, El-Rashed El-Zeedy, & Samy, 2017). İmmünofloresan temelli yöntemlerle doğrudan sayım ise, sayımdaki düşük hassasiyet, antikor kalitesi sorunları ve florokrom bağlantısı nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır (Wang, & Slavik, 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Bu çalışmada, Balıkesir'de faaliyet gösteren günlük ortalama 200.000 adet broyler kesim kapasitesine sahip bir kanatlı kesimhanesi, Eylül-Ekim 2021 tarihleri arasında 2 aylık süre içerisinde ayda 2-3 kez olmak üzere toplam 5 defa ziyaret edildi. Hava soğutma sistemi kullanılan bu işletmede, Soğutma Öncesi (SÖ) ve Soğutma Sonrası (SS) aşamalardan steril koşullar göz önünde bulundurularak, biribine yakın olmayan, rastgele ve tarafsız örnekleme ile 480 broyler karkasını temsil eden (5 broyler boyun derisi 1 birim olacak şekilde) toplam 96 birim (48 birim SÖ + 48 birim SS=96) örnek alındı. Alınan örnekler, soğuk zincir koşulları altında en kısa süre içerisinde analiz edilmek üzere laboratuvara getirildi.

3.1.2. Standart suşlar

Karkas örneklerinden *Salmonella* spp.'nin izolasyon, identifikasyon işlemleri ve sayısının belirlenmesi ile *Salmonella* spp. spesifik r-PCR (Salm-PCR) analizlerinde, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S.* Enteritidis) 64K (M.Y. Popoff, Institut Pasteur, Paris Cedex 15, France) ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) NCTC 12416 (Refik Saydam, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara) standart bakteri suşları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.3. Cihazlar

- Hassas terazi (Precisa, 220 M SCS)
- Deiyonize ve ultra saf su sistemleri (Milipore Mili-Q Q-Gard 1)
- pH metre (inoLab pH720)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Ikamag RH)
- Su banyosu (Nüve, RT 400)
- Otoklav (Thermo Scientific, 18102A-1CE)
- Stomacher (Seward, 400 C)

• Vorteks (Stuart, SA8)
• Biyogüvenlik kabineti Tip II (Esco, AC2-4E1)
• Densimat (Biomerieux, 21250)
• İnkübatör (Thermo Scientific, Heratherm IGS100)
• Buzdolabı (Arçelik)
• -20°C'lik derin dondurucu (Arçelik)
• -80°C'lik derin dondurucu (Thermo Scientific-T series, TSX40086A)
• Blok ısıtıcı (Techne, DB-2D-FDB02DD)
• Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ND-1000)
• Santrifüj (Thermo Scientific, MicroCL 17)
• PCR kabineti (Esco)
• Light Cycler 2.0 PCR cihazı ve sistemi (Roche Diagnostics, 03531414201)
• Orbital Shaker (BT Lab Systems, BT934)

3.2. Yöntem

3.2.1. Karkastan örnek alınması (Boyun derisinden)

Örnek alma, ISO 17604:2015 Microbiology of the Food Chain - Carcass Sampling for Microbiological Analysis (Gıda Zincir Mikrobiyolojisi - Mikrobiyolojik Analiz için Karkaslardan Örnek Alma) standardı (ISO, 2015)'nın 8.2. Excision methods (Eksizyon metotları), 8.2.3. Skin sampling (Deriden örnek alma) ve 8.2.3.1. Neck skin (Boyun derisi) bölümünü gereklilikleri göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi. Bu amaçla, Eylül-Ekim 2021'de günlük ortalama 200.000 adet broyler kesim kapasitesine sahip olan kesimhane, tarafsız ve rastgele örneklemenin sağlanabilmesi için 2 ayda 5 kez ziyaret edildi. Toplamda 480 broyler karkasını (96 birim örneği) temsil edecek şekilde planlanan 48 SÖ ve 48 SS örnek alınması işleminde; 1 birim birleştirilmiş boyun derisi için 5 broyler karkasının herbirinden 10-12 g alınan ve toplam 50-60 g kadar olan örnek, saklama kaplarında +4˚C'de maksimum 1 saat içerisinde laboratuvara getirilerek *Salmonella* spp. sayısının belirlenmesi amacıyla analiz edildi (ISO, 2017).

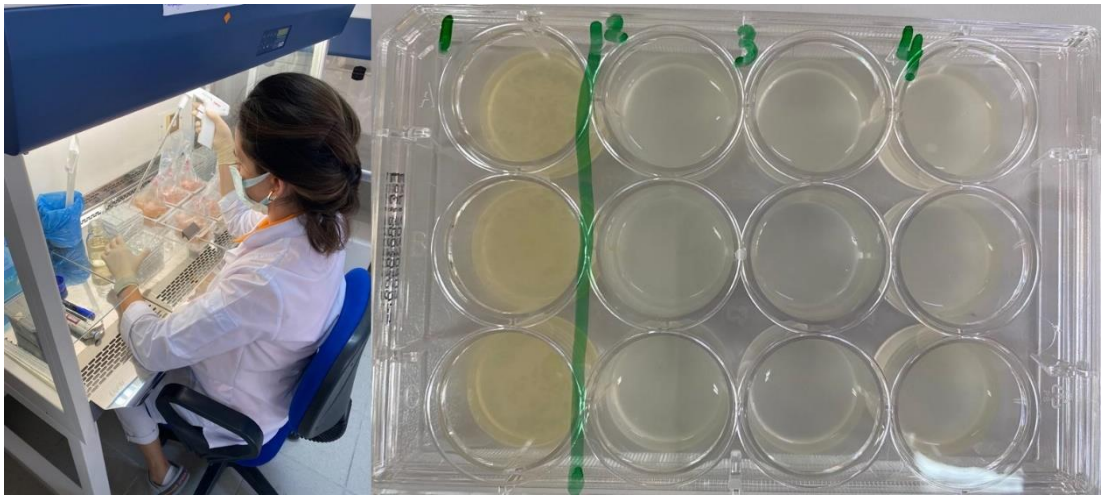
3.2.2. Karkas Örneklerinden ISO 6579-2:2012 ile *Salmonella*'nın Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı (mEMS) Tekniği ile Sayımı

3.2.2.1. Test edilecek miktar-Başlangıç süspansiyonunun hazırlanması

Laboratuvara getirilen birleştirilmiş boyun derilerine elle dışarıdan 3 dakika masaj yapıldıktan sonra, steril makas ile 25 g'lık 1 birim örnek, steril 500 ml'lik stomacher poşeti (LP Italiana, L177538) içerisine aktarıldı. Oda sıcaklığındaki 225 ml Buffered Peptone Water (BPW, OXOID, CM1049) üzerine eklenerek Stomacher'de (Seward, 400 C) 230 rpm'de 1 dakika homojenize edildi ve örneğin 1/10'luk dilüsyonu (başlangıç süspansiyonu) hazırlandı (ISO, 2012).

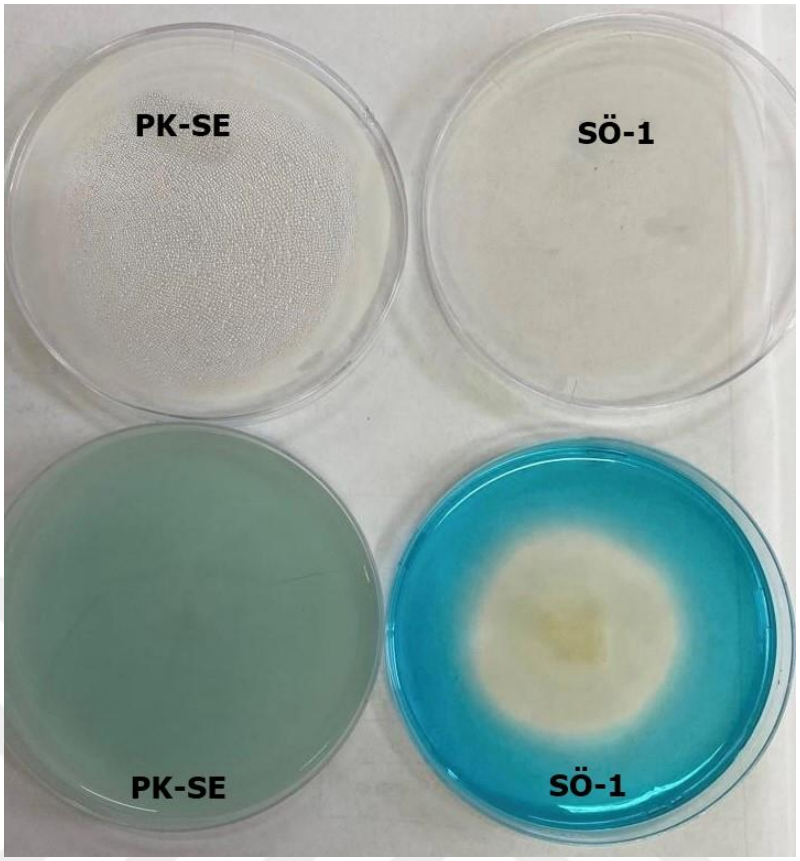
3.2.2.2. Dilüsyon ve selektif olmayan sıvı besi yerinde ön zenginleştirme (Preenrichment)

Şekil 2'de gösterildiği gibi 12 kuyucuklu plağın (ISOLAB, 122.11.012) ilk sırasında yer alan 3 kuyucuğun içerisi boş bırakılmak şartıyla diğer 2., 3. ve 4. sıralardaki her 3 kuyucuğa ön zenginleştirme sıvısı olan BPW'den 2'şer ml transfer edildi. Daha sonra ilk sırada boş bırakılan 3 kuyucuğun herbirine başlangıç süspansiyonundan 2,5 ml transfer edildi. İlk 5^{-1}'lik dilüsyon için, ilk sıradaki başlangıç süspansiyonundan pipet ile karıştırma işlemi yapıldıktan sonra 0,5 ml alınarak 2. sıradaki 2'şer ml BPW bulunan 3 kuyucuğa sırasıyla transfer edildi. Benzer işlemler birbirini izleyen diğer sütunlar için de gerçekleştirildi. Plaklar 37˚C'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakıldı (ISO, 2012).



Şekil 2. Başlangıç süspansiyonundan alınan örneğe, dilüsyon ve ön zenginleştirme aşamasının uygulanması

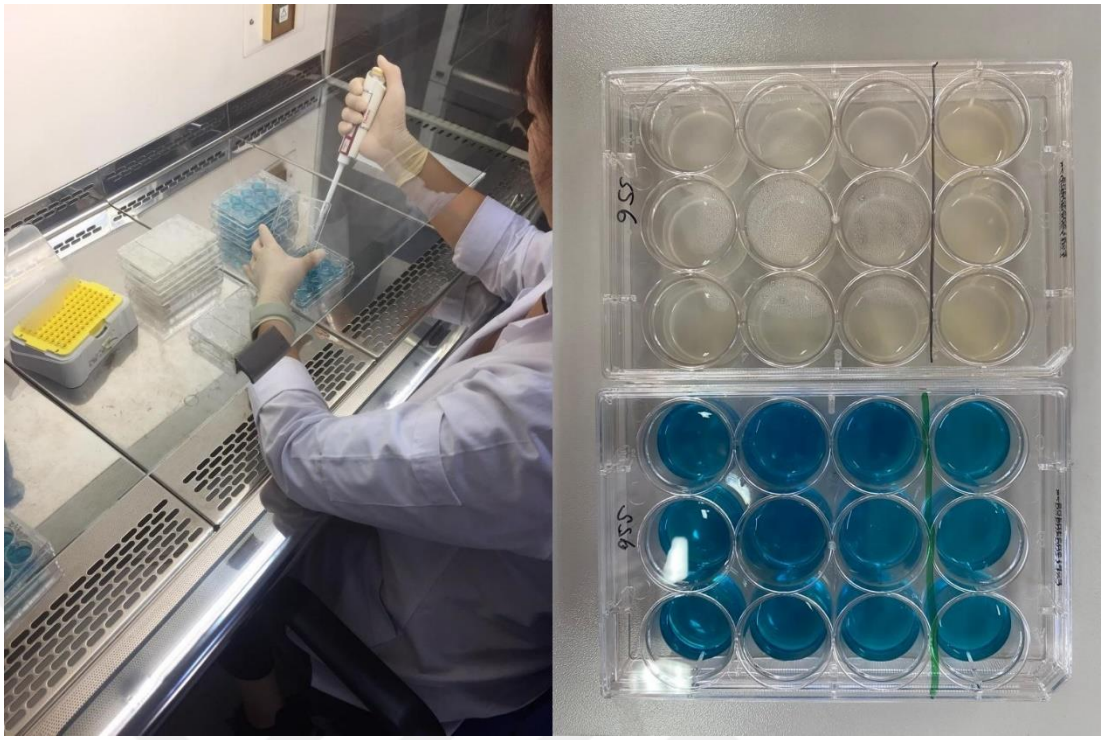
Test edilen örneklerin kontaminasyon seviyesinin tahmin edilemediği ve/veya düşük olabileceği durumlarda (örneğin SS aşamasından alınan örneklerde), *Salmonella* spp.'nin varlığının kontrol edilmesi için aynı zamanda başlangıç süspansiyonu kültüre edildi (Şekil 3). Bu amaçla, başlangıç süspansiyonu 37˚C'de 18 ± 2 saat inkübe edilerek 3.2.2.3. ve 3.2.2.4. bölümlerinde tarif edilen prosedürler gerçekleştirildi. Sadece farklı olarak kuyucuklu plak yerine Novobiocin Supplement (OXOID, SR0181) ilave edilen Modifiye yarı katı Rappaport-Vassiliadis Agar (MSSRVA, OXOID, CM0669) içeren petri kabı hazırlandı ve inkübasyon sonrası BPW'deki başlangıç süspansiyonundan toplam hacmi 0,1 ml olacak şekilde alınan örnek, petri kabının ortasına inoküle edildi (ISO, 2012).



Şekil 3. *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesinde pozitif kültür (*S.enteritidis*) ve başlangıç süspansiyonundan (soğutma öncesi 1 no' lu örnek) alınan örneğin MSSRVA'daki üreme görüntüsü

3.2.2.3. Selektif yarı katı besi yerinde zenginleştirme (Enrichment)

Zenginleştirme için her bir kuyucuğunda 2'şer ml'lik MSSRVA konularak önceden hazırlanan plak, oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyondan alınan ön zenginleştirme plağı ise önce orbital shaker (BT Lab Sysytems, BT934) yardımıyla 1 dakika boyunca karıştırıldı. Ön zenginleştirme plağındaki (BPW) dilue örneklerin her birinden 20 µl alınarak 2 ml MSSRVA içeren kuyucukların kenarına ve yüzeyine ekim yapılarak 41,5˚C'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 4). İnkübasyon sonrasında, kuyucukların kenar kısmındaki inoküle edilen noktadan yayılan, merkezi beyaz ve gri-beyaz renkli, opak zon gösterenler şüpheli olarak kabul edildi (Şekil 5). Negatif sonuç veren plaklara 24 ± 3 saatlik ilave inkübasyon daha yapıldı.



Şekil 4. Selektif yarı katı besi yerinde zenginleştirme aşamasının uygulanması



Şekil 5. Zenginleştirme aşaması uygulanmış plağın inkübasyon sonrasındaki görüntüsü

3.2.2.4. Selektif katı besi yerine ekim

Şüpheli olarak belirlenen en yüksek dilüsyon kuyucuklarından başlayarak ileri dilüsyonlara doğru 3-2-1 şeklinde seçim yapılarak MSSRVA kuyucuklarındaki opak zonlu üremenin kenar kısmının hemen iç tarafından 1 µl'lik öze ile selektif katı besi yeri olan Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLDA, OXOID, CM0469) bulunan petri kabının yüzeyine ekim yapılıp 37˚C'de 24 ± 3 saat inkübe edildi. Aynı zamanda ikinci besi yeri olarak belirlenen *Salmonella* Selective Supplement (OXOID, SR0194)

eklenmiş olan Brilliance *Salmonella* Agar'a (BSA, OXOID, CM1092) da MSSRVA kuyucuklarında bulunan opak zonlu kolonilerden 1 µl'lik öze ile petri kabının yüzeyine ekim yapılıp, XLDA'ya yapılan ekim ile eş zamanlı olarak 37˚C'de 24 ± 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında iki selektif katı besi yerinde de üremenin olmadığı durumlarda, aynı sıcaklıkta 24 ± 3 saatlik ilave bir inkübasyon daha yapıldı. XLDA yüzeyinde oluşan siyah merkezli ve açık kırmızımsı şeffaf zonlu, balık gözü şeklindeki koloniler tipik/şüpheli olarak değerlendirildi. Aynı zamanda, BSA yüzeyinde oluşan mor, parlak, düzgün yuvarlak şekilli koloniler de tipik/şüpheli olarak değerlendirildi (ISO, 2012).

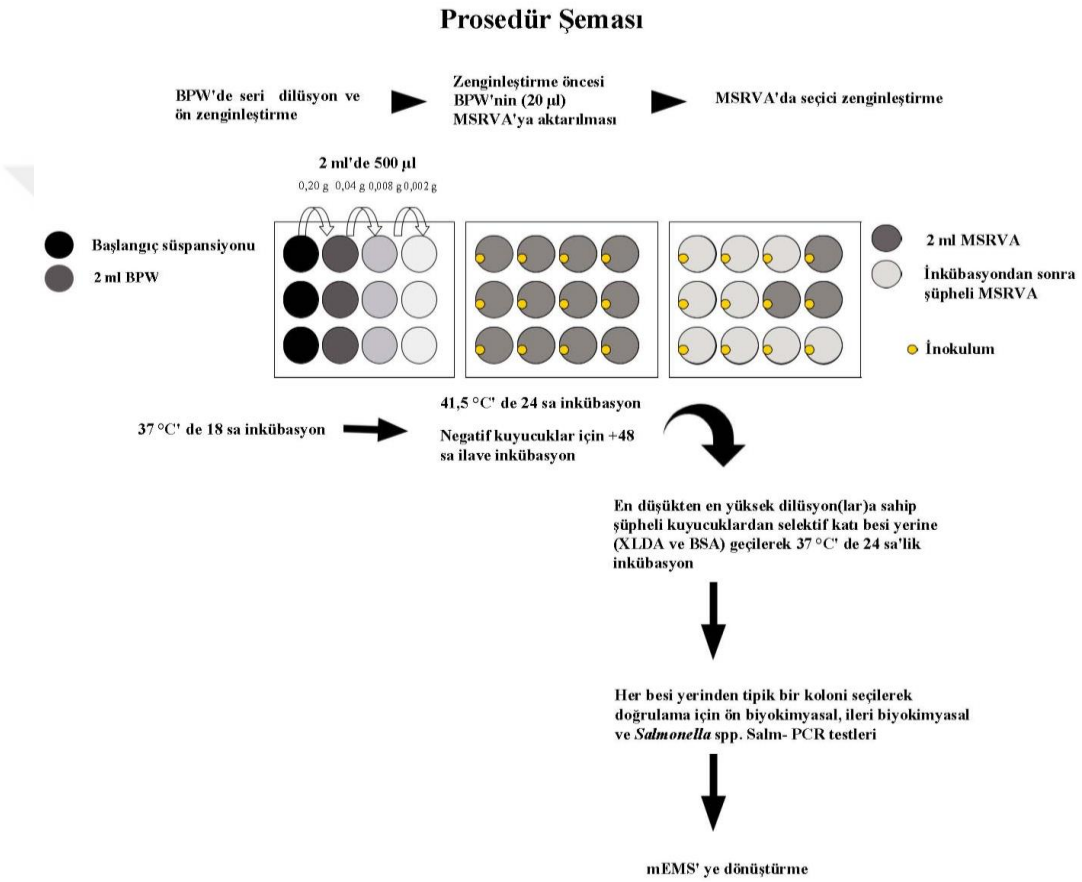
3.2.2.5. Doğrulama

Doğrulama için XLDA'da ve BSA'da üreyen *Salmonella* spp. şüpheli tipik kolonilerden en az 1 adet seçilerek önce MacConkey Agarda (MCA, OXOID, CM0115) birkaç kez pasaj edilerek saflaştırıldı. Bu işlemi takiben Nutrient Agar (NA, OXOID, CM0003)'a ekim yapılan plaklar 37˚C'de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası NA'da üreyen saf kültüre ön biyokimyasal testler (TSI, LI, üreaz ve oksidaz) yapıldı. Bu testlerde *Salmonella* pozitif sonuç veren izolatların son olarak API 20E (Biomerieux, 20100) ile biyokimyasal identifikasyonu gerçekleştirildi. Negatif sonuç alınması durumunda ise XLDA'da bulunan tipik kolonilerden 4 tanesine daha aynı işlemler gerçekleştirildi. Pozitif örneklere ait saf izolatlar, Brain Heart Infusion Broth (BHIB, OXOID, CM1135) ve %50 steril gliserol içeren stokta -80˚C derin dondurucuda saklandı. Tüm izolasyon ve identifikasyon aşamaları biyogüvenlik kabineti Tip II'de (Esco, AC2-4E1) yapıldı (ISO, 2012). Ayrıca Salm-PCR analizi için NA'da üreyen saf kültürden 1 öze dolusu alınarak eppendorf tüpü içerisinde 500 µl steril PCR-grade su ilavesi ve vorteks yardımı ile homojenize edilip -20˚C derin dondurucuda saklanmak üzere kaldırıldı.

3.2.2.6. Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayının (mEMS) hesaplanması

Her dilüsyon için pozitif ve doğrulanmış sonuç veren kuyucuk sayısı sayılıp, ISO 7218:2007/Amd.1:2013 'Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations' (ISO 7218:

2007/1. Tadil:2013 ‘Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi - Mikrobiyolojik İncelemeler için Genel Şartlar ve Rehber’) standardı ve Jarvis ve ark. (2010) tarafından geliştirilen MPN Calculation Program, Version 6 (2018-11-07) kullanılarak *Salmonella* spp. sayısı hesaplandı (ISO, 2013). ISO 6579-2:2012’ye göre *Salmonella*’nın mEMS yöntemi ile sayımını gösteren prosedür şeması Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. *Salmonella* sayısının mEMS yöntemi ile belirlenmesi (ISO, 2012).

3.2.3. *Salmonella* spp. Spesifik r-PCR (Salm-PCR) Analizi ile Doğrulama

3.2.3.1. *Salmonella* spp. Spesifik r-PCR (Salm-PCR) için templeyt hazırlama

Biyokimyasal identifikasyon sonucu *Salmonella* olduğu belirlenen izolatların Salm-PCR ile doğrulanması için DNA izolasyonunda, Foodproof StarPrep One Kit (Biotecon, S400 07) el kitabı 2.3.1'de belirtilen prosedür gereklilikleri uygulandı. Eppendorf tüpleri içerisinde -20°C derin dondurucuda saklanan izolatlar, oda ısısında çözündürülerek vortex yardımıyla (Stuart, SA8) homojenize edildikten sonra 8,000 × *g*'de 5 dakika santrifüje (Thermo Scientific, MicroCL 17) edildi. Santrifüj işleminin ardından supernatant pipetle uzaklaştırılarak Eppendorf tüpünün dip kısmında kalan pelet üzerine 200 µl lizis buffer eklenip homojenizasyon için vortekslendi. Kapakları iyice sıkıştırılan tüpler blok ısıtıcıda (Techne, DB-2D-FDB02DD) 97,5°C'de 10 dakikalık inkübasyonun ardından vortekslenip, 13,000 × *g*'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından izole edilen supernatant içerisinde kalan DNA'nın saflığı ile konsantrasyonu Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, ND-1000) ile ölçülerek miktarı 100 ng/µl, absorbans değeri 1,6 - 2,0 aralığında olan DNA izolatları r-PCR analizlerinde templeyt olarak kullanıldı.

3.2.3.2. *Salmonella* spp. Spesifik r-PCR (Salm-PCR)

LightCycler 2.0 cihazına uyumlu olması amacı ile, Foodproof *Salmonella* Detection Kit Hybridization Probes (Biotecon, R310 27) kiti el kitabı, 2.2. prosedür bölümündeki (A) LightCycler Carousel-Based System Protokolü PCR parametreleri olarak (1) ön inkübasyon (40ºC'de 2 dk ardından 95ºC'de 10 dk); (2) 45 siklus amplifikasyon (denaturasyon 95ºC'de 0 sn, bağlanma ve sonunda floresan sinyal okuma 59ºC'de 30 sn, uzama 72ºC'de 5 sn); (3) soğutma (40ºC'de 30 sn) LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, 05351414201) sisteminde programlandı. Yine, 2.2. prosedür gereklilikleri dahilinde, cihazda reaksiyon sırasında *Salmonella* ve internal amplifikasyon kontrol (IAC)'üne ait doğru floresan sinyalinin okunabilmesi için (B) Fluorescence and Run Setup Parametreleri de LightCycler® Software Version 4.x'e göre düzenlendi (PCR sırasındaki varsayılan floresan kanalı 640 veya 705 ve PCR analizi sırasında varsayılan floresan kanalı ise 640/Back 530 veya 705/Back 530).

Salm-PCR için karışım hazırlamada; her bir örnek için 13 µl *Salmonella* master mix, 1 µl *Salmonella* enzim solüsyonu ve 1 µl *Salmonella* IAC sıvısından alınarak toplam 15 µl hacmindeki *Salmonella* PCR karışımı hazırlandı ve LightCycler 2.0 cihazına uygun kapiller borosilikat tüplere konuldu. Her bir kapillere 5 µl örnek DNA'sı, negatif kontrol için 5 µl PCR-grade su, pozitif kontrol için ise 5 µl kit *Salmonella* kontrol templeyti eklendi ve kapakları kapatıldı. LightCycler karuzel santrifüjünde santrifüje edilen tüm kapillerler karuzel ile LightCycler cihazına yerleştirilerek reakisyon başlatıldı.

Sonuçların değerlendirilmesinde, kit el kitabı 2.3. analiz ve veri yorumlanması bölümü kullanıldı. *Salmonella* spp. hedef DNA'sı floresan sinyali FAM (640-530) kanalında, IAC floresan sinyali ise VIC/HEX (705-530) kanalında tespit edilerek okundu ve sonuçlar Tablo 7'ye göre yorumlandı.

Tablo 7. Sonuçların değerlendirilmesi

***Salmonella* spp.** **(640/Back 530 Kanalı)**	**Internal Kontrol (705/Back 530 Kanalı)**	**Değerlendirme**
Pozitif	Pozitif	Pozitif
Negatif	Pozitif	Negatif
Pozitif	Negatif	Pozitif
Negatif	Negatif	Geçersiz

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Soğutma öncesi ve sonrasında *Salmonella* spp. pozitif sonuç veren karkas örneklerinde *Salmonella* spp. sayıları ($\log_{10}$ mEMS), SPSS versiyon_24 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Verilerin normallik ve homojenlik değerleri, sırasıyla Kolmogorov-Smirnov ve Levene testleriyle ölçüldü. Normallik ve homojenliği sağladığı tespit edilen örnekler (SÖ ve SS) Independent-Samples T Test analizi ile karşılaştırıldı. Gruplar arası farkın $p<0,05$ olması durumunda istatistiki olarak önem taşıdığı belirlendi (Stehlik-Barry, K., & Babinec, A. J. (2017).

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Eylül-Ekim 2021 tarihleri arasında, Balıkesir'de faaliyet gösteren bir kanatlı kesimhanesi, ayda 2-3 kez olmak üzere toplam 5 defa ziyaret edilerek kesim aşamalarından soğutma tüneli girişi (SÖ) ve çıkışı (SS) olarak seçilen iki kritik noktadan alınan toplam 480 broyler karkasını temsilen alınan 96 birim örnekte *Salmonella* sayısı ISO 6579-2:2012 uygulanarak belirlenmiştir.

4.1. Örnekleme Sonuçları

Örneklere ait bilgiler Tablo 8'de, örnek tipi, adı ve sayısı ise Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 8. Örneklerin ait oldukları sürü/kümes ile yaş ve ağırlıkları

Örnekleme Tarihi	Parti No	Sürü Büyüklüğü	Sürüdeki Kümes Sayısı (hacmi)	Sürü Yaşı (gün)	Ortalama Canlı Ağırlık (g)	Örnek Sayısı
03.09.2021	1	41,650	2 (15,050; 16,500)	40	2395	10
13.09.2021	2	17,000	1 (17,000)	40	2300	20
22.09.2021	3	19,500	1 (19,500)	42	2725	6
11.10.2021	4	4,400	1 (4,400)	44	2825	30
20.10.2021	5	18,000	1 (18,000)	44	2900	30
			Toplam	42*	2629*	96

***:** Ortalama değeri ifade etmektedir.

Tablo 9. Örnek tipi, adı ve sayısı

Parti No	Örneklem Alım Aşaması (Önek Tipi)	Örnek Adı (Sayısı)
1	Soğutma Öncesi	SÖ (5)
	Soğutma Sonrası	SS (5)
	Ara Toplam	10
2	Soğutma Öncesi	SÖ (10)
	Soğutma Sonrası	SS (10)
	Ara Toplam	20
3	Soğutma Öncesi	SÖ (3)
	Soğutma Sonrası	SS (3)
	Ara Toplam	6
4	Soğutma Öncesi	SÖ (15)
	Soğutma Sonrası	SS (15)
	Ara Toplam	30
5	Soğutma Öncesi	SÖ (15)
	Soğutma Sonrası	SS (15)
	Ara Toplam	30
	Toplam	**96**

4.2. *Salmonella* spp. İzolasyon, İdentifikasyon ve Doğrulama Sonuçları

Beş parti halinde alınan 48 adet SÖ ve 48 SS olmak üzere toplam 96 örneğin 88'inin (%91,67) *Salmonella* spp. varlığı yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. Soğutma öncesi örneklerin %97,92'sinin (47/48) ve soğutma sonrası örneklerin ise %85,42'sinin (41/48) *Salmonella* taşıdığı tespit edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. *Salmonella* spp. pozitif örnek sayısı

Parti No	Örnek Tipi	Sayı	*Salmonella* spp. Pozitif Örnek Sayısı (%)
1	Soğutma Öncesi	5	4/5 (80,00)
	Soğutma Sonrası	5	4/5 (80,00)
	Ara Toplam	10	8/10 (80,00)
2	Soğutma Öncesi	10	10/10 (100,00)
	Soğutma Sonrası	10	8/10 (80,00)
	Ara Toplam	20	18/20 (90,00)
3	Soğutma Öncesi	3	3/3 (100,00)
	Soğutma Sonrası	3	1/3 (33,33)
	Ara Toplam	6	4/6 (66,67)
4	Soğutma Öncesi	15	15/15 (100,00)
	Soğutma Sonrası	15	13/15 (86,67)
	Ara Toplam	30	28/30 (93,33)
5	Soğutma Öncesi	15	15/15 (100,0)
	Soğutma Sonrası	15	15/15 (100,0)
	Ara Toplam	30	30/30 (100,0)
	Soğutma Öncesi Toplam	48	**47/48 (97,92)**
	Soğutma Sonrası Toplam	48	**41/48 (85,42)**
	Genel Toplam	**96**	**88/96 (91,67)**

4.2.1. Birinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Birinci partiye ait alınan 10 örneğin 8 adedinde (%80,00) *Salmonella* spp. bulunduğu saptanmıştır (Tablo 10). Soğutma öncesi alınan SÖ-1 örneği ve soğutma sonrası alınan SS-1 örneğinde, izolasyon aşamasında katı besi yerinde selektif zenginleştirme sonrası üreme gözlenmemiştir. Buna bağlı olarak herhangi bir koloniye ait saflaştırma ve sonrasında doğrulama için gerekli diğer testler (ön biyokimyasal, ileri biyokimyasal ve Salm-PCR) gerçekleştirilmemiştir (Tablo 11).

4.2.2. İkinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

İkinci partiye ait alınan 20 örneğin 18 adedinde (%90,00) *Salmonella* spp. pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 10). Soğutma sonrası alınan SS-10 örneğinde, izolasyon aşamasında katı besi yerinde selektif zenginleştirme sonrası üreme gözlenmemiş olup, saflaştırma, ön biyokimyasal, ileri biyokimyasal testler ve Salm-PCR analizi yapılmamıştır. SS-14 örneğinde ise ön biyokimyasal testlerden üreaz ve oksidaz pozitif, API 20E ve Salm-PCR analizi ise negatif sonuç vermiştir (Tablo 12).

4.2.3. Üçüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Üçüncü partiye ait alınan 6 örneğin 4 adedinde (%66,67) *Salmonella* spp. bulunduğu saptanmıştır (Tablo 10). *Salmonella* spp. yönünden negatif olan 2 adet örneğin (SS-17 ve SS-18), katı besi yerinde selektif zenginleştirme sonrası üreme gözlenmediği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak herhangi bir koloniye ait saflaştırma ve sonrasında doğrulama için gerekli diğer testler (ön biyokimyasal, ileri biyokimyasal ve Salm-PCR) gerçekleştirilmemiştir (Tablo 13).

4.2.4. Dördüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Bu partide alınan 30 örneğin 28 adedinde (%93,33) *Salmonella* spp. pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 10). *Salmonella* spp. negatif olarak belirlenen SS-27 örneğinde, lizin dekarboksilaz negatif, üreaz ve oksidaz pozitif, API 20E ve Salm-PCR ise negatif sonuç vermiştir. SS-28 örneğinde ise üreaz ve oksidaz testi pozitif, API 20E testi ve Salm-PCR analizi ise *Salmonella* yönünden negatif sonuçlanmıştır (Tablo 14).

4.2.5. Beşinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Beşinci partiye ait 30 örneğin tümünde (%100,00) *Salmonella* spp. varlığı saptanmıştır (Tablo 10).

Tablo 11. Birinci Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Örnek Sayısı	Örnek Adı	Non-selektif Zenginleştirme	Selektif Zenginleştirme			Saflaştırma	Doğrulama					
		Ön zenginleştirme	Yarı katı besiyeri	Katı besiyeri			Ön biyokimyasal testler				İleri biyokimyasal testler	*Salmonella* spp-spesifik r-PCR
		BPW	MSSRVA	XLDA	BSA	MCA-NA	TSI	LI	ÜRE	OXD	API 20 E (*Salmonella* spp.)	
1	SÖ-1	+	+	-	-	Y*	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	SÖ-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3	SÖ-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4	SÖ-4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5	SÖ-5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
6	SS-1	+	+	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7	SS-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
8	SS-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
9	SS-4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
10	SS-5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
										Toplam (%)	**8/10 (80,00)**	**8/10 (80,00)**

* Y: Yapılmadı

Tablo 12. İkinci Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Örnek Sayısı	Örnek Adı	Non-selektif Zenginleştirme	Selektif Zenginleştirme			Saflaştırma	Doğrulama					
		Ön zenginleştirme	Yarı katı besiyeri	Katı besiyeri			Ön biyokimyasal testler				İleri biyokimyasal testler	*Salmonella* spp-spesifik r-PCR
		BPW	MSSRVA	XLDA	BSA	MCA-NA	TSI	LI	ÜRE	OXD	API 20 E (*Salmonella* spp.)	
1	SÖ-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
2	SÖ-7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3	SÖ-8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4	SÖ-9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5	SÖ-10	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
6	SÖ-11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
7	SÖ-12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
8	SÖ-13	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
9	SÖ-14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
10	SÖ-15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
11	SS-6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
12	SS-7	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
13	SS-8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
14	SS-9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
15	SS-10	+	+	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
16	SS-11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
17	SS-12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
18	SS-13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
19	SS-14	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
20	SS-15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
										Toplam (%)	**18/20 (90,00)**	**18/20 (90,00)**

* Y: Yapılmadı

Tablo 13. Üçüncü Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Örnek Sayısı	Örnek Adı	Non-selektif Zenginleştirme	Selektif Zenginleştirme			Saflaştırma	Doğrulama					
		Ön zenginleştirme	Yarı katı besiyeri	Katı besiyeri			Ön biyokimyasal testler				İleri biyokimyasal testler	*Salmonella* spp-spesifik r-PCR
		BPW	MSSRVA	XLDA	BSA	MCA-NA	TSI	LI	ÜRE	OXD	API 20 E (*Salmonella* spp.)	
1	SÖ-16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
2	SÖ17	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
3	SÖ-18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4	SS-16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5	SS-17	+	+	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6	SS-18	+	+	-	-	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
										Toplam (%)	**4/6 (66,67)**	**4/6 (66,67)**

* Y: Yapılmadı

Tablo 14. Dördüncü Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Örnek Sayısı	Örnek Adı	Non-selektif Zenginleştirme	Selektif Zenginleştirme			Doğrulama					
		Ön zenginleştirme	Yarı katı besiyeri	Katı besiyeri		Saflaştırma	Ön biyokimyasal testler				İleri biyokimyasal testler	*Salmonella* spp-spesifik r-PCR
		BPW	MSSRVA	XLDA	BSA	MCA-NA	TSI	LI	ÜRE	OXD	API 20 E (*Salmonella* spp.)	
1	SÖ-19	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
2	SÖ-20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3	SÖ-21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4	SÖ-22	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
5	SÖ-23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
6	SÖ-24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
7	SÖ-25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
8	SÖ-26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
9	SÖ-27	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
10	SÖ-28	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
11	SÖ-29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
12	SÖ-30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
13	SÖ-31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
14	SÖ-32	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
15	SÖ-33	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
16	SS-19	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
17	SS-20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
18	SS-21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
19	SS-22	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
20	SS-23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
21	SS-24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
22	SS-25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

23	SS-26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
24	SS-27	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
25	SS-28	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
26	SS-29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
27	SS-30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
28	SS-31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
29	SS-32	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
30	SS-33	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
										Toplam (%)	**28/30 (93,33)**	**28/30 (93,33)**

Tablo 15. Beşinci Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. varlığı

Örnek Sayısı	Örnek Adı	Non-selektif Zenginleştirme	Selektif Zenginleştirme			Saflaştırma	Doğrulama					
		Ön zenginleştirme	Yarı katı besiyeri	Katı besiyeri			Ön biyokimyasal testler				İleri biyokimyasal testler	*Salmonella* spp-spesifik r-PCR
		BPW	MSSRVA	XLDA	BSA	MCA-NA	TSI	LI	ÜRE	OXD	API 20 E (*Salmonella* spp.)	
1	SÖ-34	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
2	SÖ-35	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
3	SÖ-36	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4	SÖ-37	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
5	SÖ-38	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
6	SÖ-39	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
7	SÖ-40	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
8	SÖ-41	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
9	SÖ-42	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
10	SÖ-43	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
11	SÖ-44	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
12	SÖ-45	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
13	SÖ-46	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
14	SÖ-47	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
15	SÖ-48	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
16	SS-34	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
17	SS-35	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

18	SS-36	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
19	SS-37	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
20	SS-38	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
21	SS-39	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
22	SS-40	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
23	SS-41	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
24	SS-42	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
25	SS-43	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
26	SS-44	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
27	SS-45	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
28	SS-46	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
29	SS-47	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
30	SS-48	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
										Toplam (%)	**30/30 (100,0)**	**30/30 (100,0)**

4.3. Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı (mEMS) Tekniği ile *Salmonella* spp. Sayım Sonuçları

Salmonella spp. sayısı toplam 48 adet SÖ örneğinin 42'sinde ortalama 1,84 $\log_{10}$ mEMS ve 48 adet SS örneğinin 37'sinde ise ortalama 1,48 $\log_{10}$ mEMS olarak belirlenmiş olup bakteri sayısındaki azalma (0,36 $\log_{10}$ mEMS) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Beş parti halinde alınan SÖ örneklerinde ortalama *Salmonella* spp. sayısı sırasıyla 2,03 $\log_{10}$ mEMS, 2,52 $\log_{10}$ mEMS, 1,33 $\log_{10}$ mEMS, 1,45 $\log_{10}$ mEMS ve 1,72 $\log_{10}$ mEMS olarak tespit edilmiştir. Ortalama *Salmonella* spp. sayısı SS örneklerinde ise sırasıyla 1,10 $\log_{10}$ mEMS, 2,13 $\log_{10}$ mEMS, 1,20 $\log_{10}$ mEMS, 1,06 $\log_{10}$ mEMS ve 1,53 $\log_{10}$ mEMS değerlerinde saptanmıştır (Tablo 16).

Tablo 16. Pozitif örneklerde mEMS yöntemi ile belirlenen *Salmonella* spp. sayısı

			***Salmonella* spp. Sayısı**				
		Örnek Tipi	**Soğutma Öncesi (SÖ)**		**Soğutma Sonrası (SS)**		
Parti No	**Örnek Sayısı**	**İstatistiksel Analiz Edilen Örnek Sayısı ve Adı**	**Ortalama (log_{10} mEMS)**	**Standart Sapma**	**Ortalama (log_{10} mEMS)**	**Standart Sapma**	**P değeri**
1	10	4/5 SÖ 4/5 SS	2,03	0,40	1,10	0,45	**0,02***
2	20	10/10 SÖ 8/10 SS	2,52	0,42	2,13	0,17	**0,03***
3	6	3/3 SÖ 1/3 SS	1,33	0,12	1,20	-	0,42
4	30	12/15 SÖ 10/15 SS	1,45	0,65	1,06	0,61	0,16
5	30	13/15 SÖ 14/15 SS	1,72	0,63	1,53	0,63	0,43
Toplam	**96**	42/48 SÖ 37/48 SS	1,84	0,68	1,48	0,65	**0,02***

*: $p<0,05$ düzeyinde önemlidir.

4.3.1. Birinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı

Birinci partiye ait alınan 10 örneğin 8 adedinde *Salmonella* spp. sayısı SÖ örneklerinde 1,6 $\log_{10}$ mEMS-2,5 $\log_{10}$ mEMS, SS örneklerinde ise 0,5 $\log_{10}$ mEMS-1,6 $\log_{10}$ mEMS aralığında saptanmıştır (Tablo 17). İstatistiksel analizler sonrasında, örnek tiplerindeki (SÖ ve SS) ortalama *Salmonella* sayısındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

4.3.2. İkinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı

Bu partideki 20 örneğin 18'inde *Salmonella* spp. sayısı SÖ örneklerinde 1,9 $\log_{10}$ mEMS-3,2 $\log_{10}$ mEMS, SS örneklerinde ise 1,9 $\log_{10}$ mEMS-2,4 $\log_{10}$ mEMS aralığında tespit edilmiştir (Tablo 18). Soğutma öncesi ve sonrasındaki ortalama *Salmonella* sayıları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

4.3.3. Üçüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı

Üçüncü partiye ait alınan 6 örneğin 4 adedinde *Salmonella* spp. sayısı SÖ örneklerinde 1,2 $\log_{10}$ mEMS-1,4 $\log_{10}$ mEMS aralığında, SS örneklerinde ise en düşük 1,2 $\log_{10}$ mEMS olarak bulunmuştur (Tablo 19). Yapılan istatistiksel analizlerde, ortalama *Salmonella* sayıları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

4.3.4. Dördüncü Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı

Bu partide alınan 30 örneğin 22'sinde *Salmonella* spp. sayısı SÖ örneklerinde 0,5 $\log_{10}$ mEMS-2,5 $\log_{10}$ mEMS, SS örneklerinde 0,5 $\log_{10}$ mEMS-2,0 $\log_{10}$ mEMS aralığında saptanmıştır (Tablo 20). Yapılan istatistiksel analizlerde, ortalama *Salmonella* sayıları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

4.3.5. Beşinci Parti'ye ait örneklerde *Salmonella* spp. sayısı

Beşinci partiye ait 30 örneğin 27'sinde *Salmonella* spp. sayısı SÖ örneklerinde 0,5 $\log_{10}$ mEMS-2,5 $\log_{10}$ mEMS, SS örneklerinde ise 0,5 $\log_{10}$ mEMS-2,5 $\log_{10}$ mEMS aralığında tespit edilmiştir (Tablo 21). Örnek tiplerindeki (SÖ ve SS) ortalama *Salmonella* sayısındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 17. Birinci Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. sayısı - mEMS değerleri ve %95 güven sınırları

Örnek sayısı	Örnek adı	Pozitif kuyucuk sayısı	mEMS/g	log_{10} mEMS	SD log_{10} mEMS	%95 Güven Sınırı		r*	Cat**
						Alt Sınır	Üst Sınır		
1	SÖ-1	0-0-0	0	-	-	0	9,9	1,000	1
6	SS-1	0-0-0	0	-	-	0	9,9	1,000	1
2	SÖ-2	3-3-2	280	2,5	0,30	72	1100	1,000	1
7	SS-2	2-1-1	17	1,2	0,23	6,0	50	0,139	1
3	SÖ-3	3-2-1	66	1,8	0,26	20	210	0,912	1
8	SS-3	3-2-0	44	1,6	0,27	13	150	1,000	1
4	SÖ-4	3-2-0	44	1,6	0,27	13	150	1,000	1
9	SS-4	1-0-0	3,1	0,5	0,44	0,42	23	1,000	1
5	SÖ-5	3-3-1	150	2,2	0,28	42	540	1,000	1
10	SS-5	2-1-0	12	1,1	0,26	3,7	41	0,847	1

*Seyreklik İndeksi: Pozitif olma olasılığını gösteren bu değer 1,000'e yaklaştıkça, olasılığı o derece yükselir.
**Kategori: Elde edilen mEMS değerinin kabul edilebilirlik kategorisini göstermektedir (Cat 1 = 0,05 <r< 1,00: büyük ihtimalle; Cat 2 = 0,01 <r< 0,05: nadiren; Cat 3 = 0<r<0,01: çok nadir.

Tablo 18. İkinci Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. sayısı - mEMS değerleri ve %95 güven sınırları

Örnek sayısı	Örnek adı	Pozitif kuyucuk sayısı	mEMS/g	log_{10} mEMS	SD log_{10} mEMS	%95 Güven Sınırı		r*	Cat**
						Alt Sınır	Üst Sınır		
1	SÖ-6	3-3-0	900	3,0	0,28	240	3300	0,772	1
11	SS-6	2-1-0	120	2,1	0,26	37	410	0,847	1
2	SÖ-7	3-0-0	160	2,2	0,28	45	600	0,857	1
12	SS-7	2-0-0	77	1,9	0,31	18	330	1,000	1
3	SÖ-8	3-3-1	1500	3,2	0,28	420	5400	1,000	1
13	SS-8	3-1-0	260	2,4	0,26	78	890	1,000	1
4	SÖ-9	3-1-0	260	2,4	0,26	78	890	1,000	1
14	SS-9	3-0-0	160	2,2	0,28	45	600	0,857	1
5	SÖ-10	2-0-0	77	1,9	0,31	18	330	1,000	1
15	SS-10	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
6	SÖ-11	3-1-0	260	2,4	0,26	78	890	1,000	1
16	SS-11	3-0-0	160	2,2	0,28	45	600	0,857	1
7	SÖ-12	3-3-0	900	3,0	0,28	240	3300	0,772	1
17	SS-12	2-1-0	120	2,1	0,26	37	410	0,847	1
8	SÖ-13	3-2-0	440	2,6	0,27	130	1500	1,000	-
18	SS-13	2-0-0	77	1,9	0,31	18	330	1,000	1
9	SÖ-14	2-1-0	120	2,1	0,26	37	410	0,847	1
19	SS-14	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
10	SÖ-15	3-1-0	260	2,4	0,26	78	890	1,000	1

20	SS-15	3-0-0	160	2,2	0,28	45	600	0,857	1

*Seyreklik İndeksi: Pozitif olma olasılığını gösteren bu değer 1,000'e yaklaştıkça, olasılığı o derecede yükselir.
**Kategori: Elde edilen mEMS değerinin kabul edilebilirlik kategorisini göstermektedir (Cat 1 = 0.05 < r <1,00: büyük ihtimalle; Cat 2 = 0,01 < r <0,05: nadiren; Cat 3 = 0 < r < 0,01: çok nadir.

Tablo 19. Üçüncü Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. sayısı - mEMS değerleri ve %95 güven sınırları

Örnek sayısı	Örnek adı	Pozitif kuyucuk sayısı	mEMS/g	$\log_{10}$ mEMS	SD $\log_{10}$ mEMS	%95 Güven Sınırı		r*	Cat**
						Alt Sınır	Üst Sınır		
1	SÖ-16	3-1-0	26	1,4	0,26	7,5	79	0,163	1
4	SS-16	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
2	SÖ17	3-0-1	24	1,4	0,26	7,5	79	0,163	1
5	SS-17	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
3	SÖ-18	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
6	SS-18	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1

*Seyreklik İndeksi: Pozitif olma olasılığını gösteren bu değer 1,000'e yaklaştıkça, olasılığı o derecede yükselir.
**Kategori: Elde edilen mEMS değerinin kabul edilebilirlik kategorisini göstermektedir (Cat 1 = 0,05 < r <1.00: büyük ihtimalle; Cat 2 = 0,01 < r <0,05: nadiren; Cat 3 = 0 < r < 0,01: çok nadir.

Tablo 20. Dördüncü Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. sayısı - mEMS değerleri ve %95 güven sınırları

Örnek sayısı	Örnek adı	Pozitif kuyucuk sayısı	mEMS/g	log_{10} mEMS	SD log_{10} mEMS	%95 Güven Sınırı		r*	Cat**
						Alt Sınır	Üst Sınır		
1	SÖ-19	2-0-0	7,7	0,89	0,31	1,8	33	1,000	1
16	SS-19	1-0-0	3,1	0,5	0,44	0,42	23	1,000	1
2	SÖ-20	3-3-1	150	2,2	0,28	42	540	1,000	1
17	SS-20	2-0-0	7,7	0,89	0,31	1,8	33	1,000	1
3	SÖ-21	3-3-3	INF***	-	-	0	99	1,000	1
18	SS-21	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1
4	SÖ-22	1-1-1	10	1,0	0,25	3,1	32	0,047	2
19	SS-22	1-0-0	3,1	0,50	0,44	0,42	23	1,000	1
5	SÖ-23	3-2-0	44	1,6	0,27	13	150	1,000	1
20	SS-23	2-0-0	7,7	0,89	0,31	1,8	33	1,000	1
6	SÖ-24	3-1-0	26	1,4	0,26	7,8	89	1,000	1
21	SS-24	1-0-0	3,1	0,50	0,44	0,42	23	1,000	1
7	SÖ-25	3-3-3	INF	-	-	0	99	1,000	1
22	SS-25	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
8	SÖ-26	3-2-2	96	2,0	0,23	33	280	0,241	1
23	SS-26	3-2-0	44	1,6	0,27	13	150	1,000	1
9	SÖ-27	3-1-0	26	1,4	0,26	7,8	89	1,000	1
24	SS-27	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
10	SÖ-28	3-3-2	280	2,5	0,30	72	1100	1,000	1
25	SS-28	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
11	SÖ-29	3-1-0	26	1,4	0,26	7,8	89	1,000	1
26	SS-29	1-0-0	3,1	0,50	0,44	0,42	23	1,000	1
12	SÖ-30	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1
27	SS-30	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1
13	SÖ-31	1-0-0	3,1	0,5	0,44	0,42	23	1,000	1

28	SS-31	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
14	SÖ-32	1-0-0	3,1	0,5	0,44	0,42	23	1,000	1
29	SS-32	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
15	SÖ-33	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
30	SS-33	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1

Seyreklik İndeksi: Pozitif olma olasılığını gösteren bu değer 1,000'e yaklaştıkça, olasılığı o derecede yükselir.
**Kategori: Elde edilen mEMS değerinin kabul edilebilirlik kategorisini göstermektedir (Cat 1 = 0,05 < r <1.00: büyük ihtimalle; Cat 2 = 0,01 < r<0,05: nadiren; Cat 3 = 0 < r < 0,01: çok nadir.
***Infinitiy: Çalışmada kullanılan MPN_ver6 programına ve Jarvis'e (2010) göre tüm sonuçlar + ise; (3-3-3), MPN INF'tir ve bunun %95 güvenilir sınırının alt limiti 100, üst limiti INF olarak bildirilmektedir.

Tablo 21. Beşinci Parti'ye ait soğutma öncesi ve sonrası alınan örneklerde *Salmonella* spp. sayısı - mEMS değerleri ve %95 güven sınırları

Örnek sayısı	Örnek adı	Pozitif kuyucuk sayısı	mEMS/g	log_{10} mEMS	SD log_{10} mEMS	%95 Güven Sınırı		r*	Cat**
						Alt Sınır	Üst Sınır		
1	SÖ-34	2-2-0	18	1,3	0,23	6,2	52	0,258	1
16	SS-34	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
2	SÖ-35	3-3-1	150	2,2	0,28	42	540	1,000	1
17	SS-35	0-0-0	0	-	-	0	99	1,000	1
3	SÖ-36	3-2-2	66	1,8	0,26	20	210	0,912	1
18	SS-36	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
4	SÖ-37	3-3-1	150	2,2	0,28	42	540	1,000	1
19	SS-37	3-1-0	26	1,4	0,26	7,8	89	1,000	1
5	SÖ-38	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
20	SS-38	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1
6	SÖ-39	3-3-3	INF	-	-	0	99	1,000	1
21	SS-39	3-3-2	280	2,5	0,30	72	1100	1,000	1
7	SÖ-40	3-3-3	INF	-	-	0	99	1,000	1
22	SS-40	3-3-2	280	2,5	0,30	72	1100	1,000	1
8	SÖ-41	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1
23	SS-41	3-2-0	44	1,6	0,27	13	150	1,000	1
9	SÖ-42	2-1-1	17	1,2	0,28	24	330	0,772	1
24	SS-42	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1
10	SÖ-43	1-0-0	3,1	0,50	0,44	0,42	23	1,000	1
25	SS-43	3-0-0	16	1,2	0,28	24	330	0,772	1

11	SÖ-44	1-1-1	10	1,0	0,25	3,1	32	0,047	2
26	SS-44	1-0-0	3,1	0,5	0,44	0,42	23	1,000	1
12	SÖ-45	3-3-2	280	2,5	0,30	72	1100	1,000	1
27	SS-45	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1
13	SÖ-46	3-3-1	150	2,2	0,28	42	540	1,000	1
28	SS-46	3-2-0	44	1,6	0,27	13	150	1,000	1
14	SÖ-47	3-2-2	66	1,8	0,26	20	210	0,912	1
29	SS-47	1-0-0	3,1	0,5	0,44	0,42	23	1,000	1
15	SÖ-48	3-3-2	280	2,5	0,30	72	1100	1,000	1
30	SS-48	3-3-0	90	2,0	0,23	33	280	0,241	1

*Seyreklik İndeksi: Pozitif olma olasılığını gösteren bu değer 1,000'e yaklaştıkça, olasılığı o derecede yükselir.

**Kategori: Elde edilen mEMS değerinin kabul edilebilirlik kategorisini göstermektedir (Cat 1 = 0,05 < r <1.00: büyük ihtimalle; Cat 2 = 0,01 < r<0,05: nadiren; Cat 3 = 0 < r < 0,01: çok nadir.

***Infinitiy: Çalışmada kullanılan MPN_ver6 programına ve Jarvis'e (2010) göre tüm sonuçlar + ise; (3-3-3), MPN INF'tir ve bunun %95 güvenilir sınırının alt limiti 100, üst limiti INF olarak bildirilmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda, *Salmonlla* spp. sayısının belirlendiği uluslararası düzeyde yayımlanmış literatürün incelenmesi sonucunda, çalışmaların çoğunda yapay kontamine edilen farklı örneklerin kullanıldığı ve bu örneklere uygulanan teknolojik işlemlerin ve/veya ilave edilen maddelerin patojenin canlılığı ve konsantrasyonu üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı görülmektedir. Bu çalışmalardan piliç derisinde bakteriyofajların (Atterbury ve ark., 2020), broyler sekal içeriğinde postbiyotiklerin (Chaney ve ark., 2022) ve fajların (Navarro ve ark., 2020); domuz salam üretim aşamalarının (Bonardi ve ark., 2017), domuz dışkılarında farklı diyetlerin (Chuppawa ve ark., 2020; Hankel ve ark., 2022); meyve sebzelerde koruyucuların (Aday ve ark., 2021; Pardali ve ark., 2017), balık filetolarında yenilebilir kaplama materyallerinin (Alsaggaf ve ark., 2017) ve çiğ sütlerde geliştirilen hızlı tanı metodunun (Gökduman ve ark., 2016) *Salmonella* seviyesinde oluşturduğu değişimler rapor edilmiştir.

Doğal kontamine örneklerde *Salmonella* spp. sayısının/yükünün/ konsantrasyonunun/seviyesinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde ise farklı örnek tiplerinin ve farklı sayım metotlarının kullanıldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sayısal bulguların tartışılmasında, aynı örnek tipi (broyler karkası/kesim aşamalarında) ve aynı sayım yönteminin (ISO 6579-2:2012 ile mEMS) kullanıldığı çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle aynı örnek tipi ile farklı sayım yöntemleri kullanılan yayınların tartışılmasına da yer verilmiştir.

Bununla birlikte, bu çalışmalarda patojenin örneklerdeki konsantrasyonunun belirlenmesi yanı sıra prevalans oranları da tespit edildiği için, bu bölümde benzer şekilde sırasıyla prevalans ve sayı ile ilgili bulgularımız literatür bulguları ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

5.1. Karkas Örneklerinde *Salmonella* spp. Varlığı

Çalışmamızda, SÖ karkas örneklerinde %97,92 (47/48), SS karkas örneklerinde ise %85,42 (41/48) *Salmonella* spp. bulunmuştur (Tablo 10).

Berghaus ve ark. (2013)'nın ABD'nde daldırarak soğutma yöntemi kullanan bir kanatlı kesimhanesinde, 55 broyler sürüsüne ait 330 örneğin 4 farklı kesim

aşamasından alınan örnekler (canlı karkas, asılmadan önce, soğutma öncesi ve soğutma sonrası) ile çiftlik çevresel örneklerini konvansiyonel bakteriyoloji ile test ettikleri çalışmada, USDA-FSIS yöntemi ile karkas yıkama suyunun soğutma öncesi %18,2 (60/330) ve soğutma sonrası ise %2,4 (8/330) oranında *Salmonella* taşıdığı rapor edilmiştir.

Aynı yıl yapılan bir diğer çalışmada, Trimble ve ark. (2013)'nın immersiyon soğutma sistemi kullanan 3 farklı küçük işletmeden elde ettikleri soğutma sonrası broyler karkas örneği, bütün karkas yıkama yöntemi (USDA) ile alınarak USDA-FSIS 3 tüp MPN metodu ile *Salmonella* varlığı ve sayısı yönünden analiz edilmiş ve toplam 270 örneğin 132'sinde (%49 oranında) *Salmonella* var olduğu tespit edilmiştir.

Aynı ülkede Cox ve ark. (2014) tarafından daldırılarak soğutma kullanan iki işletmeden (1) bütün karkas yıkama, (2) boyun derisi, (3) bütün karkas zenginleştirme olmak üzere üç farklı örnekleme yöntemi kullanılarak alınan karkaslarda *Salmonella* varlığının araştırıldığı çalışmada, soğutma öncesi örneklerinde sırasıyla (1) 24/40, %60, (2) 21/40, %52, (3) 32/40, %80; soğutma sonrası örneklerde ise sırasıyla (1) 2/40, %5, (2) 2/40, %5, (3) 19/40, %48 prevalans oranları ile *Salmonella* spp. bulunmuştur. Bu çalışmada, örnek alma metodu yönünden benzer olması nedeniyle boyun derisi örneklerine ait *Salmonella* pozitif sonuçlar değerlendirildiğinde, SÖ ve SS'na ait oranların çalışmamızda bulduğumuz orana göre oldukça düşük düzeyde olması yönünden bulgularımız Cox ve ark. (2014) ile uyum göstermemektedir.

2022 yılında immersiyon soğutma uygulayan üç farklı ticari broyler kesimhanesinde *Salmonella* yükünün kesimin tüy yolumu sonrası, iç-dış yıkama sonrası (soğutma öncesi) ve soğutma sonrası aşamalarındaki prevalansının belirlenmesine yönelik planlanan çalışmada, Rasamsetti ve ark. (2022), her biri 500 piliç karkasını temsil eden karkas damlama suyu örneklerinde, 1, 2. ve 3. işletmelerde soğutma öncesi ile soğutma sonrası *Salmonella* bulunma oranları % 66,7, % 8,3 ve %100 ile %8,3, %0,0 ve %16,67 olarak rapor edilmiştir.

Aynı yıl Thames ve ark. (2022) tarafından, soğutma suyuna 767, 705, 412 ppm farklı konsantrasyonlarda perasetik asit ilavesini, kabinet içerisinde spreyleme tarzında katarak soğutma (air spray chilling) yapan üç farklı kanatlı kesimhanesinden, üç kez ve her ziyarette beş farklı aşamadan 10'ar karkas örneklenmiş; farklı konsantrasyonlardaki perasetik asitin farklı kesim aşamalarından alınan broyler

karkaslarındaki *Salmonella* prevalansı üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada, ön soğutma ve soğutma sonrası alınan örneklerdeki *Salmonella* prevalansı, ilave edilen asit konsantrasyonlarına spesifik olarak belirtilmemiş olmakla birlikte, USDA karkas yıkama suyu örnekleme metodu kullanılarak işlenen ve USDA-FSIS ile *Salmonella* varlığı tespit edilen karkaslarda soğutma öncesi örneklerde %34 olan prevalansın, soğutma sonrasında tespit edilebilir değerin altına düştüğü ve bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). Perasetik asitin kullanılan üç konsantrasyonunun da *Salmonella* prevalansında azalma üzerine etkili olabildiği, ancak duyusal karakteristiklerinin korunması amacı ile en düşük olan konsantrasyonun kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bulgularımıza benzer şekilde, etkenin biyokimyasal doğrulanmasına paralel olarak moleküler tekniklerden biri olan PCR ile de tür belirlemenin önemli ve gerekli olduğu vurgulanmıştır.

Brezilya'da Yamatogi ve ark. tarafından 2016 yılında daldırılarak soğutma sistemi kullanan kanatlı kesimhanesinde, 33'er adet kan akıtma, tüy yolumu ile soğutma sonrası alınan karkasların yıkama suyu örneklerinde *Salmonella* varlığı ve sayısı incelenmiştir. Çalışmada konvansiyonel USDA 3 tüp MPN metodu ile soğutma sonrası örneklerde, %58 (19/33) oranında *Salmonella* varlığı tespit edilmiştir.

Aynı ülkede, immersiyon yöntemi ile soğutma sistemi olan bir kesimhanede gerçekleştirdikleri çalışmada Machado ve ark. (2020), eksizyon yöntemi (25 g derili et) ile aldıkları ve PCR analizi ile inceledikleri soğutma öncesi karkas örneklerinin %26,4 (132/500) ve soğutma sonrası karkas örneklerinin ise %16,2 (81/500) oranında bu patojeni içerdiğini belirlemiştir.

Kanada'da ulusal düzeyde yapılan saha tarama çalışmasında, farklı soğutma sistem ve yardımcıları kullanan 38 kesimhaneden alınan toplam 1314 adet broyler karkas yıkama suyu örneği (USDA) *Salmonella* varlığı yönünden BAX-PCR ile test edilmiş ve 193 örneğin (%14,68) pozitif olduğu rapor edilmiştir (Hardie ve ark., 2019).

2021 yılında aynı ülkede, farklı soğutma sistemlerine sahip iki adet ticari kanatlı kesimhanesinde, kanatma sonrası, iç organ çıkarma öncesi, soğutma öncesi, su soğutma sonrası, hava soğutma sonrası alınan broyler karkas örnekleri, Kanada-FSIS yöntemi ile *Salmonella* varlığı açısından incelenmiştir. Birinci kesimhanede, her bir aşamadan 40 olmak üzere toplam 200 karkas örneği test edilmiştir. İncelenen 40 karkasın soğutma öncesinde 15'i *Salmonella* yönünden pozitif (%37,5) iken, bu oranın

su soğutma ile yapılan ön soğutma sonrasında %45'e yükseldiği (18/40), hava soğutma uygulamasından sonra ise %2,5 (1/40)'e düştüğü tespit edilmiştir. İkinci işletmede ise son aşama hariç tüm aşamalardan 39 ve son aşamadan 23 olmak üzere incelenen toplam 179 adet karkasın soğutma öncesi *Salmonella* pozitiflik oranı %38,5 (15/39) iken bu oran, su soğutma sonrasında %5'e (2/39) düşmüş, son olarak hava soğutma uygulaması ile etkenin %0 (0/23) ile karkaslardan tümüyle elimine edildiği saptanmıştır. Patojen sayısındaki azalmanın, kullanılan hava soğutma sisteminde cetylpyridinium chloride ilavesi ile havanın iki saat boyunca karkas ile temas etmesinin oldukça etkin bir rol oynadığı belirtilmiş olup istatistiksel olarak da önemli olduğu vurgulanmıştır ($p<0,01$) (Boubendir ve ark. 2021).

Yapılan çalışmalarda elde edilen *Salmonella* spp. prevalans değerinin soğutma öncesi karkaslarda %8,3-%100, soğutma sonrası karkaslarda ise %0-%58 aralığında olduğu belirlenmiştir. Soğutma öncesi örneklerdeki prevalans bulgumuz, Rasamsetti ve ark. (2022)'nın bulgusuna benzerlik göstermekte olup Berghaus ve ark. (2013), Machado ve ark. (2020) ile Thames ve ark. (2022)'nın bulgularından daha yüksek olarak bulunmuştur. Soğutma sonrası örneklerdeki bulgumuzun ise diğer tüm araştırmacıların (Trimble ve ark., 2013; Berghaus ve ark., 2013; Cox ve ark., 2014; Yamatogi ve ark., 2016; Hardie ve ark., 2019; Machado ve ark., 2020; Boubendir ve ark., 2021; Thames ve ark., 2022; Rasamsetti ve ark., 2022) bulgularından daha yüksek olduğu görülmüştür.

Soğutma öncesi karkas örneklerinde *Salmonella* prevalans değerlerindeki farklılıkların nedenleri olarak, özellikle sürüdeki *Salmonella* taşıyıcılığının yüksek düzeyde olması, nakil koşulları ve süresinin yaratabileceği stres, hayvanın ırk özellikleri ile yaşı, ağırlığı gibi faktörlere; kesim sistemindeki farklılıklar olarak tüy ıslatma prosesinde kullanılan teknik-su/buhar, ıslatmanın tek veya çok aşamalı olması, uygulanan sıcaklık derece ve süresi, iç organ çıkartma sisteminin tam/yarı otomatize olması ve iç dış yıkama sisteminin etkinliği, kullanılan antimikrobiyal proses yardımcılarının çeşit ve konsantrasyon farklılıkları, kesim hacminin yüksekliğine bağlı olarak oluşabilecek kros kontaminasyonlar söz konusu olabilmektedir.

Karkas örneklerinde soğutma sonrası *Salmonella* prevalansındaki değişimlerin ise, soğutma sistemindeki farklılıklar, proseste su (mekanik ve termal etki) veya buhar (misting, sprey, chilling sırasında aerosol bulaşma) kullanımı, soğutma tünelinde

kalma süresi, uygulanan sıcaklık derece ve süresi, kullanılan antimikrobiyal proses yardımcılarının çeşit ve konsantrasyon farklılıkları, soğutmaya giren karkas dansitesine bağlı olarak kros kontaminasyon olasılığına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Her iki aşamadan alınan örneklerde, etkenin saptanmasında rol oynayabilecek önemli unsurlar ise, örnekleme yönteminde kullanılan örnek alma tipi (tüm karkas yıkama, karkas eksizyonu vb), patojen tespit yöntemi ve uygulanması (bakteriyolojide kullanılan yöntemin etkinliği, PCR ve etkinliği-yanlış negatif ve pozitif olasılığı), örnek sayısı, mevsim, yıl içindeki örnekleme aralığı/dağılımı ile veri bütünlüğünün sağlanması şeklinde belirtilebilir.

5.2. Karkas Örneklerinde *Salmonella* spp. Sayısı

Çalışmamızda *Salmonella* spp. sayısının, SÖ karkas örneklerinde ortalama 1,84 $\log_{10}$ EMS iken hava soğutma sistemi çıkışında alınan SS karkas örneklerinde 0,36 $\log_{10}$ EMS azalma ile 1,48 $\log_{10}$ EMS değerine düştüğü ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 16).

2020 yılında Machado ve ark. tarafından Brezilya'da *Salmonella* kontrol programı dahilinde alınan önlemlerin etkinliğinin belirlenmesi ve risk değerlendirmesi amacı ile yapılan, farklı iki broyler işletmesine ait 20 kümesten elde edilen ve immersiyon soğutma sistemi kullanılarak soğutulan karkaslardan 500 adet soğutma öncesi ve 500 adet soğutma sonrası alınan 25 g derili karkas et örneği, *Salmonella* spp. sayısının belirlenmesi yönünden ISO 6579-2:2012'de yer verilen mMPN yönteminin modifikasyonu ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen konsantrasyon seviyeleri en düşük <1 CFU/g ve en yüksek >710 CFU/g sayısal değeri ile verilmiş ve beş kategori altında sınıflandırlmış olduğundan bulgularımız ile birebir olarak karşılaştırma yapılamamıştır. Bununla birlikte, bulgularımıza paralel olarak SÖ ve SS örneklerinde bulunan *Salmonella* sayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu ($p\leq0,0001$) rapor edilmiştir.

Çalışmamızda 4. parti 30 numaralı örnek (2,0 $\log_{10}$ mEMS) ile 5. parti 42 numaralı örneğin (1,2 $\log_{10}$ EMS) SÖ ve SS *Salmonella* sayılarının eşit olduğu (Tablo 20), 5. parti 38 (SÖ 1,2 $\log_{10}$ EMS, SS 2,0 $\log_{10}$ EMS) ve 43 numaralı (SÖ 0,5 $\log_{10}$

EMS, SS 1,2 $\log_{10}$ EMS) örneklerde ise SS tespit edilen *Salmonella* sayısının SÖ değerlerine göre daha yüksek olduğu (Tablo 21) bulunmuştur. Buna rağmen, yapılan istatistiksel analizler sonrasında, her iki partinin SÖ ve SS örneklerindeki sayısal farklılığın önemli olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, Machado ve ark. (2020)'nın yaptığı çalışmada da incelenen örneklerin birkaçında SS örneklerinin SÖ örneklerine göre daha yüksek sayıda *Salmonella* içerdiği bildirilmiş olup bunun kesimhanede kullanılan soğutma yöntemi (immersiyon chilling) kaynaklı kros kontaminasyona bağlı olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda ise hava soğutma sistemi ile soğutulan ve sonrasında alınan karkaslardan iki tanesinde etkenin saptanmasının, örneğe ve/veya soğutma prosesine ait bir hatanın kabul edilebilir limitin üzerine çıkması nedeni ile olabileceği düşünülmektedir.

Mion ve ark. (2016), özellikle otomatize sistemlerdeki soğutma uygulamalarının doğru şekilde gerçekleştirilmesi ve klorlamanın etkin olarak uygulanması ile etkenin sayı ve prevalansında belirgin azalmalar olabileceğini belirtmiştir. 2019 yılında Hindistan'da tam otomatik ve yarı otomatik kesim sistemine sahip iki kesimhanede, *Salmonella* kontaminasyonunun kontrolü için kritik aşamalar olarak kabul edilen tüy yolumu, iç organ çıkarma ve klorla karkas yıkama aşamaları sonrasında 100 cm^2'lik karkas yüzeyinden alınan 48 adet svap örneği, *Salmonella* sayısı yönünden ISO 6579:2002'de yer alan geleneksel mMPN ile analiz edilmiştir. Pozitif örneklerin doğrulanmasında çalışmamızdaki real-time PCR'a benzer fakat konvansiyonel bir PCR yöntemi kullanılmıştır. Klorla karkas yıkama aşaması sonrasında *Salmonella* sayısı, yarı otomatik kesimhane örneklerinde 0,555 $\log_{10}$ mMPN ve tam otomatize kesimhane örneklerinde ise negatif olarak rapor edilmiştir (Waghamare ve ark., 2019).

Çalışmamızdaki SÖ örneklerinin de yıkama sonrası alındığı düşünülerek bu yönden *Salmonella* sayıları değerlendirildiğinde, elde ettiğimiz ortalama 1,84 $\log_{10}$ mEMS değerinin her iki kesimhanede tespit edilen seviyeden yüksek olduğu görülmektedir. Bulgularımızdaki farklılığın, karkas yıkama suyuna katılmasına izin verilen klor miktarının ülkelerdeki yasal mevzuatlarda bulunan konsantrasyonlarının kabul edilebilir sınırlarının farklılığı, ülkemizde bu değer maksimum 0,5 ppm iken bunun Hindistan'da yapılan bu çalışmada kullanılan değerden daha düşük olma potansiyeli ve dolayısı ile etkenin canlı kalma olasılığının daha yüksek olması kaynaklı

olabileceği öngörülmektedir. Bununla birlikte, kesime gelen canlı hayvanın başlangıç *Salmonella* yükünün yüksekliği kesim akışındaki engel etkenlere rağmen soğutma sonrası karkaslardaki sayının nispi olarak yüksek kalması ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir.

Berghaus ve ark. (2013) tarafından bir kesimhanede farklı kesim aşamalarında (bekleme sırasındaki canlı hayvan, askılama öncesi, soğutma öncesi ve soğutma sonrası) *Salmonella* spp. sayısını belirlemek amacı ile gerçekleştirilen çalışmada, 330 soğutma öncesi ve 330 soğutma sonrası karkas yıkama ile alınan örnekler, FDA-BAM metodu kullanılarak minyatürize olmayan geleneksel 3 tüp MPN ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, ortalama 2,57 $\log_{10}$ MPN düzeyinde olan SÖ örneklerdeki *Salmonella* sayısının, SS örneklerinde 0,25 $\log_{10}$ MPN'lik bir azalma ile 2,32 $\log_{10}$ MPN seviyesine düştüğü saptanmıştır.

Borges ve ark. (2019) tarafından qPCR ile Brezilya kanatlı kesimhanelerinde *Salmonella* sayısını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada, farklı kesim aşamalarından elde edilen toplam 139 karkasa ait bütün karkas yıkama örneği incelenmiştir. İmmersiyon tipi soğutma ile karkas soğutması yapılan işletmede ortalama *Salmonella* sayısı, SÖ örneklerinde 1,74 $\log_{10}$ MPN ve SS örneklerinde ise 1,48 $\log_{10}$ MPN olarak bulunmuş olup bulgularımızla uyum göstermektedir. Soğutma işleminin patojen sayısı üzerindeki etkinliği değerlendirildiğinde, 0,26 $\log_{10}$ MPN değerinde bir azalma sağladığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda SÖ ve SS örnekleri arasında belirlenen ortalama 0,36 $\log_{10}$ mEMS düzeyindeki azalma, Berghaus ve ark. (2013)'nın bulduğu 0,25 $\log_{10}$ MPN, Borges ve ark. (2019)'nın saptadığı 0,26 $\log_{10}$ MPN ve Northcutt ve ark. (2003)'nın bildirdiği 0,50 $\log_{10}$ MPN değerleri ile uyum göstermektedir.

Kanada'da 38 kesimhaneden alınan broyler karkaslarında *Salmonella* sayısı ve proses parametrelerinin etkenin varlığı ya da seviyesi üzerine etkisinin istatistiksel olarak belirlendiği bir çalışmada, Hardie ve ark. (2019), üç ana değişken olarak 1. örnek tipi (karkas veya parça); 2. soğutma yöntemi (su veya hava) ile 3. kesimhanede kullanılan klor çeşidini (klorin, setilpiridinyum klorür veya hiçbiri) kullanmıştır. Ulusal düzeyde bir saha taraması olan bu çalışmada, immersiyon ile soğutma yöntemi olan kesimhanelerde, etkin kullanım ile *Salmonella* spp. sayısında azalma sağlanabileceği rapor edilmiştir. Hava soğutmalı sistemlerde (nemlendirme,

spreyleme) ise, özellikle karkasların asılması sırasında, yan yana olan karkaslar arasındaki temas sonucunda kros kontaminasyonun şekillenebileceği, ayrıca etkenin ortam havasındaki damlacıklarda asılı kalması ve sonrasında karkaslar arasında yeniden dağılmasına neden olabileceği de bildirilmiştir.

Yamatogi ve ark. tarafından 2016 yılında immersiyon soğutma uygulanan kanatlı kesimhanesinde 33'er adet kan akıtma, tüy yolumu ile soğutma sonrası alınan karkasların yıkama suyu örneklerinde *Salmonella* sayısı araştırılmıştır. Çalışmada, konvansiyonel olarak USDA 3 tüp MPN metodu ile tespit edilen ortalama *Salmonella* yükünün <0,03 MPN/g ile >2,400 MPN/g (tespit edilebilir değerin altında ile 3,38 $\log_{10}$ MPN/g) aralığında ve soğutma sonrası örneklerde 0,03 MPN/g (tespit edilebilir değerin altında) olduğu bildirilmiştir. Bulgularımızın aksine, soğutma sonrası örneklerdeki sayının daha düşük seviyelerde bulunması, Brezilya yasal mevzuatında belirtilen soğutma suyu tankına ilave edilen 5 ppm'lik maksimum klor miktarının tespit edilen *Salmonella* sayısında göreceli olarak azalmaya neden olabileceği ile açıklanabilmektedir.

Trimble ve ark. tarafından 2013 yılında üç farklı küçük kapasiteli kanatlı işletmesine ait Cornish Cross, Freedom Rangers, K-22 ırk broylerlerin kesim sonrası immersiyon soğutma uygulanan karkaslardan yıkama yöntemi ile alınan örnekler, USDA-FSIS 3 tüp MPN metodu kullanılarak *Salmonella* varlığı ve sayısı yönünden analiz edilmiştir. Toplam 270 adet SS örnekte ortalama *Salmonella* sayısı 0,85 $\log_{10}$ MPN olarak bulunmuştur. Bu değerin çalışmamızda elde edilen SS ortalama *Salmonella* sayısına (1,48 $\log_{10}$ mEMS) kıyasla daha düşük olmasının sebeplerinden birinin çalışmada kullanılan hayvan ırkı farklılığı, diğerlerinin ise kullanılan örnekleme yöntemi, sayım yöntemi ve duyarlılığı, kullanılan soğutma teknolojisindeki farklılıklar ile canlı hayvandaki başlangıç kontaminasyonu olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda elde edilen ortalama *Salmonella* spp. sayısının soğutma öncesi karkaslarda en düşük 0,055 ve en yüksek 2,57 $\log_{10}$ MPN/g, soğutma sonrası karkaslarda ise en düşük tespit edilebilir değerin altında ve en yüksek 2,32 $\log_{10}$ MPN/g aralığında olduğu belirlenmiştir. Soğutma öncesi örneklerdeki konsantrasyon değerimiz, Borges ve ark. (2019)'nın bulgusu ile uyumlu iken Berghaus ve ark. (2013)'nın rapor ettikleri değerden düşük, Waghamare ve ark. (2019)'ninkinden

yüksek olarak bulunmuştur. Soğutma sonrası örneklerdeki *Salmonella* sayısı ile ilgili sonucumuz ise, Borges ve ark. (2019)'nın bulgusu ile uyumlu iken, Berghaus ve ark. (2013)'nın elde ettikleri sayıya göre düşük, Yamatogi ve ark., 2016 ile Trimble ve ark. (2013)'nın bildirdikleri seviyelerden ise daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Soğutma öncesi karkas örneklerinde *Salmonella* sayısındaki göreceli yüksekliğin çalışmamızda örnekleme yapılan kesimhanede iç organ çıkartımı sonrasında uygulanan karkas yıkama işleminin *Salmonella* sayısının düşürülmesinde yetersiz kalma olasılığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Karkas örnekleme çalışmamız öncesinde işletme yetkili personeli ile görüşmelerimiz dahilinde, kesim sürecinde karkasların soğutma tüneline girme öncesinde ikinci bir yıkama sisteminin ilave edilmesine yönelik planlamalarının olması, çalışmamızın da bu kararı almalarında destekleyici bir unsur olacağı yönünde karar verilmiştir. Dolayısı ile çalışma sonuçlarımız, firmanın kesim hattında yapmak istediği revizyonun gerekliliğinin ortaya konulması açısından önem arz etmektedir. Bununla birlikte, işletmeye gelen broyler sürülerindeki *Salmonella* taşıyıcılığının muhtemelen yüksek olması, bu aşamaya kadar etkenin karkaslar arasında kros kontaminasyonla yükünün artmasında etkili diğer bir faktör olabileceğini de düşündürmektedir.

Karkas örneklerinde soğutma sonrası *Salmonella* sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüş olmasına rağmen benzer çalışma verileri göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda soğutma sonrası karkas *Salmonella* yükünde yeterli bir azalmanın gözlenememesinde ise, başlangıç *Salmonella* seviyesinin yüksekliği, air chiller sisteminde soğutmaya giren karkas dansitesinin yüksek olması, havada asılı kalan su damlacıklarına bağlı olarak karkaslar arası kros kontaminasyon olasılığının artması gibi etmenlere bağlı olarak şekillenebileceği öngörülmektedir.

Benzer örnek çeşidi olması nedeniyle kanatlı parça et ve ürünlerinde *Salmonella* spp. varlığı ve sayısı ile ilgili yapılan çalışmalar da incelenmiştir.

Bu çalışmalardan Çin'de Wang ve ark. (2013), 240 çiğ tavuk etindeki *Salmonella* prevalansını %43,3, sayısını ise ortalama 0,1655 MPN/g olarak belirlemiştir. Bu örneklerin içerisinde, süpermarketlerden alınan soğutulmuş tavuklardaki prevalans ve ortalama sayı %49,2 ve 0,0988 MPN/g, dondurulmuş tavuklardaki %53,3 ve 0,1804 MPN/g ve pazarlarda taze kesilmiş olarak satılan tavuklardaki oran ve sayı %37,5 ve 0,1912 MPN/g olarak saptanmıştır. Çiğ kanatlı

etlerindeki (göğüs, but, kanat ve et) *Salmonella* kontaminasyon oranı ve seviyelerini belirlemek amacı ile Mazengia ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, toplam 1322 örneğin %11'inde *Salmonella* tespit etmiş olup, pozitif olan örneklerin %94'ünde *Salmonella* spp. sayısının <30 MPN/100 g olduğunu rapor etmiştir. Çin'de perakende çiğ kümes hayvanı etinde *Salmonella* prevalansını ve seviyelerini araştıran Yang ve ark. (2020), alınan örneklerden tavuk etlerinin %36,7'sinin, ördek etlerinin %40,7'sinin, güvercin etlerinin ise %39,2'sinin *Salmonella* varlığı açısından pozitif olduğunu saptamıştır. Pozitif örneklerin çoğundaki (%36,1) *Salmonella* sayısının da 0,3 ile 10 MPN/g aralığında değiştiğini bildirmiştir. Rortana ve ark. (2021), Ekim 2018 ile Ağustos 2019 tarihleri arasında Kamboçya'daki 52 geleneksel pazar ve 6 süpermarketten satın aldıkları 408 tavuk eti örneğinde, *Salmonella* spp. prevalansını %42,6 ve sayısını 10,6 MPN/g olarak bulmuştur.

Peng ve ark. (2016), ABD'nde soğutulmuş derili baget, but ve kanat örneklerinde sırasıyla *Salmonella* spp. prevalans ve sayısını sırasıyla %13,7, %19,7 ve %25,0 oranında ve 1,18 log MPN, 1,29 log MPN ve 1,45 log MPN (15,14 MPN, 19,49 MPN ve 28,18 MPN) olarak tespit etmiştir. 2019 yılında Hardie ve ark., (2019) tarafından, Kanada'da 1418 adet paketlenmiş göğüs ve but parça eti örneklerinin 404 adedinde (%28,49) *Salmonella'*nın pozitif olarak bulunduğu belirlenmiştir. Brezilya'da Perin ve ark. (2020), perakende satışa sunulan dondurulmuş tavuk parça etinde (kanat, göğüs, but ve kızartılmış tavuk) *Salmonella* spp.'nin %31,7 (95/300) oranında olduğunu ve bu patojenin örneklerdeki sayısının 0,12 ila 6,4 MPN/g arasında değiştiğini saptamıştır. Machado ve ark. (2020) ise, dondurulmuş göğüs etinin %2 (12/600) oranında bu etken ile kontamine olduğunu bildirmiştir.

Roccato ve ark. (2015), *Salmonella* spp. ile doğal olarak kontamine olmuş kanatlı eti (piliç ve hindi eti karışımı) ve ürünlerinde (sosis ve burger) yaptıkları çalışmada, *Salmonella* seviyesinin ortalama 1-10 MPN/g olarak bulunduğunu rapor etmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada, ev ortamında alınan çiğ, önceden pişirilmiş ve kızartılmış tavuk, baharat, su, harç ve gıda işleyicisinin ellerinden oluşan 104 örneğin %22,1'inde *Salmonella* spp. bulunduğu tespit edilmiştir. Pozitif bulunan örneklerdeki *Salmonella* seviyesinin 0,3 MPN/g (kızarmış tavuk ve suda) ile 920 MPN/g (marine edilmiş çiğ tavukta) aralığında olduğu bildirilmiştir (Rosniawati ve ark., 2021). 2020 yılında Birleşik Krallık'ta 400'den fazla kişinin etkilendiği bildirilen dondurulmuş

panelenmiş kanatlı eti ürünlerinin tüketilmesi kaynaklı salmonelloz vakasında, ürünlerin İngiltere'deki altı üretim tesisinde üretildiği tespit edilmiştir. Örneklerin analizi sonrasında, *Salmonella* pozitif örneklerin %60'ında *Salmonella* seviyesi <1.0 MPN/g iken en yüksek sayının *S.* Enteritidis için 28 MPN/g ve *S.* Infantis için 54 MPN/g olduğu rapor edilmiştir (Jorgensen ve ark., 2022). Yang ve ark. (2022), 300 adet perakende Ready To Eat (RTE) kanatlı et ürünü örneğinin 7'sinin (%2,3) *Salmonella* spp. yönünden pozitif olduğunu ve örneklerdeki ortalama sayının 0,3 ile >110 MPN/g arasında değiştiğini bildirmiştir.

Bu çalışmaların verileri toplu olarak değerlendirildiğinde *Salmonella* prevalansı ve sayısının; çiğ tavuk eti parçalarında %11-43,3 ve <0,03-10,6, soğutulmuş olanlarda %19,5-49,2 ve 0,09-1,31 MPN/g ve dondurulmuş tavuk eti parçalarında da %2-53,3 ve 0,2-6,4 MPN/g düzeylerinde bulunduğu belirlenmiştir. Kanatlı et ürünlerindeki prevalans oranı ve sayı aralığının ise %2,3-60 ve 0,3->110 MPN/g olduğu saptanmıştır.

Dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden *Salmonella* spp. kaynaklı enterik enfeksiyonlarda, kanatlı hayvanların önemli bir rezervuar olduğu bilinmektedir. Salmonellaların kanatlı çiftlikleri ile kesimhane ve çevresinden eradikasyonu kadar insan sağlığında ciddi risk unsuru olan etkene maruziyet sonrasındaki sürecin ekonomik maliyeti de ülkelerin Salmonella Kontrol Programlarındaki revizyonlarını çalışmamız bulguları vb. veriler dahilinde gerçekleştirmeleri gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Günümüzde çoğunlukla 'prevalans oranı' ile rapor edilen kanatlı etlerindeki *Salmonella* kontaminasyon oranının, esasen 'kontaminasyon seviyesi' olarak değerlendirilmesi, mikrobiyal riskin belirlenmesi, dolayısı ile halk sağlığının korunması yönünden önem kazanmıştır. Hastalık kaynağı olan kanatlı etlerindeki *Salmonella* sayısının multifaktöriyel olduğu ve işletmelerde etkenin hem proses aşamalarında daha sıkı performans standartlarına uyularak hem de son üründeki sayısının azaltılarak düşürülmesi gerektiği üzerinde durulmaktadır.

2000'li yılların başından itibaren Amerikan Milkrobiyoloji Birliği ile Gıda ve Mikrobiyolojik Kriterler Ulusal İstişare Komitesi uzman raporlarında yer alan patojenin seviyesindeki düşmenin sayı belirleme ile paralel olarak gerçekleştirilmesi gerektiği, kontrol önlemleri ile *Salmonella* sayısında azalmaya bağlı tüketici

maruziyeti düşse dahi, risk belirlenmesinde prevalans oranının değişmeyebileceği konusuna işaret edilmektedir. Ayrıca risk belirleme çalışmaları ile de insan salmonelloz vakalarının yüksek sayıda *Salmonella* ile kontamine tavuk eti tüketimi ile ilişkili olma olasılığının çok daha fazla olduğuna dair somut veriler ortaya konulmaktadır.

Güncel mevzuatımızda, AB'nde olduğu gibi halen bu patojenin broyler karkaslarındaki sayısının belirlenmesi ve sayısı ile ilgili olarak herhangi bir kriter ve/veya limit bulunmamakta olup etkenin var/yok şeklinde belirlenmesi ile birlikte konsantrasyon düzeylerinin de ölçülmesi gerekmektedir.

Yukarıda değinilen tüm bilgiler göz önünde bulundurularak tasarlanmış olan bu tez çalışması ile *Salmonella*'nın ülkemizde broyler karkas örneklerinde ISO 6579-2:2012 metodu ilk kez kullanılarak varlığı ve kontaminasyon seviyesi belirlenmiştir. İncelenen SS örneklerin büyük bir bölümünde (%85,42) etkenin tespit edilmesi, ülkemizde sürdürülmekte olan kontrol programı çalışmalarının en azından bu kesimhaneye canlı hayvan temin eden kanatlı işletmeleri yönünden henüz istenilen seviyede bir koruma sağlayamadığını göstermektedir. Kesim prosesindeki kritik iki aşama olan SÖ ve SS alınan örneklerdeki *Salmonella* seviyeleri arasındaki farkın (0,36 $\log_{10}$ mEMS) istatistiksel olarak önemli bulunmasına rağmen halen son ürün olarak kabul edilen soğutulmuş karkaslarda ortalama sayının 1.48 $\log_{10}$ mEMS değerinde olması, öncelikle işletmede soğutma öncesinde uygulanan iç dış yıkama vb aşamaların etkinliğinin patojenin sayısal azalmasında yeterli düzeyde bir düşüşe neden olamadığına işaret etmektedir.

Bu tez çalışması, öncelikle ülkemizde *Salmonella* sayısının broyler karkaslarında belirlendiği ilk çalışma olması yönünden literatüre sağladığı katkı yanında kanatlı işletmesindeki soğutmaya dayalı kritik aşamaların değerlendirilerek patojen redüksiyonuna yönelik revizyon planlaması için somut veri oluşturmaktadır. Ayrıca çalışma sonuçlarının gelecekte yasal otoritenin Ulusal Salmonella Kontrol Programı'nda ve TGK Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ndeki ilgili güncellemelerinde, tarafsız referans bilgi olarak değerlendirebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Aday, S., U Pala, Ç., Ayana Çam, B., & Bulut, S. (2021). Combined effects of acidification and high-pressure processing on microbial inactivation, bioactive compounds and antioxidant activity of liquorice root sherbet. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences,* 5 (3):364-374.

Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E. & Adenubi, O. T. (2011). Evolution of *Salmonella* nomenclature: a critical note. *Folia Microbiologia,* 56(6), 497-503. https://doi.org/10.1007/s12223-011-0075-4.

Akbay, R., Yalçın, S., Ceylan, N., & Olhan, E. (2000). *Türkiye tavukçuluğunda gelişmeler ve hedefler*. Ankara: V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, 795-810.

Alakomi, H. L., & Saarela, M. (2009). *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods,* 1(3), 142-152.

Alsaggaf, M. S., Moussa, S. H., & Tayel, A. A. (2017). Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement of Nile tilapia fillets. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 499-505.

Atterbury, R. J., Gigante, A. M., Rubio Lozano, M. D. L. S., Méndez Medina, R. D., Robinson, G., Alloush, H., ... & Allen, V. M. (2020). Reduction of *Salmonella* contamination on the surface of chicken skin using bacteriophage. *Virology Journal*, 17 (1), 1-8.

Bakowski, M.A., Braun, V., & Brumell, J.H. (2008). *Salmonella* containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic*, 9, 2022–2031.

Bell, C., & Kyriakides, A. (2002). *Salmonella: A Practical Approach to The Organism and Its Control in Foods*. First published, UK, (s. 1-25).

Bennett, A. R., Greenwood, D., Tennant, C., Banks, J. G., & Betts, R. P. (1998). Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (6), 437-441.

Berghaus, R. D., Thayer, S. G., Law, B. F., Mild, R. M., Hofacre, C. L., & Singer, R. S. (2013). Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (13), 4106-4114.

Blodgett, R. J., & Garthright, W. E. (1998). Several MPN models for serial dilutions with suppressed growth at low dilutions. *Food Microbiology*, 15 (1), 91-99.

Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., McFall, M. E., King, R. K., & Renter, D. G. (2007). A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *Journal of Food Protection*, 70 (5), 1080-1087.

Bonardi, S., Bruini, I., Bolzoni, L., Cozzolino, P., Pierantoni, M., Brindani, F., ... & Pongolini, S. (2017). Assessment of *Salmonella* survival in dry-cured Italian salami. *International Journal of Food Microbiology*, 262, 99-106.

Borges, K. A., Martelo, E. B., Dos Santos, L. A., Furian, T. Q., Cisco, I. C., Manto, L., & Dos Santos, L. R. (2019). Detection and quantification of *Salmonella* spp. in poultry slaughterhouses of southern Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13 (5), 455-460.

Boubendir, S., Arsenault, J., Quessy, S., Thibodeau, A., Fravalo, P., Thériault, W. P., ... & Gaucher, M. L. (2021). *Salmonella* contamination of broiler chicken

carcasses at critical steps of the slaughter process and in the environment of two slaughter plants: prevalence, genetic profiles, and association with the final carcass status. *Journal of Food Protection*, 84 (2), 321-332.

Brands, D. A. (2006). *Deadly Diseases and Epidemics Salmonella* (pp.16). New York: Chelsea House Publications, Illustrated Edition.

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), 2465-2467.

Buhr, R. J., Spickler, J. L., Ritter, A. R., Bourassa, D. V., Cox, N. A., Richardson, L. J., & Wilson, J. L. (2012). Efficacy of combination chemicals as sanitizers of *Salmonella*- inoculated broiler hatching eggshells. *Journal of Applied Poultry Research*, 22, 27–35.

Byrd, J. A., DeLoach, J. R., Corrier, D. E., Nisbet, D. J., & Stanker, L. H. (1999). Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. *Avian Diseases*, 43 (1), 39–47.

Carrique-Mas, J. J., & Davies, R. H. (2008). Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: A review. *Revue Scientifique et Technique*, 27 (3), 665-667. https://doi.org/10.20506/rst.27.3.1829.

Chaney, W. E., Naqvi, S. A., Gutierrez, M., Gernat, A., Johnson, T. J., & Petry, D. (2022). Dietary Inclusion of a Saccharomyces cerevisiae-Derived Postbiotic Is Associated with Lower *Salmonella enterica* Burden in Broiler Chickens on a Commercial Farm in Honduras. *Microorganisms*, 10 (3), 544.

Cheng, C. M., Doran, T., Lin, W., Chen, K. S., Williams-Hill, D., & Pamboukian, R. (2015). Interlaboratory validation for a real-time PCR *Salmonella* detection method using the ABI 7500 fast real-time PCR system. *Journal of Food Protection*, 78, 1119–1124.

Civaner, E. Ç. (2007). *Kanatlı Etleri.* Ankara: İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi.

Cliver, D. O. (1990). Foodborne Diseases. Academic Press, Inc. s: 185-208.

Crosa, J. H., Brenner, D. J., & Ewing W. H. (1973). Molecular relationships among the *Salmonellae*. *Journal of Bacteriology*, 115, 307-315.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (1998). Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. *Journal of Applied Microbiology*, 85 (4), 673-677.

Cohen, N. D., Neibergs, H. L., McGruder, E. D., Whitford, H. W., Behle, R. W., Ray, P. M., & Hargis, B. M. (1993). Genus-specific detection of *Salmonellae* using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5 (3), 368-371.

Cox, N. A., Buhr, R. J., Smith, D. P., Cason, J. A., Rigsby, L. L., Bourassa, D. V., ... & Cosby, D. E. (2014). Sampling naturally contaminated broiler carcasses for *Salmonella* by three different methods. *Journal of Food Protection*, 77 (3), 493-495.

Cox, N.A., Richardson, L.J., Buhr, R.J., Musgrove, M.T., Berrang, M.E., & Bright, W. (2007). Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar Typhimurium. *Journal of Applied Poultry Research*,16, 623–627.

Cunha, B. A. (2004). Osler on typhoid fever: Differentiating typhoid from typhus and malaria. *Infectious disease clinics of North America*, 18, 111–125. https://doi.org/10.1016/s0891-5520(03)00094-1.

De Cesare, A., Manfreda, G., Dambaugh, T. R., Guerzoni, M. E., & Franchini, A. (2001). Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 780-785.

Desai, P. T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Clifton, S. W… McClelland, M. (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *MBio*, 4 (2), e00579-12.

Dokuzlu, S., Barış, O., Hecer, C., & Güldaş, M. (2013). Türkiye'de tavuk eti tüketim alışkanlıkları ve marka tercihleri. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (2), 83-92.

EFSA, European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12),e05926. https://doi.org./10.2903/j.efsa.2019.5926.

Eijkelkamp, J. M., Aarts, H. J. M., & Van der Fels-Klerx, H. J. (2009). Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses. *Food Analytical Methods*, 2 (1), 1-13.

Ellermeier, C. D., & Slauch, J. M. (2006). *Genus Salmonella*. In Dworkin, M. D. (Eds.), The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria (Vol. 6) (s. 123-159). New York: SpringerPress.

El-Sebay, N. A., Shady, M. H. A., El-Rashed El-Zeedy, S. A., & Samy, A. A. (2017). InvAgene sequencing of *Salmonella* Typhimurium isolated from Egyptian poultry. *Asian Journal of Scientific Research*, 10, 194–202. https://doi.org/10.3923/ajsr.2017.194.202.

Erol, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara: Pozitif Matbaacılık ltd. şti.

European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(2):6406, 286 s. 13-285. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406.

Finlay, B. B. (1994). Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*, 192, 163-185.

Foley, S. L. & Lynne, A. M. (2008). Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86 (14), 173-187. https://doi.org/10.2527/jas.2007-0447.

Fung, D. Y. C. (2002). Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 3-14.

GKGM (2018). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Duyuru/323/Ulusal-Salmonella-Kontrol-Programi-Yayinlanmistir. (17.10.2022)

Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, T. J., & Maher, M. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*, 59 (2), 126-139.

Gole, V. C., Woodhouse, R., Caraguel, C., Moyle, T., Rault, J. L., Sexton, M., & Chousalkar, K. (2017). Dynamics of *Salmonella* shedding and welfare of hens in free-range egg production systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (5), e03313-16.

Gökduman, K., Avsaroglu, M. D., Cakiris, A., Ustek, D., & Gurakan, G. C. (2016). Recombinant plasmid-based quantitative Real-Time PCR analysis of *Salmonella enterica* serotypes and its application to milk samples. *Journal of Microbiological Methods*, 122, 50-58.

Gracias, K. S., & McKillip, J. L. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50 (11), 883-890.

Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2008). Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24 (1), 22-26.

Grimont, P.A.D., & Weill, F. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars: White-Kauffmann-Le Minor Scheme*. 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Available at www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms-index.html (03.11.2016).

Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemühl, J., Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2010). Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. *Research in Microbiology*, 161 (1), 26-29.

Guillier, L., Danan, C., Bergis, H., Delignette-Muller, M. L., Granier, S., Rudelle, S., ... Brisabois, A. (2013). Use of quantitative microbial risk assessment when investigating foodborne illness outbreaks: The example of a monophasic *Salmonella* Typhimurium 4, 5, 12: i:− outbreak implicating beef burgers. *International Journal of Food Microbiology*, 166 (3), 471-478.

Ha, S. D., Maciorowski, K. G., & Ricke. S. C. (1997). Ethyl alcohol reduction of *Salmonella typhimurium* in poultry feed. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbio*logy, 5, 75–85.

Hansen-Wester I., Stecher, B., & Hensel, M. (2002). Type III secretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors and SseFG. *Infect. Immun*., 70, 1403–1409.

Hardie, K. M., Guerin, M. T., Ellis, A., & Leclair, D. (2019). Associations of processing level variables with *Salmonella* prevalence and concentration on broiler chicken carcasses and parts in Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 168, 39-51.

Hardy, A. (2004). *Salmonella*: a continuing problem. *Postgraduate Medical Journal*, 80, 541–545.

Hardy, A. (2015). *Salmonella Infections, Networks of Knowledge, and Public Health in Britain, 1880-1975*. First edition (s. 4-5). United Kingdom: Oxford University Press.

Hasipek, S., & Aktaş N. (1991). *Ülkemizde tavuk eti ve yumurtanın beslenmemizdeki yeri ve önemi*. İstanbul: Uluslararası Tavukçuluk Kongresi.

Hekimoğlu, B. & Altındeğer, M. (2009). Kanatlı Hayvan Eti Sektör Raporu Sorunları ve Çözüm Önerileri. (2009, Temmuz) https://biyogazder.org/makaleler/mak21.pdf

Hollis, R. J., Bruce, L., Fritschel, S. J., & Pfaller, M. A. (1999). Comparative evaluation of an automated riboprinting instrument versus Pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34, 263-268.

Imen, B. S., Ridha, M., & Mahjoub, A. (2012). *Salmonella*-A Dangerous Foodborne Pathogen. *Laboratory typing methods for diagnostic of Salmonella strains, the "old" organism that continued challenges* içinde (s.349-372.) Rijeka: Intechopen.

ISO (2002). ISO 6579: 2002. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2012). ISO 6579-2:2012. Microbiology of Food and Animal Feed- Horizontal Method for the Detection, Enumaration and Serotyping of Salmonella-Part 2: Enumeration by a Miniaturized Most Probable Number Technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2013). ISO 7218:2007/Amd.1:2013. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2015). ISO 17604:2015. Microbiology of the Food Chain-Carcass Sampling for Microbiological Analysis. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2017). ISO 6887-1:2017. Microbiology of the Food Chain-Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination-Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., Pinna, E. D., Nair, S., ... Weill, F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165 (7), 526-530. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004.

İzgür, M. (2006). *Salmonella* İnfeksiyonları. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)* içinde (s.116-121). Ankara: İlke-Emek Yayınları.

Jarvis, B., Wilrich, C., & P.-T. Wilrich. (2010). Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology*, 1660 – 1667.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. America: Springer Science & Business Media.

Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology. 6th Edition*, pp. 511-524. Maryland: An Aspen Publication.

Jørgensen, F., McLauchlin, J., Verlander, N. Q., Aird, H., Balasegaram, S., Chattaway, M. A., ... & Willis, C. (2022). Levels and genotypes of *Salmonella* and levels of *Escherichia coli* in frozen ready-to-cook chicken and turkey products in England tested in 2020 in relation to an outbreak of *S. Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 369, 109609.

Jung, Y., Porto-Fett, A. C., Shoyer, B. A., Henry, E., Shane, L. E., Osoria, M., & Luchansky, J. B. (2019). Prevalence, levels, and viability of *Salmonella* in and on raw chicken livers. *Journal of Food Protection*, 82 (5), 834-843.

Kao, J. Y, Zhang, M., Miller, M. J., Mills, J. C., Wang, B., Liu, M., … Luther, J. (2010). Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. *Gastroenterology*, 138 (3), 1046–1054.

Kauffmann, F. (1941). A typical variant and a newreeves serological variation in the *Salmonella* group. *Journal of Bacteriology*, 41 (2), 127-141.

Kaufmann, M. E. (1998). *Pulsed-field gel electrophoresis. In Molecular bacteriology* (s. 33-50). American: Humana Press.

Kawataa, Y., & Kubota, S. (2018). Consumers' willingness to pay for reprocessed fried chicken: A way of reducing uneaten food. *Appetite*, 120, 571-577.

Kim, S. A., Park, S. H., Lee, S. I., & Ricke, S. C. (2017). Development of a rapid method to quantify *Salmonella Typhimurium* using a combination of MPN with qPCR and a shortened time incubation. *Food Microbiology*, 65, 7-18.

Landeras, E., Gonzalez-Hevia, M. A., Alzugaray, R., & Mendoza, M. C. (1996). Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping. *Journla of Clinical Microbiology*, 34, 2294-6.

Lee, K.M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264–276.

Lin-Hui, S., & Cheng-Hsun, C. (2007). *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 30 (3), 210-218.

Machado, J., & Bernardo, F. (1990). Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 477–480.

Machado, S. C. A., Pereira, V. L. A., Aquino, M. H. C., Santos, A. F. M., Rodrigues, D. P., Giombelli, A., & Nascimento, E. R. (2017). Serotyping and genotyping of *Salmonella* strains isolated from broilers, chicken carcasses before and after chilling, and frozen chicken breasts produced in the states of Mato Grosso do Sul and Santa Catarina, *Brazil. Brazilian Journal of Poultry Science*, 19, 135-142.

Machado, S. D. C. A., Pereira, V. L. A., Aquino, M. H. C., Giombeli, A., Rodrigues, D. P., & Nascimento, E. R. (2020). Qualitative and quantitative analysis of *Salmonella* spp. in broilers technological processing and determination of a performance objective (PO) for frozen chicken breast. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 22.

Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F. T., Pillai, S. D., & Ricke, S. C. (2006). Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in animal feeds–a review. *Veterinary Research Communications*, 30 (2), 127-137.

Maiden, M. C. J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., … Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a protable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 95, 3140-3145.

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... Hoekstra, R. M. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (6), 882–889. https://doi.org/10.1086/650733.

Malorny B., Hauser E., & Dieckmann R. (2011). New Approaches in Subspecies-Level *Salmonella* Classification. *Salmonella from Genom to Function* içinde (s. 1-23). UK: Caister Academic Press.

Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 117, 211 – 218.

Massacci, F. R., Morelli, A., Cucco, L., Castinel, A., Ortenzi, R., Tofani, S., ... Magistrali, C. F. (2020). Transport to the Slaughterhouse Affects the *Salmonella* Shedding and Modifies the Fecal Microbiota of Finishing Pigs. *Animals*, 10(4), 676. https://doi.org/10.3390/ani10040676.

Maurer, J. J. (2011). Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 259-279.

Mazengia, E., Samadpour, M., Hill, H. W., Greeson, K., Tenney, K., Liao, G., ... & Meschke, J. S. (2014). Prevalence, concentrations, and antibiotic sensitivities of *Salmonella* serovars in poultry from retail establishments in Seattle, Washington. *Journal of Food Protection*, 77 (6), 885-893.

McCrady, M. H. (1915). The numerical interpretation of fermentation-tube results. *The Journal of Infectious Diseases*, 17 (1), 183-212.

McEntire, J., Acheson, D., Siemens, A., Eilert, S., & Robach, M. (2014). The public health value of reducing *Salmonella* levels in raw meat and poultry. *Food Protection Trends*, 34 (6), 386-392.

McQuiston, J. R., Fields, P. I., Tauxe, R. V., & Logsdon, J. M. (2008). Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol*ogy, 16 (4), 142-148.

McWhorter, A. R., & Chousalkar, K. K. (2019). From hatch to egg grading: monitoring of *Salmonella* shedding in free-range egg production systems. *Veterinary Research*, 50 (1), 1-9.

Mead, G., Lammerding, A. M., Cox, N., Doyle, M. P., Humbert, F., Kulikovskiy, A., ... *Salmonella* on Raw Poultry Writing Committee. (2010). Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. *Journal of Food Protection*, 73 (8), 1566-1590.

Mion, L., Parizotto, L., dos Santos, L. A., Webber, B., Cisco, I. C., Pilotto, F., ... & dos Santos, L. R. (2016). *Salmonella* spp. isolated by miniaturized most probable number and conventional microbiology in poultry slaughterhouses. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44, 1-5.

Mohammad, Z. H., Hasan, A. A., Kerth, C. R., Riley, D. G., & Taylor, T. M. (2018). Increased effectiveness of microbiological verification by concentration-dependent neutralization of sanitizers used in poultry slaughter and fabrication allowing *Salmonella enterica* survival. *Foods*, 7 (3), 1-9.

MPN calculation program. (2018, 7 Kasım). Erişim adresi: https://www.wiwiss.fu berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/professoren/wilrich/MPN_ver6.xls

Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., ... Kruse, H. (2010). Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 3-15.

Northcutt, J. K., Berrang, M. E., Dickens, J. A., Fletcher, D. L., & Cox, N. A. (2003). Effect of broiler age, feed withdrawal, and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. *Poultry Science*, 82 (1), 169-173.

OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. Paris: OECD Publishing, 2022.

Pardali, E., Paramithiotis, S., Papadelli, M., Mataragas, M., & Drosinos, E. H. (2017). Lactic acid bacteria population dynamics during spontaneous fermentation of radish (Raphanus sativus L.) roots in brine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-9.

Park, S. Y., Birkhold, S. G., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2004). Survival of a *Salmonella typhimurium* poultry marker strain added as a dry inoculum to zinc and sodium organic acid amended feeds. *Journal of Food Safety*, 23, 263–274.

Pavic, A., Groves, P. J., Bailey, G., & Cox, J. M. (2010). A validated miniaturized MPN method, based on ISO 6579: 2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (1), 25-34.

Peng, Y., Deng, X. Y., Harrison, M. A., & Alali, W. Q. (2016). *Salmonella* levels associated with skin of turkey parts. *Journal of Food Protection*, 79 (5), 801-805.

Perin, A. P., Martins, B. T. F., Barreiros, M. A. B., Yamatogi, R. S., Nero, L. A., & dos Santos Bersot, L. (2020). Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from chicken meat in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 335-345.

Pesciaroli, M., Cucco, L., De Luca, S., Massacci, F. R., Maresca, C., Medici, L., ... Magistrali, C. F. (2017). Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 82-86.

Petracci, M., Mudalal, S., Bonfiglio, A., & Cavani, C. (2013). Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poultry Science*, 92, 1670-1675.

Popoff, M. Y., & Le Minor, L. (2005). *Salmonella*. In: Brenner, D. J., Kreig, N. R. and Staley, J. T., Editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Springer, New York, USA. p764-799.

Popoff, M. Y., Bockemühl, J., & Gheesling, L. L. (2003). Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*, 154 (3), 173–174.

Quested, T. E., Cook, P. E., Gorris, L. G. M., & Cole, M. B. (2010). Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 29-42.

Rambach, A. (1990). New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From Proteus spp. And other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (1), 301-303.

Rasamsetti, S., Berrang, M. E., Cox, N. A., & Shariat, N. W. (2022). Assessing *Salmonella* prevalence and complexity through processing using different culture methods. *Poultry Science*, 101 (7), 101949.

Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & Farmer 3rd, J. J. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (2), 313-320.

Ricke, S. C., Kim, S. A., Shi, Z., & Park, S. H. (2018). Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. *Journal of Applied Microbiology*, 125 (2), 313-327.

Rigby, C. E. (1982). Most probable number cultures for assessing *Salmonella* contamination of eviscerated broiler carcasses. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46 (3), 279- 282.

Roccato, A., Uyttendaele, M., Cibin, V., Barrucci, F., Cappa, V., Zavagnin, P., ... & Ricci, A. (2015). Survival of *Salmonella Typhimurium* in poultry-based meat preparations during grilling, frying and baking. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 1-8.

Rortana, C., Nguyen-Viet, H., Tum, S., Unger, F., Boqvist, S., Dang-Xuan, S., ... & Lindahl, J. F. (2021). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in chicken meat and pork from Cambodian Markets. *Pathogens*, 10 (5), 556.

Rosniawati, T., Rahayu, W. P., Kusumaningrum, H. D., Indrotristanto, N., & Nikastri, E. (2020). Prevalence and level of *Salmonella* spp. Contamination on selected pathways of preparation and cooking of fried chicken at the household level. *Food Science and Technology*, 41, 41-46.

Rothrock, M. J. Jr., Ingram, K. D., Gamble, J., Guard, J., Cicconi-Hogan, K. M., Hinton, A. Jr., & Kelli, L. H. (2015). The characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from the scalder tank water of a commercial poultry processing plant: Recovery of a multidrug-resistant Heidelberg strain. *Poultry Science*, 94 (3), 467–472.

Sampedro,, F., Wells, S. J., Bender, J. B., & Hedberg, C. W. (2019). Developing a risk management framework to improve public health outcomes by enumerating *Salmonella* in ground turkey. *Epidemiology and Infection*, 147, e69, 1-8. https://doi.org/10.1017/S095026881800328X.

Saucier, L. (1999). Meat safety: Challenges for the future. *Outlook on Agriculture*, 28 (2), 77-82.

Sevilla-Navarro, S., Catalá-Gregori, P., García, C., Cortés, V., & Marin, C. (2020). *Salmonella Infantis* and *Salmonella Enteritidis* specific bacteriophages isolated form poultry faeces as a complementary tool for cleaning and disinfection against *Salmonella*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68, 101405, 1-6.

Silva, N.F.D., Magalhaes, J., Freire, C., & Delerue-Matos, C. (2018). Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 667–682.

Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 30, 225- 420.

Smyser, C. F., & Snoeyenbos, G. H. (1979). Evaluation of organic acids and other compounds as *Salmonella* antagonists in meat and bone meal. *Poultry Science*, 58, 50–54.

Sørensen, L. L., Alban, L., Nielsen, B., & Dahl, J. (2004). The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 101 (2), 131-141.

Stehlik-Barry, K., & Babinec, A. J. (2017). Data analysis with IBM SPSS statistics. Birmingham: Packt Publishing Ltd.

Straver, J. M., Janssen, A. F. W., Linnemann, A. R., Van Boekel, M. A. J. S., Beumer, R. R., & Zwietering, M. H. (2007). Number of *Salmonella* on chicken breast filet at retail level and its implications for public health risk. *Journal of Food Protection*, 70 (9), 2045-2055.

Stager, C. E., & Davis, J. R. (1992). Automated systems for identification of microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 5 (3), 302-327.

Sutton, S. (2010). The most probable number method and its uses in enumeration, qualification, and validation. *Journal of Validation Technology*, 16 (3), 35-38.

Tauxe, R. V., Doyle, M. P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J., & Stein, C. E. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 16-28.

Telli, R. (2006). *Afyon'da Tüketime Sunulan Tavuk Karkas ve Tavuk Eti Örneklerinde Salmonella* spp*. Varlığının Klasik Kültür Tekniği ile Saptanması* [Yayınlanmış yüksek lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü].

TGK (2011) Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmi Gazete 29.12.2011-28157.

TGK (2018) Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmi Gazete 09.10.2018-30560.

Thames, H. T., Fancher, C. A., Colvin, M. G., McAnally, M., Tucker, E., Zhang, L., ... & Sukumaran, A. T. (2022). The Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Broiler Meat at Different Stages of Commercial Poultry Processing. *Animals*, 12 (18), 2460.

Thung, T. Y., Radu, S., Mahyudin, N. A., Rukayadi, Y., Zakaria, Z., Mazlan, N., ... Wan Mohamed Radzi, C. W. (2018). Prevalence, virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serovars from retail beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-8.

Trimble, L. M., Alali, W. Q., Gibson, K. E., Ricke, S. C., Crandall, P., Jaroni, D., & Berrang, M. (2013). *Salmonella* and *Campylobacter* prevalence and concentration on pasture-raised broilers processed on-farm, in a Mobile Processing Unit, and at small USDA-inspected facilities. *Food Control*, 34 (1), 177-182.

TÜİK. Türkiye İstatistik Kurumu. https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kumes-Hayvanciligi-Uretimi-Aralik-2022 49417#:~:text=Bir%20%C3%B6nceki%20ay%20200%20bin,201%20bin%2012 3%20ton%20oldu.&text=Bir%20%C3%B6nceki%20ay%201%20milyar,milyon %20979%20bin%20adet%20oldu. (14.02.2023)

Türkoğlu, M., Arda, M., Yetişir, R., Sarıca, M., Altan, A., & Erensayın, C. (2004). *Tavukçuluk Bilimi (Yetiştirme ve Hastalıklar)*. Ankara: Bey-Ofset Matbaacılık Ltd. Şti.

USDA-FSIS (2015). Food Safety and InspecSion Service. Changes to *Salmonella* and *Campylobacter* verification testing program proposed performance standards for *Salmonella* and *Campylobacter* in not-readyto-eat comminuted chicken and turkey products and raw chicken parts abd related agency sampling. *Federal Register* 80,3940-3950.

Ünlü, A. (2011). *Tavuklarda Salmonella Tanısında Kültür ve Real Time PCR'ın Kullanımı* [Yayınlanmış doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. Erişim adresi: https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12575/35802).

Vugia, D. J, Samuel, M., Farley, M. M., Marcus, R., Shiferaw, B., Shallow, S., ... Frederick J.A. (2004). Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 38, (Suppl 3), 149–156.

Waghamare, R. N., Paturkar, A. M., Vaidya, V. M., Zende, R. J., & Ingole, S. D. (2019). Quantifyng the *Salmonella* spp. at critical stages of poultry processing by miniature MNP techniques (mMNP). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7 (2), 1089-1093.

Wang, J., Wu, H., Song, M., Li, F., Zhu, J., Xi, M., ... & Cui, S. (2013). Prevalence and quantitative detection of *Salmonella* in retail raw chicken in Shaanxi, China. *Journal of Food Protection*, 76 (11), 1958-1962.

Wang, X. L. & Slavik, M. F. (1999). Rapid detection of *Salmonella* in chicken washes by immunomagnetic separation and flow cytometry. *Journal of Food Protection*, 62, 717–723. doi: 10.4315/0362-028X-62.7.717.

Waturangi, D. E., Wiratama, E., & Theresia, A. S. (2019). Prevalence and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* from ice and beverages in Jakarta, Indonesia. *BMC Research Notes*, 12 (1), 1-6.

White, P. B. (1925). Med. Res. Council, Gt. Brit. Spec. Rep. Ser. no. 91.

White, P. L., Naugle, A. L., Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Rose, B. E, Pritchard, K. M. … Buchanan, S. (2007). *Salmonella* Enteritidis in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by the US food safety and inspection service, 1998 through 2003. *Journal of Food Protection*, 70 (3), 582–591.

WHO (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015. GENEVA, Switzerland.

WHO/FAO (2012). Risk Assesments of *Salmonella* in Eggs and Broiler Chickens. Microbial Risk Assesments series 2. ISSN: 1726 5274. Geneva, Switzerland. (2012, 2 Eylül). Erişim adresi: https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1354245/retrieve

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531-6535.

Yamatogi, R. S., Oliveira, H. C., Possebon, F. S., Pantoja, J. C. F., Joaquim, J. G. F., Pinto, J. P. A. N., & Araujo Jr, J. P. (2016). Qualitative and quantitative determination and resistance patterns of *Salmonella* from poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, 79 (6), 950-955.

Yang, X., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Yang, S., Wang, J., ... & Wei, X. (2022). Occurrence, serovars and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in retail ready-to-eat food products in some Chinese provinces. *LWT Food Science and Technology*, 154, 112699.

Yang, X., Huang, J., Zhang, Y., Liu, S., Chen, L., Xiao, C., ... & Wu, Q. (2020). Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. *Science of the Total Environment*, 713, 136385.

Yang, X., Wu, Q., Zhang, J., Huang, J., Chen, L., Wu, S., ... Wei, X. (2019). Prevalence, bacterial load, and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from retail meat and meat products in China. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-9.

Zappelini, L., Martone-Rocha, S., Dropa, M., Matté, M. H., Tiba, M. R., Breternitz, B. S., Razzolini, M. T. P. (2017). Effective characterization of *Salmonella Enteritidis* by most probable number (MPN) followed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) methods. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (5), 4828-4834.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

µl: Mikrolitre
µm: Mikrometre
AB: Avrupa Birliği
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
ABI: Applied Biosystems
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
AOAC: Resmi Analitik Kimyagerler Birliği
API: Application Programming Interface
a_w: Su aktivitesi
BHIB: Brain Heart Infusion Broth
BPW: Bufferd Peptone Water-Tamponlanmış Peptonlu Su
BSA: Brilliance Salmonella Agar
BS: Bismuth-Sulfite Agar
Cat: Kategori
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CFU: Colony Forming Unit
ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA: European Food Safety Authority
Eh: Oksidasyon-Redüksiyon Potansiyeli
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Essay
EMS: En Muhtemel Sayı
FAO: Food and Agricultural Organization
FDA-BAM: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual
FERN: Food Emergency Response Network
FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi
g: Gram
GKGM: Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü
HACCP: Hazard Analysis And Critical Control Point
INF: Infinity
ISO: International Organization for Standardization
kal: Kalori
KCN: Potasyum siyanür
Kob: Koloni Oluşturan Birim
LIA: Lysine Iron Agar
log: Logaritma
LPS: Lipopolisakkarit
MCA: MacConkey Agar
mEMS: Minyatürleştirilmiş En Muhtemel Sayı
mg: Miligram
MKTTn: Muller-Kauffmann Tetrahionate-Novobiocin
ml: Mililitre
MLST: Multi Locus Sekans Tiplendirmesi
mm: Milimetre
MPN: Most Probable Number
MSSRVA: Modified Semi Solid Rappaport Vassiliadis Agar
mV: Mili volt

NA: Nutrient Agar
ng: Nanogram
NTS: Non Typhoidal *Salmonella*
ONPG: Onitrophenyl- Beta-D-galaktopyranoside
OXD: Oksidasyon
PCR: Polimerase Chain Reaction
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophorezis
pH: Power of Hydrogen
qPCR: Quantitative PCR
RAPD: Randomly amplified polimorphic DNA
rPCR: Real time PCR
rpm: Dakikadaki devir sayısı
rRNA: Ribozomal RNA
RTE: Ready To Eat-yemeğe hazır yiyecek
RV: Rappaport Vassiliadis
SE: *Salmonella* enteritidis
Ser: Serotip
SÖ: Soğutma Öncesi
SPI: Salmonella Pathogenicity Island
SS: Salmonella-Shigella Agar
SS: Soğutma Sonrası
ST: *Salmonella* Typhimurium
Subs: Subspecies
TGK: Türk Gıda Kodeksi
TSIA: Triple Sugar Iron Agar
TT: Tetrathionate
TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu
USDA-FSIS: United States Department of Agriculture Food Safety Inspection Service
WHO: World Health Organization
XLDA: Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar
XLT4: Xylose-Lysine-Tergitol-4
yy: Yüzyıl

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezimin yazım aşamalarında sonsuz bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan kaçınmayan, her adımda desteklerini esirgemeden özveri ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Seran TEMELLİ'ye başta olmak üzere, danışman hocam ile birlikte çalışmalarımda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Ayşegül EYİGÖR hocama, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan arkadaşlarım A. Gökhan COŞKUN ve İrem UĞUR'a, Anabilim Dal'ımızın saygıdeğer hocalarına, tez çalışmamın finansman desteğini sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, Doktora Eğitim hayatımda desteğini esirgemeden, gösterdikleri ilgi ve verdikleri manevi güç için eşim Doç. Dr. İsmail DEMİRCİOĞLU'na ve annem Zuhal ERTEKİN, babam Mehmet ERTEKİN, kardeşlerim Bekir ERTEKİN ve Gülçin Tuba ERTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül DEMİRCİOĞLU

9. ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül DEMİRCİOĞLU, ilk, orta ve lise eğitimini Şanlıurfa'da tamamladıktan sonra, lisans eğitimini 2011-2017 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamlamıştır. 2017 yılında Veteriner Hekim olarak mezun olmuştur. Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda 2018 yılında Doktora Eğitimi'ne başlamış olan Ayşegül DEMİRCİOĞLU evli ve iki çocuk annesidir.