

Salmonella İzolasyonu ve Tanımlanması¹

Betül Vazgeçer², Ayhan Temiz³

Genel Bilgiler

Salmonella, Enterobacteriaceae içinde yer alan fakültatif anaerob, Gram negatif, çubuk şekilli, *Salmonella pullorum* ve *Salmonella gallinarum* haricinde hepsi peritriş flajellaya sahip patojen bir bakteridir (1, 2). Optimum üreme sıcaklıkları 35-37 °C 'dir, karbohidratlardan asit veya gaz oluştururlar, sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanırlar, H₂S üretirler, lizin ve ornithini kadaverin ve putresine dekarboksile ederler, oksidaz negatif, katalaz pozitifler, laktoz, sukroz ve üreyi metabolize edemezler. Bazı atipik *Salmonella* biyotipleri ise lizini dekarboksile edemezken, laktoz, sukroz ve üreyi kullanabilirler. Kauffmann 1966 yılında biyokimyasal özellikler, DNA homolojisi ve enzim elektroforezi gibi bazı yöntemlere dayanarak *Salmonella* 'ları taksonomik olarak 4 gruba ayırmıştır. Ewing 1972 yılında 15 adet substratın farklı kullanımı ve H₂S oluşumuna göre yeni bir taksonomik şema çıkararak *Salmonella* 'ları *Salmonella typhi* (tek serovar), *Salmonella choleraesuis* (tek serovar) ve *Salmonella enteritidis* (diğer serovarlar) olarak üç tür altında toplamıştır. *S. choleraesuis* bu taksonomik şemada alt tür olarak spp *choleraesuis*, *salamae*, *arizona*, *diarizona*, *houtenae*, *bongori* ve *indica* şeklinde 7 alt gruba ayrılmıştır. Ewing tarafından 1972'de *arizona*, farklı bir cins olarak tanımlanmış ve *Salmonella* 'dan ayrılmıştır. Crosa ve ark. 1973 yılında DNA hibridizasyonu ile *Salmonella* 'nın 4 alt grubu ile *arizona* 'nın birbirine çok yakın olduklarını ortaya koymuştur (3). Daha sonra diğer bir çalışmada 5. grup ayrıca tanımlanmış ve *Salmonella* cinsi 1984 yılında alt cins olarak 5 alt gruba ayrılmıştır (4). Buna göre de *Salmonella* cinsi alt cins I: dulsitolü kullananlar, alt cins II: dulsitol ve malonatı kullananlar, alt cins III: malonat ve o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)'yi kullananlar, alt cins IV: KCN'de gelişenler ve alt cins V: dulsitol ve malonatı kullanmayıp, ONPG'yi parçalayan ve KCN'de gelişenler olarak ayrılmıştır. *Salmonella enterica* 1987 yılında 7 alt türü içeren tek tür olarak tanımlanmış, alt tür *choleraesuis* 'in ismi alt tür *enterica* olarak, *S. choleraesuis* 'in ismi ise *S. enterica* olarak değiştirilmiştir. Alt tür *bongori* 1989 yılında enzim

¹ Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Prof. Dr. Ayhan Temiz danışmanlığı altında Betül Vazgeçer tarafından gerçekleştirilen ve 2004 yılında tamamlanan "Broilerlerden Klasik Kültürel Yöntemlerle *Salmonella* İzolasyonunda Çeşitli Yöntem Modifikasyonlarının Denenmesi" adlı Doktora tezinin literatür özeti bölümüdür.

² Dr., Şimdiki adres: Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıda Kontrol Hiz. Dai. Bşk., Şehit Cem Ersever Cad. No: 11, Yenimahalle Ankara.

³ Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Beytepe Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: temiz@hacettepe.edu.tr

elektroforezindeki farklılıklara dayanılarak tür olarak değerlendirilmiştir. Böylece de *Salmonella* cinsi 6 adet alt tür (subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) içeren *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki türe ayrılmıştır.

Yaptığı Hastalıklar ve Serotipleri

Salmonella cinsinde 2422'nin üzerinde serotip bulunmaktadır (5- 9). *S. bongori*, insan hastalıkları ile ilgili değilken *S. enterica*, bağırsak enfeksiyonlarına veya ciddi sistemik hastalıklara (tifo) neden olan pek çok serotipi içermektedir (10).

İnsanlarda görülen salmonellozis iki adet klinik özellik gösterir. Birincisi *S. typhi* ve *S. paratyphi* A, B, C 'nin neden olduğu enterik ateştir. Bu enfeksiyonlar genellikle hayvanlara gerek kalmadan kişiden kişiye bulaşır. İkincisi tifoya neden olmayan salmonellozistir ve hayvanlarda bulunan diğer *Salmonella* serotiplerinin neden olduğu potansiyel zoonozdurlar (11). Tifoya neden olmayan *Salmonella* hayvanlarda ve insanlarda hastalıklara neden olur. Hayvanlar başlıca kaynaktır ve kişiden kişiye de yayılmasına rağmen hastalık genellikle gıda kaynaklıdır. Tifo ateşine ve diğer enterik ateşlere neden olan *Salmonella* ise dışkı ve ağız yoluyla kişiden kişiye bulaşır. Bu hastalık hayvansal kaynaklı olmayıp bu hastalığı asemptomatik insan taşıyıcıları yayar (12).

S. enterica subspecies *enterica* ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*), *S. Enteritidis*, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* A, B, C'nin insanlarda salmonellae enfeksiyonlarına neden olan serotiplerin % 99'unu oluşturduğu belirtilmektedir (13, 10, 14). Kanada'da 1983-1986 yılları arasında kesimhanelerdeki domuz (% 17,5), sığır (% 2,6), dana (% 4,1), hindi (% 69,1) ve tavuk (% 60,9) karkaslarından *Salmonella* izole edilmesini amaçlayan bir çalışmada; tavuklardan izole edilen serotipler arasında yıllar içerisinde en fazla artışı *S. infantis* 'in gösterdiği bulunmuştur (15). Broiler karkaslarında *S. typhimurium* (16), İrlanda'da 74 adet et ve 106 adet tavuk örneğinde *S. bredeney* (% 48,4), *S. kentucky* (% 35,5) ve *S. enteritidis* (% 6,5) (17), Meksika'da yapılan bir çalışmada kasaptan ve manavdan alınan örneklerde *S. derby* (% 26), *S. anatum* (% 14), *S. infantis* (% 14), *S. typhimurium* (% 12) ve *S. brandenburg* (% 6) (18), paketlenmiş 140 adet broiler örneğinde ise *S. Hadar*, *S. Enteritidis* ve *S. Indian* (19) en çok izole edilen *Salmonella* tür ve serotipleri olarak belirlenmişlerdir.

Hindistan, kuzey-doğu Asya, kuzey ve orta Amerika ve Afrika'da *S. wien*, *S. typhimurium*, *S. johannesburg* ve *S. oranienburg*, İngiltere, Avrupa ve Amerika'da ise *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. virchow* ve *S. hadar* salgına sebep olan önemli serotipler olarak belirlenmiştir. Özellikle *S. virchow* ve *S. enteritidis* tavuk ve ürünlerinden, *S. hadar* hindi, *S. typhimurium* ise sığır, domuz, tavuk özellikle de koyunlardan izole edilmişlerdir (20, 21).

Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları ve gastroenteritislerin yurtdışında halen daha büyük bir dikkatle takip edildiği, değerlendirildiği ve rapor edildiği görülmektedir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İngiltere, Belçika, Fransa ve Kanada'da yapılan çalışmalar, gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları ve gastroenteritis vakalarının son yıllarda artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Broilerler ise enfeksiyon ve gastroenteritise neden olan önemli bir *Salmonella* kaynağı olarak dikkat çekmektedirler (22- 34).

Ülkemizde ise gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve zehirlenmeler ile ilgili veriler sağlıklı bir şekilde toplanıp istatistiksel olarak değerlendirilmediği için bu konuda kesin bir sonuca varılamamaktadır.

Ev dışında daha fazla yemek yeme alışkanlığı gibi yaşam tarzındaki değişiklikler patojen bakterilerin gıdalarla bulaşma riskini de arttırmaktadır. *Salmonella* 'ların yanı sıra son yıllarda *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Aeromonas* türleri ve *Plesiomonas* türleri gibi diğer bazı patojenler de dikkat çekmekte ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bunun ötesinde spesifik türlere ait bazı suşların (yumurtada *S. Enteritidis* gibi) spesifik gıdalarla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (22, 25, 35, 36).

Her yıl milyonlarca insan gıda kaynaklı hastalıklardan etkilenmektedirler. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) tarafından 1997 yılında yayınlanan verilere göre 3974 campylobacteriosis, 2205 salmonellozis, 1273 shigellosis, 139 yersiniozis, 77 listeriozis ve 51 vibrio vakası rapor edilmiştir. Bu vakaların bazılarında mevsimsel artışlar olduğu belirtilmektedir. *E. coli* O157:H7 'nin neden olduğu vakaların % 52'sinin, campylobacteriosis'in % 35'inin, salmonellozis'in ise % 32'sinin yaz aylarında (haziran-ağustos) ortaya çıktığı belirlenmiştir (37).

İzolasyonu ve Tanımlanması

Gıda kaynaklı patojenik ve toksijenik mikroorganizmalar ile bunların insanda neden olduğu enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar konusunda sağlıklı veriler toplanmasının ilk aşamasını, bu mikroorganizmaların gıdalardan veya insan örneklerinden izolasyonu ve tanımlanması oluşturur. Bu bakımdan şüpheli örneklerden etken olan mikroorganizmanın izolasyonu ve tanımlanması amacıyla yararlanılan yöntemler üzerinde titizlikle durulması ve bu yöntemlerin ihtiyaçlara göre sürekli yenilenmesi ve iyileştirilmesi yönünde çabalar sarf edilmesi gerekli görülmektedir.

Gıdalarda *Salmonella* belirlenmesi; günümüzde temelde klinik örnekler için başvuru kültür yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir. Ancak gıdalardaki *Salmonella* 'ların belirlenmesinde klinik örneklerdekine göre daha büyük güçlüklerle karşılaşılabilir. Çünkü kontamine olmuş gıdalarda bulunan patojenlerin miktarları genellikle klinik örneklerdekine göre daha azdır. Buna karşılık yasal olarak gıdalarda *Salmonella* 'nın 25 g örnekte hiç bulunmaması zorunluluğu vardır (38). Gıdalarda 1 hücre/25 g (mL) *Salmonella* bulunabilir. Bunun da ötesinde bir çok mikroorganizma uygulanan teknoloji veya muhafaza yöntemi gereği hasara uğrayabilmektedir. Bu tür gıdalarda hasara uğramış düşük miktardaki *Salmonella* 'yı belirlemek ise oldukça güçtür. Hasar görmüş mikroorganizmaya selektif kültürel zenginleştirme ve izolasyon işlemleri uygulanması gerekli görülmektedir. Diğer taraftan; yumurta albumini, kakao ve baharat gibi kimi gıdalar *Salmonella* belirlenmesini güçleştiren özelliklere sahiptirler. Bu nedenle bu tip gıdalar için kültürel yöntemlerin uygulanmasında bazı işlem modifikasyonlarının yapılması zorunlu hale gelmiştir (1, 39- 44).

Genel olarak; patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla kullanılan analiz yöntemlerinin bazı temel niteliklere sahip olması istenir. Bunlar; analizlerin kısa sürede tamamlanması (zaman faktörü), ucuz olması (maliyet faktörü), spesifik olması

(duyarlılık faktörü), doğru sonuç vermesi (doğruluk faktörü), kolay uygulanabilir olması, kalifiye eleman ve alet-ekipman gereksiniminin fazla olmaması şeklinde sıralanabilir.

Kültürel yöntemlerin en önemli dezavantajı; sonuçlandırılması için oldukça uzun bir süreye gereksinim duyulmasıdır. *Salmonella* 'nın belirlenmesindeki klasik kültürel yöntemler genellikle önzenginleştirme (16-20 saat), selektif zenginleştirme (24-48 saat), selektif katı besiyerlerinde izolasyon (24-48 saat), biyokimyasal tanımlama ve şüpheli kolonilerin serolojik doğrulanması (48-72 saat) basamaklarından oluşur. Bu nedenle gıdalardan klasik kültürel yöntemlerle *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanması için en az 5-7 güne ihtiyaç vardır (45). Sonuçların bu kadar uzun sürede alınması gıdanın mikrobiyolojik kalitesi ve tüketime uygun olup olmadığı hakkında karar verilmesini geciktirmekte bu da çoğu zaman gıdanın kesin belirleme yapılmaksızın tüketime sunulmasına neden olmaktadır. Bu durum gıdanın işleme ve depolanmasında ekstra harcamalar, ithalat ve ihracatta karşılaşılan güçlüklerden dolayı hem ekonomik hem de tüketici sağlığı açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bütün bunlara bağlı olarak da gıdalarda *Salmonella* belirlenmesi için hızlı yöntemler geliştirme çabalarının arttığı gözlenmektedir (39, 46- 51).

Günümüzde gıdalardan *Salmonella* 'nın izolasyonu ve tanımlanması için; klasik kültürel, immünolojik, iletkenlik, empedans, DNA-DNA hibridizasyon ve DNA ampifikasyon gibi farklı analiz yöntemlerinden yararlanılabilmektedir. İmmunomagnetik ayırma (IMA), enzime bağlı antikor-hidrofobik grid membran filtre (enzyme linked antibody hydrophobic grid membrane filter) ve IMA-PZR gibi kompleks metotlar da kullanılmaktadır (52-59).

Günümüzde, bir takım üstünlükleri göz önünde bulundurularak klasik kültürel yöntemler halen daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak buna karşılık, *Salmonella* 'ların gıdalardan izolasyonu ve tanımlanmasında yararlanılan klasik kültürel yöntemlerin uygulanması ile gerçek ve doğru sonuçlar alınmasında bazı güçlükler ve olumsuzluklarla da karşılaşılmaktadır. Klasik kültürel yöntemlerin en önemli dezavantajı, daha önce de değinildiği gibi sonuçların çok uzun sürede alınmasıdır. Klasik kültürel yöntemlerde izolasyon kompleks ve zaman alıcı önzenginleştirme ve selektif zenginleştirme işlemlerini içerir. Bu amaçla kullanılan kültür besiyerlerinin kompozisyonu ve kalitesi bu işlemi etkileyen önemli faktörlerden birisidir. İncelenen gıda çok düşük sayıda *Salmonella* içerebilir. Besiyerleri ve kullanıldığı yöntemler gıdalarda düşük sayıda bulunan *Salmonella* hücrelerini inhibe etmeyecek nitelikte olmalıdır.

Klasik kültürel yöntemlerle *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanması uzun sürmesine rağmen diğer yöntemlerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre bugün için kullanımı tercih edilen birçok avantaja sahiptir (45, 60- 65). Dondurma ve yağsız süt tozundan *Salmonella* izolasyonu için 4 hızlı yöntemin klasik kültürel yöntemle karşılaştırıldığı çalışmada; düşük düzeylerdeki (<10 kob/25 g) kontaminasyonda klasik kültürel yöntemin diğer yöntemlere göre daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır (65).

Gıdalar protein, karbohidrat, bitkisel ve hayvansal yağlar, katkı maddeleri gibi birçok kimyasal madde ve birtakım komponentleri içeren kompleks bir kompozisyona sahiptirler. Bunların bazıları mikroorganizmaların canlılıklarını olumsuz yönde

etkileyebilir. Buna ek olarak; gıdalarda mikrofloranın zengin olması gıdayı daha da kompleks hale getirmektedir. Gıdalardaki doğal mikroflora genellikle önemli bir sağlık problemine neden olmaz. Ancak bu floranın çeşitliliği ve rekabetçi olma özelliği, spesifik bakterilerin klasik kültürel yöntemlerdeki selektif izolasyonlarını ve dolayısıyla da tanımlanmalarını zorlaştırır (66, 67).

Genel olarak; hızlı testlerde uygulama kolaylığı, spesifiklik ve duyarlılık önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Bunların en önemli avantajı ise zaman kazandırmalarıdır. Bu yöntemler önemli bazı avantajlara sahip olmasına karşılık her birinin bazı dezavantajları da vardır. Kültürel yöntemlerle bir gıda maddesi için bir kaç çeşit selektif besiyeri kullanılarak gıdadaki bütün patojenler test edilebilir. Ancak hızlı yöntemlerin çoğu tek bir patojeni hedefler. Buna göre de; tek bir gıda örneği için birden fazla hızlı test kiti kullanılması gerekecek ve sonuçta da hızlı analizler oldukça pahalıya mal olacaklardır. Hızlı yöntemlerin uygulanmasında ayrıca genel olarak başlangıç yatırımları yüksek alet-ekipmana da gereksinim duyulmaktadır. Bu alet-ekipmanı kullanacak eğitimli personelin istihdam edilmesi de düşünülecek olursa maliyet daha da artmaktadır.

Hızlı Sistemler

Gıdalarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi için piyasada en az 15-20 adet ticari hızlı test sistemi bulunmaktadır. Bu testlerin değişik gıda örneklerindeki performansları ise oldukça farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca kabul gören hızlı testlerde sadece negatif sonuçlar kesindir. Pozitif olduğu tahmin edilen sonuçların ise standart yöntemlerle mutlaka doğrulanması gerekmektedir. Bütün bunların yanı sıra hızlı yöntemlerin başlangıç aşamasında çoğunlukla bir kültürel zenginleştirme aşamasına ihtiyaç duyması diğer bir dezavantaj olarak kabul edilmektedir (25, 68, 69).

Hızlı yöntemlerle gıdalardan *Salmonella* izolasyonunda kullanılan önzenginleştirme besiyeri ve bu aşama için gerekli olan süre yöntemin belirleme limitini etkilemektedir. Bakteri içeriği yüksek olan gıdalarla çalışılırken önzenginleştirme ve zenginleştirme işlemlerinin yapılması yöntemin duyarlılığını arttırmaktadır (70). Hızlı yöntemlerin ortamda ancak yüksek sayıda hücre olması halinde belirleme yapabilmeleri ve bu açıdan da klasik kültürel yöntemlere bağlı olmaları ve düşük sayıda *Salmonella* bulunan örneklerde yanlış negatif sonuçlar elde edilmesi (71) hızlı yöntemlerin bir dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. Önzenginleştirme yapılmayan dışkı örneklerinde PZR ile belirleme limiti 10^5 /g iken, Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) besiyerinde 18 saat önzenginleştirme yapılan örneklerde belirleme limiti ise 10^2 /g olarak bulunmuştur (72). IMA yöntemi antikor ile kaplanmış magnetize olabilir taşıyıcıların (IMP) heterojen hücre süspansiyonundaki spesifik hücreleri yakalamaları ilkesine dayanmaktadır. Süspansiyondan hedef hücrelerin ayrılması yüksek güçteki magnetik alan ile sağlanmaktadır. Bu yöntemde; IMP'in optimum konsantrasyonunun belirlendiği çalışmalarda; IMP konsantrasyonu 10^5 - 10^7 partikül/mL bakteri süspansiyonu kullanılmış ve en yüksek geri kazanımın 10^7 IMP/mL'de sağlandığı belirlenmiştir (73, 74). Aynı şekilde DNA hibridizasyon (DNAH) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile *Salmonella* için ortamda en az 10^7 /mL (75), DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile ortamda 10^8 /mL (76), fluorescent antibody (FA)-microcolony yöntemi ile ortamda 10^5 - 10^6 /mL (77) ve enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) yöntemi ile ortamda 10^4 - 10^7 /mL (70) *Salmonella* 'nın belirlenebildiği bulunmuştur.

Diğer taraftan, *Enterobacter agglomerans*, *A. hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* (74), *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter* (75), *Cit. freundii* ve *Pseudomonas* spp.'nin (78) kullanılan hızlı yöntemlerde yanlış-pozitif sonuç verdikleri belirlenmiştir.

IMA yöntemi kullanılarak *Salmonella* izolasyonunda zenginleştirme besiyeri olarak Selenite Cystine (SC) broth besiyeri yerine Rappaport-Vassiliadis (RV) broth besiyeri kullanımı daha iyi sonuç verirken selektif katı besiyeri olarak da en az iki adet besiyerinin kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (79). Bir araştırmada DNAH yöntemi ve EIA yöntemi kullanılarak toplam 294 adet *Salmonella* ve 100 adet *Salmonella* olmayan Enterobacteriaceae izolatu test edilmiştir. DNAH için önzenginleştirme GN broth besiyerinde yapılırken EIA yönteminde M broth besiyeri kullanılmıştır. M broth besiyeri; EIA yönteminde kullanılan antikorlar ile reaksiyona giren kimi hareket proteinlerinin üretimini teşvik eden spesifik bir besiyeridir. Bu nedenle EIA yönteminde *S. gallinarum*, *S. pullorum* ve 5 adet hareketsiz serotipin daha belirlenemediği tespit edilmiştir (75). Diğer araştırmalarda ise; yeni geliştirilmiş olan FA-microcolony *Salmonella* belirleme yöntemi; filtrasyonda daha iyi filtrelerin kullanılması, 4 saat önzenginleştirme yapılması, yanlış floresansı engellemek için gıdanın seyreltilmesi veya hücre sayısını arttırmak için santrifüj basamağı ilave edilmesi ile yanlış pozitif sonuçlar azaltılarak iyileştirilmeye çalışılmıştır (77, 80).

Salmonella 'ların gıdalardan izolasyonu ve tanımlanması amacıyla geliştirilen hızlı yöntemlerin doğruluk ve spesifikliğini klasik kültürel yöntemlerle karşılaştıran birçok çalışma bulunmaktadır (39, 61, 62, 65, 81- 87).

Bazı üreticiler hammaddelerini ve ürünlerini kullanıp dağıtmadan önce test etmeye ihtiyaç duyarlar. Çok miktarlardaki bu materyalin uzun süreli depolanması oldukça masraflıdır. Bu yüzden eğer özellikle hammaddede kontaminasyon riski varsa problemin kaynağı ve büyüklüğü belirlenmeden önce üretim başlamış olabilir. Açıkça görülüyor ki *Salmonella* 'nın belirlenmesi için hızlı ve pratik yöntemlerin geliştirilmesi endüstriyel açıdan da faydalı olacaktır.

Yıllar içinde hızlı yöntemlerin duyarlılık ve spesifikliği artırılarak kullanımları daha yaygın hale gelmektedir.

Diğer taraftan gıda analizlerinde hızlı yöntemlerin uygulamaya konulmasında genel bir isteksizlik bulunmaktadır (81, 88). Bunun belki de en önemli nedeni Association of Official Analytical Chemists (AOAC) tarafından ancak sınırlı sayıdaki hızlı testin onaylanmış olmasıdır.

Hızlı yöntemler sahip oldukları dezavantajlar da dikkate alınarak ilgili resmi kurumlar tarafından hemen kabul edilip uygulamaya konulmamaktadır. Bunun doğal sonucu olarak da gıdalarda patojen mikroorganizmaların izolasyon ve tanımlanmasında büyük ölçüde kültürel yöntemlerden yararlanılmaktadır. Sonuç olarak; kültürel yöntemlerden hızlı yöntemlere geçiş bu konuda yapılacak çalışma sonuçları da göz önünde bulundurularak ancak kademeli olarak gerçekleşebilecektir.

Klasik Yöntemler

Bütün bunlara karşılık, daha önce de değinildiği gibi gıdalardan *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanmasında günümüzde pek çok ülkede hala klasik kültürel yöntemlere başvurulmaktadır. Ülkemizde de bu amaçla klasik kültürel yöntemlerden yararlanılmaktadır. Türk Standartları Enstitüsü'nün TS 7438 nolu "*Salmonella* Aranması Metotlarında Genel Kurallar" standardında da klasik kültürel yöntem tarif edilmektedir. Bu standart yöntem International Standard Organization (ISO) 6579'da tarif edilen yöntemi temel almaktadır (38).

Salmonella 'ların gıdalardan izolasyonu ve tanımlanmasında yararlanılan klasik kültürel yöntemlerin uygulanması ve bu yöntemlerle gerçek ve doğru sonuçlar alınmasında bazı güçlükler ve olumsuzluklarla karşılaşılabilir. Bunlar klasik kültürel yöntemlerdeki işlem aşamaları dikkate alınarak aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

Önzenginleştirme aşaması

Klasik kültürel yöntemlerle gıdalardan *Salmonella* izolasyonu kompleks ve zaman alıcı önzenginleştirme ve selektif zenginleştirme işlemlerini içerir. Bu amaçla kullanılan kültür besiyerlerinin kompozisyonu ve kalitesi bu işlemi etkileyen önemli faktörlerden birisidir. İncelenen gıda çok düşük sayıda *Salmonella* içerebilir. Bu nedenle de besiyerleri ve kullanıldığı yöntemler gıdalarda düşük sayıda bulunan *Salmonella* hücrelerini inhibe etmeyecek niteliğe sahip olmalıdır. Diğer taraftan söz konusu gıdada bulunan *Salmonella* hücreleri gıdaya uygulanan dondurma, ısıtma işlemi, koruyucu olarak antimikrobiyal ajanların eklenmesi ve soğukta saklama gibi gıdalardaki patojenleri kontrol altına almayı amaçlayan işlemler sırasında veya gıdanın bileşiminde yer alan doğal bazı inhibitör etkili maddeler nedeniyle tamamen inaktive olabilir ya da hasara uğrayabilirler. Hasar görmüş hücreler aynı gıdada sayıca çok daha fazla olan rekabetçi mikroorganizmalar ile bir arada da bulunabilirler. Hasar görmüş hücrelerin belirlenmesi ise gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır (89). Bu sebeplerden dolayı kültürel işlemler *Salmonella* hücrelerini onaracak ve canlandıracak özellik taşımalı ve ayrıca rekabetçi florayı inhibe edici özelliklere sahip olmalıdır (90).

Genel olarak klasik kültürel yöntemlerde önzenginleştirme amacıyla TPS ve Lactose broth (LB) besiyeri kullanılmaktadır. Ancak çikolata gibi doğal inhibitör etkili gıdalarda hasara uğramış *Salmonella* 'ların izolasyonunda önzenginleştirme besiyerinin içine kazein eklenmesi önerilmektedir. Analiz edilecek gıdada koliform bakteriler gibi laktozu fermente edebilen mikroorganizmaların yüksek sayıda bulunması durumunda, önzenginleştirme besiyeri olarak LB kullanımı hasar görmüş *Salmonella* hücrelerinin izolasyonu için uygun olmamaktadır. Böylesi bir durumda laktozun kullanımına bağlı olarak LB besiyerinde pH'nın düşeceği ve bunun sonucunda da hasar görmüş *Salmonella* hücrelerinin izolasyonunun daha da güçleşeceği belirtilmektedir. Gram-pozitif bakteri sayısının fazla olduğu örneklerde ise önzenginleştirme besiyerinin içine % 0,002 brilliant green veya % 0,01 malaşit yeşili eklenmesinin yararlı olacağı bildirilmektedir (42)

Domuz ve tavuklarda *Salmonella* izolasyonu için önzenginleştirme besiyerinin öneminin araştırıldığı bir çalışmada; TPS ile iki yeni önzenginleştirme besiyeri olan *Salmonella* Enrichment broth (SEB) ve Universal Pre-enrichment broth (UB) karşılaştırılmış ve broiler örnekleri için UB'un TPS'ya göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur. UB hasar görmüş mikroorganizmaları onarmak için sodyum piruvat içermektedir. Bu nedenle de UB'nin TPS'ya göre daha yüksek tamponlama kapasitesine sahip olması bu iki besiyeri arasındaki en önemli fark olarak belirtilmektedir. Diğer taraftan, düşük oranlarda (2-2,5 kob/25 g) *Salmonella* ile kontamine edilen gıdalar için UB besiyerinde 42 °C'de 6 saat inkübe edildiğinde daha iyi sonuçlar alındığı bulunmuştur (91, 92, 93).

Son on yıldır klasik kültürel yöntemlerle *Salmonella* izolasyonunda besiyerlerinin tipi ve kompozisyonu değiştirilerek *Salmonella* spp. belirlenmesi ile ilgili yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu anlamda önzenginleştirme veya zenginleştirme besiyerlerinin bileşimine rekabetçi floranın gelişimini engellemek için belirli bazı inhibitörler eklenebilmektedir. *Salmonella* Enteritidis'in izolasyonunda önzenginleştirmede kullanılan TPS içeriğine amonyum demir(III)-sitrat, ferrioksamine E ve G veya sefsulodin ile novobiyosin kombinasyonunun eklenmesi denenmiştir. Önzenginleştirme ve zenginleştirme besiyerlerine ferrioksamine E ilavesinin gıdalardan *Salmonella* izolasyonunu klasik yöntemlere göre arttırdığı belirlenmiştir (94- 97). TPS içine ferrioksamine E eklenmesi *Salmonella* hareketini arttırarak yarı katı Modified Rappaport-Vassiliadis agar (MRVA) besiyerinde daha iyi sonuç elde edilmesini sağlamaktadır (98).

Aromatik eter yapısında olan novobiyosin DNA sentezini etkileyen, DNA'nın süper sarmal içinde bulunan "gyrase" enzimini inhibe ederek Gram-pozitif bakteriler ile *Proteus* ve *Pseudomonas* 'ın gelişimini baskılamaktadır. Domuz dışkısından *Salmonella* izolasyonunu amaçlayan bir çalışmada TPS besiyerine novobiyosin (22 µg/mL) ilave edilmesinin kültürdeki *Salmonella* sayısını 1,2 log birimi arttırdığı, rekabetçi florayı inhibe eden optimum novobiyosin konsantrasyonun ise 10-20 µg/mL olduğu bulunmuştur (99).

TPS genellikle pek çok gıda için kullanılan önzenginleştirme besiyeridir. Ancak buna karşılık yeni önzenginleştirme besiyerleri geliştirilerek klasik kültürel yöntemlerin uygulama süresi kısaltılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen Lactose Broth Sodium Pyruvate Yeast Extract Brilliant Green (LBPYEBG) besiyerinin klasik LB besiyerine göre daha iyi sonuç verdiği değerlendirilmektedir. LBPYEBG besiyerinde 40 °C 'de 7 saat inkübasyondan sonra direkt selektif katı besiyerlerine ekim yapılmıştır ve *Salmonella* 'nın izolasyonu ve belirlenmesi için 26±2 saatlik bir sürenin yeterli olduğu belirtilmiştir (100).

Broiler ve sosisler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada örnekte bulunan rekabetçi flora üyeleri ve bunların sayısının önemi ortaya konmuştur. Eğer *Salmonella* az sayıda ve inaktif ise veya örnek rekabetçi flora ile yüksek oranda kontamine olmuşsa önzenginleştirme yapmadan direkt zenginleştirme aşamasına geçilmesinin yanlış negatif sonuçlara neden olabileceğine değerlendirilmiştir (4).

Klasik kültürel yöntemlerin iyileştirilmesi amacıyla önzenginleştirme ve zenginleştirme aşamalarındaki inkübasyon sıcaklık ve süreleri üzerinde de durulmaktadır. Gıdalardan klasik kültürel yöntemlerle *Salmonella* izolasyonunda özellikle sürenin

kısaltılması yönünde birçok çalışmanın yapıldığı görülmektedir (98, 101, 102, 103). Ancak genellikle önzenginleştirme basamağında inkübasyon süresinin kısaltılmaması ve örneklerin 16-20 saat inkübe edilmesi önerilmektedir. Önzenginleştirme basamağından sonra selektif zenginleştirme besiyerine aktarılan hücrelerin selektif zenginleştirme besiyerlerinde bulunan genellikle toksik olan maddelere direnç gösterebilmeleri için önzenginleştirmede *Salmonella* sayısının en az 10^5 /mL olması gerekir (98, 104, 105).

Kıyma örneklerinden *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada; önzenginleştirme besiyeri TPS'da 37 °C 'de 24 saat inkübasyondan sonra toplam Enterobacteriaceae sayısının 10^8 /mL üzerinde olduğu, zenginleştirme besiyeri Tetrathionate broth (TTB) 43 °C inkübe edildiğinde laktoz pozitif Enterobacteriaceae sayısı azalırken laktoz negatif Enterobacteriaceae sayısının sabit kaldığı, *Salmonella* pozitif olan örneklerde *Salmonella* sayısının TPS'da 10^3 - 10^7 /mL ve TTB'de ise 10^4 /mL'nin üzerinde olduğu ve tüm denemelerde; selektif katı besiyeri olarak kullanılan Brilliant Green agar (BGA) besiyerinde *Salmonella* sayısının rekabetçi floradan daha fazla olduğu bulunmuştur. *Salmonella* 'nın belirlenmesinde ortamda bulunan rekabetçi floranın yalnızca başlangıçtaki sayısının değil aynı zamanda cins ve türünün de önemli olduğu ve zenginleştirme besiyerinde eğer çok sayıda rekabetçi mikroorganizma varsa bunların sayısı azalmadan *Salmonella* 'nın çoğalmaya başlamadığı belirlenmiştir. TTB'nin inkübasyonunda ilk 24 saatteki baskın floranın Gram-pozitif koklar (*Micrococcus* ve *Streptococcus* spp.) olduğu, bu mikroorganizmaların 48 saat sonunda inhibe oldukları ve daha sonra TTB kültür ortamında Gram-negatif bakterilerden *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia* ve *Salmonella* spp.'nin baskın hale geldiği bulunmuştur. Ortamda 10^3 /mL'den daha az sayıda rekabetçi flora olsa bile BGA besiyeri üzerinde *Salmonella* 'nın belirlenemediği ve negatif olarak değerlendirildiği ifade edilmektedir. Bu nedenle *Salmonella* 'nın önzenginleştirme basamağında ulaştığı sayı kadar zenginleştirme besiyerindeki generasyon süresi de önem taşımaktadır. Bu süre RV besiyerinde 1 saat iken TTB besiyerinde değişken çıkmıştır. TTB besiyerinde gelişen laktoz negatif mikroorganizma sayısının *Salmonella* 'nın belirlenmesini etkilediği belirtilmektedir. Eğer *Enterobacter* ve *Klebsiella* sayısı 10^7 /mL'yi aşarsa *Salmonella* 'nın belirlenmesi hemen hemen imkansız hale gelmektedir. Farklı özellikte koloniler oluşturan laktoz pozitif mikroorganizmaların ortamdaki sayıları artarsa *Salmonella* 'nın belirlenmesini olumsuz olarak etkilerler. Rekabetçi floranın sayısı, tipi ve selektif besiyerinde *Salmonella* ile olan etkileşimi *Salmonella* 'nın belirlenmesini etkileyen faktörlerdir (106).

Bir çalışmada, doğal ve yapay olarak kontamine olmuş kuru gıdalardan *Salmonella* belirlenmesinde selektif zenginleştirme basamağının kısaltılıp kısaltılamayacağı konusu araştırılmıştır. Araştırmacılar bu araştırmayı önzenginleştirme basamağının kritik bir basamak olduğunu ve kısaltılmasının önerilmediğini dikkate alarak gerçekleştirmişlerdir. Araştırmada selektif zenginleştirme besiyeri olarak TTB ve modifiye RV broth besiyerleri kullanılmış ve RV besiyeri 43 °C 'de inkübe edilmiştir. *Salmonella* hücrelerinin zenginleştirme besiyerinde 13-16 saatlik inkübasyon sonunda durgun faza geçtiği bulunmuştur. Araştırmada TTB ve RV broth besiyerinde 16 saatlik inkübasyon sonunda *Salmonella* sayısının 10^5 - 10^6 /mL'ye ulaştığına değinilmiştir. *Salmonella* ile rekabetçi floranın ölüm hızı arasındaki farklılıktan dolayı

inkübasyon süresi uzatıldığında *Salmonella* 'nın geri kazanımının da arttığı belirtilmektedir (107).

Gıdalardan *Salmonella* izole edilen klasik yöntemlerde önzenginleştirme basamağı kaldırılarak direkt zenginleştirme ile bir gün kazanmanın mümkün olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada doğal olarak kontamine olmuş istiridyelerden yararlanılmıştır. Bu çalışmada örneklerden *Salmonella* geri kazanımı önzenginleştirme ve zenginleştirme aşamalarının bir arada kullanıldığı klasik yöntem ile yalnızca zenginleştirme aşamasına yer verilen modifiye yöntem kullanılarak karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Araştırmada farklı inkübasyon koşulları da dikkate alınmıştır. Klasik yöntem; önzenginleştirme besiyeri olan LB (inkübasyon sıcaklığı; 35 °C)'den zenginleştirme besiyerleri olan TT (inkübasyon sıcaklığı; 35 °C, 41 °C ve 43 °C)'ye ve SC (inkübasyon sıcaklığı; 35 °C, 41 °C ve 43 °C)'ye aktarmalar yapma şeklinde gerçekleştirilmiş, modifiye yöntemde ise örnekler direkt olarak TT (inkübasyon sıcaklığı; 35 °C, 41 °C ve 43 °C) ve SC (inkübasyon sıcaklığı; 35 °C, 41 °C ve 43 °C) besiyerlerine aktarılmıştır. SC besiyerinde direkt zenginleştirmenin yapıldığı modifiye yöntemde inkübasyon sıcaklığı arttıkça pozitif örnek sayısının da arttığı görülmüştür (108). Klasik yöntemlerde analiz süresinin kısaltılması amacına yönelik olarak gerçekleştirilen diğer bir araştırmada, önzenginleştirme besiyerinin 24 saatlik inkübasyonunun *Salmonella* belirlemesi yönünden 6 saatlik inkübasyona göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (109, 110).

Önzenginleştirme besiyeri kullanımında inkübasyon süresinin kısaltılması stres veya hasarlı hücrelerin onarımına yetmediği için tavsiye edilmemektedir. Diğer taraftan bir araştırmada Salmosyst broth besiyerinin 6 saatlik inkübasyonda TPS'ya göre daha iyi sonuç verdiği ortaya konmuştur (111).

Selektif zenginleştirme aşaması

Selektif zenginleştirme basamağının amacı; gıdada bulunan diğer rekabetçi mikroorganizmaların üremesini engellerken *Salmonella* popülasyonunu arttırmaktır. Bu amaçla; safra tuzu, tetrathionate, sodum selenite ve brilliant green veya malaşit yeşili gibi inhibitörlerden yararlanılmaktadır. Bu inhibitörler selektif zenginleştirme besiyerlerinin bileşiminde iki veya daha fazla sayıda kombine şekilde yer almaktadır. Bu inhibitörlerin yanı sıra besiyerlerine inhibitör olarak novobiyosin gibi antibiyotikler de eklenebilmektedir. Diğer taraftan inhibitör ajanlarının aktivitesi inkübasyon sıcaklıklarında yapılan modifikasyonlarla da arttırılabilmektedir. Örneğin bu amaçla gerçekleştirilen bazı çalışmalarda 41-43 °C gibi yüksek sıcaklıklardaki inkübasyonların olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (42, 112)

Zenginleştirme basamağı rekabetçi mikroorganizmanın baskılanması ve *Salmonella* izolasyonunun kolaylaştırılması için önemlidir. Bir araştırmada; önzenginleştirme besiyerlerinden inokülasyon miktarı 0.1 mL olan RV besiyerinin inokülasyon miktarları 1 mL olan SC ve TT besiyerlerine göre daha üstün olduğu belirlenmiştir. *Salmonella* kontaminasyon oranının En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi ile belirlendiği bu çalışmada; zenginleştirme besiyerinin 24 saatlik inkübasyonun 6 saatlik inkübasyona göre daha verimli olduğu bulunmuştur. Daha kapsamlı diğer bir araştırmada, çiğ ve yüksek oranda kontamine edilmiş gıdalar ve tavuk yemlerinden *Salmonella* 'nın geri kazanımı için RV besiyerinin etkinliği 18 bağımsız laboratuvar

tarafından test edilmiştir. Bu çalışmada zenginleştirme besiyeri olarak RV (inkübasyon sıcaklığı 42 °C), SC (inkübasyon sıcaklığı 35 °C) ve TT (inkübasyon sıcaklığı 35 °C ve 43 °C) karşılaştırmalı olarak denemeye alınmıştır. Düşük (0,04 kob/g) ve yüksek (0,4 kob/g) oranda *Salmonella* ile kontamine edilen çeşitli gıda örneklerinde RV (inkübasyon sıcaklığı 42 °C) en iyi geri kazanımı sağlamıştır. RV broth AOAC tarafından da kabul edilmiş ve yöntemle dahil edilmiş olan bir zenginleştirme besiyeridir. Tavuk örneklerinde *Salmonella* 'nın belirlendiği bir çalışmada RV broth besiyerinin, rekabetçi florayı daha kuvvetli bir şekilde inhibe ettiğine bağlı olarak SC broth besiyerine göre daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur (98, 113- 125)

Salmonella izolasyonunda kullanılan ticari kitlerle standart yöntemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, saf *Salmonella* kültürleriyle çalışıldığında ticari kitler iyi sonuç verirken, yapay olarak *Salmonella* inoküle edilmiş gıdalardan *Salmonella* 'nın belirlenmesinde Food and Drug Administration (FDA) tarafından önerilen klasik yöntemin daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Hızlı yöntemlerle klasik yöntemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise; *Salmonella* 'nın geri kazanımı bakımından RV broth'un 1 mL inokülasyon, 43 °C ve 6 saat inkübasyon koşullarında en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca 6-8 saat ile 24 saat inkübasyon koşulları arasında geri kazanım bakımından bir fark bulunamamıştır (60, 61, 62, 64, 65, 116).

Kıyma ile gerçekleştirilen bir çalışmada, az sayıda *Salmonella* ve yüksek oranda da diğer mikrobiyal kontaminantları içeren örneklerde önzenginleştirme besiyerlerinin inkübasyondan sonra 1:100 veya 1:1000 oranında seyreltilip zenginleştirme besiyerlerine ve bunu takiben de selektif katı besiyerlerine ekim yapılarak *Salmonella* 'nın daha verimli olarak izole edildiği bulunmuştur. Aynı şekilde, önzenginleştirme besiyerinden (TPS) zenginleştirme besiyerine 1 mL yerine bir öze dolusu inokülüm transferinin daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (126).

İzolasyon aşaması

Gıdalardan *Salmonella* izolasyonu amacıyla selektif katı besiyerlerinde brilliant green ve safra tuzları gibi selektivite ajanlarından yararlanılmaktadır. Bu besiyerlerinde sadece *Salmonella* türleri ve serotipleri değil, gelişimi önzenginleştirme ve zenginleştirme basamaklarında önlenememiş rekabetçi flora da gelişmeyi başarabilmektedir. Rekabetçi flora gelişiminin önzenginleştirme ve zenginleştirme basamaklarında inhibe edilmesi *Salmonella* izolasyonu açısından çok büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle, önzenginleştirme ve zenginleştirme besiyerlerinin bileşimleri ortamda varlığı tahmin edilen rekabetçi mikroorganizmaları inhibe edecek şekilde oluşturulmalıdır (42).

Koyun ve tavuk etlerinden *Salmonella* izolasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada; *Salmonella* 'nın geri kazanımının, yalnızca uygulanan yöntem veya inoküle edilen serotipe değil rekabetçi flora ve örnekte bulunan *Salmonella* sayısına bağlı olduğu da bulunmuştur. Buna göre de; izolasyona selektiflik kazandırmanın yalnızca kullanılan besiyerine veya inkübasyon koşullarına bağlı olmadığı, gıda örneği ve örnekteki mikrofloranın da sonucu oldukça etkilediği belirtilmektedir (101, 102).

Klasik yöntemlerle gıdalardan *Salmonella* izolasyonunda kullanılan ve bileşiminde brilliant green ve safra tuzları gibi selektivite ajanları bulunan selektif katı besiyerlerinin bileşimine selektiviteyi artırmak ve rekabetçi flora üyelerinin gelişimini engellemek amacıyla diğer bazı inhibitörler de eklenebilmektedir. Diğer taraftan, izolasyon aşamasında selektiviteyi sağlamak amacıyla inkübasyon koşullarında bazı modifikasyonların denendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Selektif katı besiyerlerinin bileşimine nitrofurantoin (% 0,0015), tergitol-4 veya novobiyosin (12,5-15 mg/L) gibi selektivite ajanlarının eklenmesi ve bu besiyerlerinin 42 °C 'de inkübasyonunun; *E. cloacae* ve *Cit. freundii* gibi *Salmonella* izolasyonunda yanlış pozitif sonuçlar veren Enterobacteriaceae familyasına ait diğer bakterilerin inhibisyonuna yardım ettiği bildirilmektedir. Selektif katı besiyerlerinde gelişen *Enterobacter taylorae*, *E. agglomerans*, *Cit. freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus*, *Morganella* ve *Shigella* gibi diğer mikroorganizmaların tipik *Salmonella* kolonilerinin doğrulanması sırasında zorluk çıkardıkları da bilinmektedir (11, 69, 85, 94, 98, 103, 127- 132).

Klasik yöntemlerde tek bir selektif katı besiyeri kullanımının gıdada bulunabilecek *Salmonella* 'nın belirlenmesi için yeterli olamayacağı dikkate alınarak bu aşama için birden fazla besiyerinin kullanımı önerilmektedir. *Salmonella* 'nın belirlenmesinde MSRV agar (133, 134), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar (135) gibi besiyerlerinin içerisine selektivite ajanı olarak nitrofurantoin, propilen glolikol, glukuronat, gliserin ve tergitol-4 eklenmesinin oldukça iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir. Bir araştırmada Brilliant Green Sulpha (BGS) agar, Bismuth Sulphite (BS) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, XLD agar, EF-18 agar ve Rambach agar (RA) kullanılarak 123 *Salmonella* kültürü ve yapay olarak inoküle edilen 28 gıda örneği *Salmonella* spp. geri kazanımı için test edilmiştir. Sonuçta EF-18 agar birinci ve HE agar ise ikinci en iyi sonucu veren besiyeri olarak bulunmuştur. BS agar ise kullanımı zorunlu besiyeri olarak önerilmiştir (129). Diğer bir araştırmada ise; RA, XLD agar ve BS agar besiyerleri *Salmonella* 'nın tipik koloni morfolojisi sergileyerek bu besiyerlerinde gelişen Enterobacteriaceae familyasının diğer üyelerinden kolayca ayrılıp ayrılmayacağı yönünden incelemeye alınmıştır. Bu amaçla 25 adet *Salmonella* suşu saf kültür olarak denenmiştir. Denenen 25 *Salmonella* suşunun 23'ü RA ve BS agar, 17'si ise XLD agar üzerinde tipik koloniler oluşturmuşlardır. Denemeye alınan 135 adet Enterobacteriaceae familyasının diğer üyelerinden 134 adedi *Salmonella* 'dan ayrılırken sadece bir tanesi ayrılamamış ve bu suş *Cit. freundii* olarak tanımlanmıştır (128). Gerçekleştirilen çeşitli araştırmalarda; selektif katı besiyerlerinde yanlış pozitif sonuç veren bakteriler tümüyle *Cit. freundii* olarak tanımlanmıştır. Çalışma sonuçları; selektif katı besiyerlerinde novobiyosin kullanımının Enterobacteriaceae familyasının diğer üyelerinin inhibisyonu için yeterli olduğuna işaret etmektedir. MSRV agar içinde bulunan novobiyosinin (12,5 mg/L) *Ent. cloacae* ve *Cit. freundii* 'yi inhibe ettiği ve 42 °C 'deki inkübasyonun da buna yardımcı olduğuna değinilmektedir. İzolasyon aşamasında Dulcitol Novobiocin agar kullanımı da iyi sonuçlar vermiştir. Diğer taraftan selektif katı besiyerlerine nitrofurantoin (% 0,0015) ilavesinin izolasyon oranını arttırdığı da belirtilmektedir (69, 85, 94, 98, 103, 127, 131).

Salmonella türlerini diğer Enterobacteriaceae üyelerinden ayırmak için kullanılan en az 8 adet selektif katı besiyeri vardır. Bu besiyerlerinin çoğu laktoz fermentasyonu ve hidrojen sülfür üretimine dayalı değişik konsantrasyonlarda inhibitör maddeler içeren besiyerleridir. Bu nedenle laktoz negatif ve hidrojen sülfür pozitif *Proteus* türleri çoğu besiyerinde *Salmonella* kolonilerinden ayırt edilememektedirler. Ayrıca besiyerlerinin

çoğunda *Salmonella* kolonileri ya renksiz ya da besiyeri ile aynı renkte koloniler oluştururlar. Yanlışıklara neden olan bu durumlar dikkate alınarak çeşitli selektif katı besiyerleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (136, 137). *S. typhi* H₂S ve propilen glikol negatif olduğu için bu bakterinin Deoxycholate Neutral Red agar besiyerinde ayrımı mümkün olamamaktadır (138). Et ürünlerinde yaygın olarak bulunan *Proteus* laktozu fermente edemediğinden selektif katı besiyerlerinde *Salmonella* 'ya benzer koloniler oluşturur. Bu nedenle geliştirilen Modifiye Lysine Iron agar (MLIA) besiyerinde *Proteus* lizini kullanamadığından *Salmonella* ile farklı koloniler oluşturur. Birkaç *Cit. freundii* suşu haricinde hiç bir bakterinin bu besiyerinde *Salmonella* benzeri koloniler oluşturmadığına değinilmektedir (4, 139). MRV agar besiyeri Mannitol Lysine Crystal Violet Bile Salts (MLCB) agar ile karşılaştırıldığında daha düşük sayıda yanlış pozitif sonuç verdiği bulunmuştur (140). Daha yeni bir besiyeri olan Novobiocin Brilliant Green Glycerol Lactose agar (141) ve Lysine Mannitol Glycerol agar (142) besiyerlerinde *Salmonella* ile *Citrobacter* spp.'yi ayırmak için gliserine yer verilmiştir. Bu besiyerlerinde atipik fermentasyona sahip (laktoz ve sukroz pozitif) *Salmonella* spp. (*S. typhi*) de belirlenebilirken, *Cit. freundii* ve *Proteus* daha iyi bir şekilde ayrılabilir.

Tanımlama aşaması

Salmonella spp.'nin Enterobacteriaceae familyasına ait diğer türlerden ayrılıp tanımlanması için biyokimyasal özelliklerinden bir kaçının birlikte test edilmesi gerekmektedir. Çünkü tek bir biyokimyasal özellik *Salmonella* 'nın belirlenmesi için yeterli olamamaktadır. Bir araştırmada 62 adet *Salmonella* kültüründen 54 adedinin RA besiyerinde koyu kırmızı renkli tipik koloniler oluştururken, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi A* 'nın atipik koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. RA kullanımının *Salmonella* izolatlarının tanımlanması için gereken biyokimyasal testlerin sayısını düşürerek çalışanlara kolaylık sağladığına değinilmektedir (143).

Gıdalarda *Salmonella* analizlerinin yapıldığı rutin testlerde kullanılan selektif besiyerlerinde *Salmonella* kolonileri ile *Citrobacter* ve diğer Enterobacteriaceae üyelerinin ayırt edilmelerinde çoğu zaman güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu bakterilerin biyokimyasal doğrulama testleri ise pahalı ve zaman alıcıdır. Bu nedenle pyrrolidonyl peptidaz (PYRaz) enziminden yararlanım konusu gündeme gelmiştir. *Citrobacter* türleri PYRaz pozitif iken *Salmonella* spp. PYRaz negatif özellik göstermektedir. Bir araştırmada bu iki bakterinin bu özelliklerinden yararlanılarak hızlı bir testle kolayca ayrılabilceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada *Enterobacter taylorae*, *Ent. agglomerans*, *Cit. freundii* ve *Pseudomonas fluorescens* 'ın BG agar üzerinde *Salmonella* benzeri koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan Oxoid PYR test kartlarında PYRaz enzimi L-pirolglutamik asidi kırmızı renkli p-di-methylaminocinnamaldehyde'e çevirmektedir. Bu çalışmada gıdalardan *Salmonella* izolasyonu işlemleri sonucunda, selektif izolasyon besiyerinde *Salmonella* 'ya çok yakın koloni morfolojisi sergileyen kolonilerin % 43'ünün PYR-pozitif sonuç verdiği ortaya çıkmıştır. Biyokimyasal testler sonucunda bu koloniler *Citrobacter* (% 57), *Acinetobacter* (% 17), *Enterobacter* (% 19), *Escherichia* (% 3) ve *Xanthomonas* (% 2) olarak tanımlanmıştır. Diğer PYR-negatif sonuç veren koloniler ise *Proteus* (% 24), *Hafnia* (% 9), *Morganella* (% 8) ve diğer Enterobacteriaceae üyeleri (% 11) olarak tanımlanmıştır (132).

Kanatlılar terimi normalde tavuk, hindi, ördek ve kazı içermektedir. Kanatlılar dünya et tüketiminin % 27'sini kapsamaktadır. Beyaz (göğüs) ve kırmızı (but) kas olmak üzere iki tip kanatlı eti vardır. Göğüs kasının pH'sı 5.6-5.8 iken but kasının pH'sı 6,1-6,4'dür. Çiğ etin raf ömrü başlangıçtaki psikrofilik mikroorganizma sayısı ve tipine, depolama sıcaklığına, kas pH'sına ve tipine, paketlenme materyalinin tipi ve depolama boyunca ortamın gaz kompozisyonunu da içeren iç ve dış faktörlere bağlıdır. Çiğ kanatlı etlerinde özellikle *Salmonella* ve *Campylobacter* insanda gıda kaynaklı hastalıklara yaygın olarak neden olan mikroorganizmalardır. Karkasta bulunan diğer gıda kaynaklı patojenler ise *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* 'dur. İngiltere'de salgın hastalıkların % 20-35'i kanatlı tüketimine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Sakatatların (yürek, ciğer, boyun, taşlık) karkasa oranla *Salmonella* ile daha çok kontamine olduğu belirlenmiştir. *S. enteritidis* kanatlı karkaslarında bulunan ve insanlarda hastalığa neden olan en yaygın serotiptir (7)

Broilerden mikrobiyolojik örnek alma tekniği üzerinde değişik uygulamalar bulunmaktadır. ABD Gıda Güvenliği ve Denetleme Servisi (The Food Safety and Inspection Service of the U.S.) tarafından tavuğun bütün olarak yıkanması şeklinde bir örnek alımı yöntemi kabul edilmektedir. Bu işlem; tüm karkas kullanıldığı için bölgesel eküvyon yöntemine göre daha üstün bulunmaktadır. Ancak tavuk derisinde bulunan mikroorganizmaların pek çoğu karkasın tüm olarak bir kez yıkanmasıyla geri alınamamaktadır. Gerçekleştirilen bir çalışmada; yüzeyle ilişkili mikroorganizmaların ancak peş peşe 40 yıkamadan sonra deriden uzaklaştırılabildiğini gösterilmiştir. Bu nedenle gıdalardan mikroorganizma izolasyonu veya sayımı için örnek hazırlarken homojenizatör veya blender gibi aletlerin kullanılmasıyla daha doğru sonuçların sağlandığı bulunmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalara göre; aerobik bakteri, *Salmonella* spp., *Escherichia* spp. ve *C. jejuni* sayısının göğüs bölgesinde but ve kanat bölgesine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca deri ile ilişkili mikroorganizmaların hiç birisine derinin altındaki dokularda rastlanmamıştır (144).

Broilerlerden örnek alırken eküvyon, deri kültürü ve tüm karkas yıkama yöntemlerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Salmonella* 'nın belirlenmesinde eküvyon yöntemi etkisiz bulunurken deri ve tüm karkas yıkama arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (19, 145).

Kanatlılarda; başlangıçtaki baskın flora Gram-pozitif çubuklar ve mikrokoklar iken son üründe daha çok *Flavobacterium* spp., Enterobacteriaceae üyeleri, *Pseudomonas* spp., *Actinobacter* / *Psychrobacter* spp. içeren Gram-negatif flora baskın hale gelmektedir. Bazı mikroorganizmalar kanatlı derisine tutunmaktadırlar. Yapılan çalışmalar pH ve sıcaklığın tutunmayı etkileyen faktörler olduğunu ve tutunan mikroorganizmanın deri üzerinde film oluşturmaya bağlı olarak yıkama tekniğiyle deriden uzaklaştırılmasının kolay olmadığını göstermiştir. Flajellalı mikroorganizmalar (*E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*) deriye kolaylıkla tutunabildiği gibi flajellaya sahip olmayan (*Klebsiella*, *Lactobacillus brevis* gibi) hareketsiz mikroorganizmaların da bir miktar tutunduğu belirlenmiştir (146, 7).

İncelenecek gıdadan alınacak olan örneğin miktarı ve örneğin niteliği izolasyon başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Broilerlerden *Salmonella* izolasyonunun başarılı olabilmesi için örnekleme için çok iyi yapılması gerekir. Tavuk karkaslarında but ve kanatlara göre göğüs bölgesindeki deride bulunan mikroorganizma sayısının daha fazla olduğu bulunmuştur. Ayrıca göğüs derisindeki *Salmonella* sayısı boyun

derisine göre daha fazladır. Karkaslardan boyun derisinin ayrılması hem ekonomik kayba yol açmamakla birlikte *Salmonella* türleri açısından karkasta bir azalma sağlamaktadır. Ancak göğüs derisinin uzaklaştırılması karkas kalitesini azaltacağından önerilmemektedir (147).

Antibiyotikler genel olarak hayvan ve insan enfeksiyonlarını önlemek ve iyileştirmek amacıyla kullanılırlar. Antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı ilgili patojenlerde dirençlilik oranının artmasına ve dirençli bakterilerin çoğalmasına neden olur. Bu tür riskleri düşünüp karar verirken her bir amaç için; antibiyotiklerin kullanım miktarı, dirençlilik ve ekolojik denge içinde dirençli suşların dağılımı konusunda daha çok bilgiye ihtiyaç vardır. Bu parametrelerin sistematik olarak bir araya getirilmesi antibiyotik uygulamalarının verimliliğini koruma altına almak ve halk sağlığı riskini en aza indirmek için geliştirilmesi gereken temel stratejilerdir.

Bakterilerin antibiyotiklere olan dirençlilikleri dünya çapında ciddi bir problemdir. US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kaynaklarına göre her yıl Amerika'da 76 milyon hasta, 325.000 hastanelik vaka ve 5000 ölüm rapor edilmektedir. *Salmonella* (% 31), *Listeria* (% 28), *Toxoplasma* (% 21), "Norwalk benzeri virüsler" (% 7), *Campylobacter* (% 5) ve *E. coli* O157:H7 (% 3)'den oluşan bu beş patojen, % 90 oranında ölüme neden olmaktadır. Antibiyotiklere dirençli gıda kaynaklı patojenlerin gelişimi insanların ilaç tedavilerini de riske sokmaktadır. Bakterilerin dirençliliklerinin, ampicilin için % 8'den % 44'e, tetrasiklin için % 1'den % 42'ye, kloramfenikol için % 1,7'den % 26'ya ve nalidiksik asit için % 0,1'den % 11'e arttığı belirtilmektedir (148).

Bakterilerin antibiyotiklere olan dirençlilikleri özellikle dar spektrumlu antibiyotiklere verdikleri cevaplara göre ölçülmektedir. Bunlara en iyi örnek β -laktam ve aminoglikozidler direkt olarak inaktive eden enzimlerin ölçümüdür. Penisilin ve sefalosporinlerin tüm dünyada kullanımının başlangıcında, yani 50 yıl öncesinde, 200'ün üzerinde β -laktamaz ile ilgili potansiyel klinik kullanım tanımlanmıştır. β -laktamaz; *S. aureus* (>% 90), *Haemophilus* spp. (% 30-40), *Moraxella catarrhalis* (>% 90) ve *Enterococcus faecalis* 'de (çok az) bulunmaktadır. Amp C sefalosporinaz *Enterococcus* spp. (>% 30) ve *Citrobacter* spp.'yi (>% 30) baskılamaktadır. Geniş spektrumlu β -laktamaz *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'de (% 0-10) bulunur. Karbapenemi hidroliz yeteneği olan metalloenzimler ve diğer enzimlere ise *P. aeruginosa* ve *Serratia marcescens* sahiptir. Bakteriler tarafından üretilen bu enzimler β -laktam substratlarını inaktive ederler. Sefepime, dördüncü kuşak sefalosporin olarak tanımlanır ve dünya çapında son zamanlarda yaygın kullanılan bir antibiyotiktir. Diğer sefalosporin ve penisilin bileşiklerle karşılaştırıldığında sefepime; daha geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Japonya'nın 22 tıp merkezinde yapılan 6 aylık bir çalışmada; *Enterobacter* spp. ve *Cit. freundii* genellikle üçüncü kuşak sefalosporin ile inhibisyonunun değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Kulavularik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi klinik inhibitörler ile Amp C düzenleyici enzimin aşırı üretiminin inhibe edilemeyeceği belirlenmiştir. Diğer β -laktam bileşiklerle karşılaştırıldığında *Enterobacter* spp. ve *Cit. freundii* 'nin piperasillin, seftazidim ve sefoperazon/ sulbaktama duyarlılığı düşüktür. *Cit. freundii*, indol pozitif *Proteus* ve *P. aeruginosa* 'nın bu antibiyotikler için MIC (Minimum Inhibitory Concentrations) değerleri sırasıyla 2; 0,19 ve 16 μ g/mL, duyarlılıkları ise sırasıyla % 100, % 99,5 ve % 83,6 olarak tespit edilmiştir (149).

Cit. freundii β -laktamaz enzimi sentezleyen bir bakteridir. Ortamda bulunan β -laktam bileşikler β -laktamaz sentezini çeşitli oranlarda indüklemektedirler. β -laktam bileşiklerin çoğu kötü birer indükleyicidirler. Ancak ampisilin, amoksisillin ve sefaleksinin orta indükleyici ve sefoksitin, imipenem ve meropenem güçlü indükleyicidirler. Imipenem ve temosillin β -laktamaza karşı yüksek derecede stabiliteye sahiptirler. Buna karşın diğer bileşiklerin çoğu β -laktamaza karşı oldukça duyarlıdır. β -laktamaz sentezinde güçlü indükleyiciler sefoksitin, zayıf olanlar ise sefotaksim, seftazidim ve diğer bazı bileşiklerdir. Yapılan bu çalışmaya göre; sefotaksim ve seftazidimin *Cit. freundii* 'ye karşı etkili antimikrobiyaller olduğu bulunmuştur (150).

Fransa'da yapılan bir çalışmada; sonuçlar *Salmonella* 'nın yayılmasında hayvanların önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Son 30 yılda elde edilen bilgiler değişik gıda sektörlerinde ve hayvan türlerinde *Salmonella* 'nın değişen serotipleri ile karşılaştığını göstermektedir. Söz konusu bu çalışmada, antibiyotik direnci Mueller Hinton agar plakları üzerinde standart disk diffüzyon yöntemiyle oluşan zonların çapı ölçülerek belirlenmiştir. Bu analizler için suşlar kaynaklarına göre üç temel alana bölünmüştür. Hayvanlardan izole edilen suşların antimikrobiyal ajanlara karşı olan direnci hayvanın türüne bağlıdır (151). Sığırlardan izole edilen suşlar antibiyotiklere en düşük oranda direnç gösterirken, en dirençli suşlar tavuk ve domuzlardan elde edilen suşlar olmuştur. Ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, tetrasiklin ve sulfonamid için yüksek oranda direnç gözlenmiştir. Bu dirençli fenotiplere sığırlarda, domuz (% 18,3) ve tavuklardan (% 9) daha çok olmak üzere % 25,3 oranında rastlanmıştır. Sığırlarda daha çok multiresistant (çoklu dirençli) *S. typhimurium* 'a rastlanmaktadır. Tavuklarda dirençlilik gösteren serovarların sığırlardakinden daha fazla değişkenlik gösterdiği ortaya çıkmıştır. *S. typhimurium* en dirençli serovarlardan (% 87,5) birisidir. Bunun aksine *S. enteritidis* serovarlarından % 54'ü özellikle furana dirençli olmak üzere monoresistanttır (152)

Gıda ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* serotiplerinin antibiyotiklere olan dirençlilikleri ve duyarlılıkları pek çok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda *Salmonella* serotiplerinin siprofloksasin, nalidiksik asit, kloramfenikol, ampisilin, trimetopirim-sulfametoksazol, bazı sefalosporinler, tetrasiklin, enrofloksasin, sulfonamidler ve streptomisine dirençliyken, sefalosporinler, fluoroquinolones, aztreonam, mesillinam ve gentamisine duyarlı olduğu bulunmuştur (19, 48, 55, 153- 159).

Bir araştırmada *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* 'nın 1985-1987 ve 1995-1998 yılları arasında antimikrobiyal ajanlara olan dirençleri araştırılmıştır. *C. jejuni* 'nin quinolones ve tetrasikline, gastroenteritik *Salmonella* 'nın ampisilin, kloramfenikol, trimetopirim-sulfametoksazol ve nalidiksik aside karşı artan direnç gösterdikleri tespit edilmiştir (157).

S. Enteritidis 'in ise sulfonamide (100 μ g/mL), streptomisin (20 μ g/mL), ampisilin (50 μ g/mL) ve spektinomisine (100 μ g/mL) dirençli olduğu ve bu özelliğin konjugatif plasmidlerle bir başka mikroorganizmaya taşınabildiği bulunmuştur (160).

Toplam 310 adet Gram-pozitif ve 580 adet Gram-negatif izolatın antibiyotiklere olan dirençliliklerinin test edildiği bir çalışmada; *Enterococcus* spp.'nin % 38, *Str. agalactiae* 'nin % 13, *Str. pneumoniae* 'nin % 65, *Acinetobacter* spp.'nin % 11, *C. diversus* 'in %

6, *Cit. freundii* 'nin % 17, *K. oxytoca* 'nın % 39, *M. morganii* 'nin % 16, *P. mirabilis* 'in % 20, *P. vulgaris* 'in % 23, *Serratia* spp.'in % 19, *Sten. maltophilia* 'nin % 10 ve *Haemophilus influenzae* 'nin % 41'inin levofloksasine duyarlı olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca *S. aureus* 'un % 94 ve koagülaz negatif stafilokokların % 65'i, *Enterobacter* spp.'nin % 99'u, *E. coli* 'nin % 97'si, *K. pneumoniae* 'nin % 98'i ve *P. aeruginosa* 'nın % 87'si levofloksasine duyarlıdır. Sonuç olarak İsviçre'de yapılan bu çalışmada levofloksasin; klinik olarak yaygın olan izolatların duyarlı olduğu yeni bir fluoroquinolone olarak tanımlanmıştır (161).

S. enteritidis, *S. typhimurium* ve *S. virchow* 'un ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, gentamisin, trimetopirim-sulfametoksazol ve nalidiksik aside olan direnci disk difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. İspanya'da 1980-1994 yılları arasında klinik materyallerden izole edilen bu izolatlarla yapılan çalışma sonucunda *S. enteritidis* 'in (% 10,9), *S. typhimurium* (% 43,5) ve *S. virchow* 'a (% 36,1) göre söz konusu bu antimikrobiyal ajanlara karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). *S. enteritidis* 'in ampisiline karşı direnci 1980-1982 arasında % 2,7 ve 1992-1994 yılları arasında ise % 15,6 artmıştır (162).

Bir çalışmada; *S. enterica* subsp. *enterica* ve *S. enterica* subsp. *arizonae* 'ya ait toplam 100, *S. enterica* suşunun toplam 71 adet antibiyotiğe karşı direnci araştırılmıştır. *S. enterica* subsp. *enterica* suşuna ait farklı serovarlarla (*typhimurium* n=17, *enteritidis* n=17, *dublin* n=10, *typhi* n=16, *paratyphi* A n= 6 ve diğer n=24) çalışılmış ve mikrodilüsyon işlemi kullanılarak MIC değerleri belirlenmiştir. Fosfomisin haricinde *S. enterica* 'nın alt türleri ve serovarlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. *Salmonella* 'nın hepsi tetrasiklinlere, aminoglikozidlere, β -laktam antibiyotiklerinin çoğuna, quinolones, co-trimoksazole grup antibiyotiklerden kloramfenikol, nitrofurantoin ve azitromisine karşı duyarlı veya orta düzeyde dirençlidirler. *S. enterica* suşları doğal olarak benzilpenisilin, oksasillin, makrolideslerin çoğuna, rifampisin, linkosamidlere, streptoGraminlere, glikopeptitlere ve fusidik aside karşı dirençlidirler. Enterik *Salmonella* içinde *S. enterica* subsp. *arizonae* fosfamisine duyarlı iken typhoid *Salmonella* 'lar doğal olarak dirençlidir (10). *S. typhimurium* type DT 104 4 veya daha fazla antibiyotiğe çoklu direnç gösteren (multiresistant) bir suştur ve *S. virchow* ve *S. hadar* tavuklarla ilgili olan patojenlerdir ve multiresistanttır. Son zamanlarda siprofloksasine olan duyarlılıkları azalmaktadır (21).

Etopya'da 1994-1996 yılları arasında hastalardan elde edilen 80 *Salmonella* ve 147 *Shigella* izolatıyla çalışılmıştır. En çok izole edilen türler *S. typhi* (% 21), *S. flexneri* (% 58.5), *S. dysenteriae* (% 36.7) olarak bulunmuştur. Araştırmada ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, tetrasiklin ve kotrimoksazol ile çalışılmıştır. *Shigella* 'nın % 4'ü bu beş antibiyotiğe karşı duyarlı iken % 8,8'i tetrasikline, % 10'u ampisiline, % 28'i kotrimoksazole ve % 98'i gentamisine duyarlı çıkmıştır. *Shigella* 'nın 108 tanesi nalidiksik aside karşı dirençlidir. Sonuç olarak, yüksek oranda ölüme yol açan *Shigella* kaynaklı dizanteri salgını için nalidiksik asit tavsiye edilmiştir (163).

Antibiyotik direncinin araştırıldığı bir çalışmada; 1993-1994 yılları arasında Tayland'da 1308'i insandan 407'si dondurulmuş tavuk etinden izole edilmek üzere toplam 1715 adet *Salmonella* serotipi (*S. enteritidis*, *S. derby*, *S. weltevreden*, *S. anatum* ve *S. typhimurium*) denemeye alınmıştır. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak kloramfenikol, seftriakson, amikasin, kanamisin, ampisilin, trimetopirim-

sulfametoksazol, nalidiksik asit, gentamisin ve ofloksasine dirençlilik test edilmiştir. İnsandan 1994 yılında izole edilen *S. enteritidis* izolatlarının seftriakson, amikasin ve kanamisine olan dirençleri sırasıyla % 10,7, % 8,6 ve % 17,8 olarak bulunmuştur ve antibiyotiklere direncin 1993 yılına göre arttığı ($p<0,01$) tespit edilmiştir (155).

Türkiye’de Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin antibiyotiklere olan dirençlerinin araştırıldığı bir çalışmada; 1985 yılında 233 adet Gram-negatif bakterinin tedavi amacıyla kullanılmayan amikasin ve kanamisine olan direncinin % 0,9 olduğu bulunmuştur. Ancak bu direnç 1991 yılında % 8,5 oranında artış göstermiştir. Gentamisine olan direnç ise aynı şekilde % 52,7’den % 66,4’e çıkmıştır. β -laktam ajanlar Türkiye’de çok yaygın olarak kullanılmaktadırlar. *Salmonella* ’nın ampicilin, kloramfenikol, sefalosporinler ve aztreonama dirençli oldukları tespit edilmiştir. *Pseudomonas* spp. ise 1985 yılında seftazidime % 4,6 seftotaksime ise % 87 dirençlidir. Bu değerler 1991 yılında artarak % 22 ve % 48 olmuştur (164).

KAYNAKLAR

1. Halkman, K.A., Doğan, B.H., Rahati Noveir, M. 1994. Gıda maddelerinde *Salmonella* ile *E. coli* arama ve sayılma yöntemlerinin karşılaştırılması, Gıda Tek. Der. Yayın No: 21, 93s.
2. Anonymous, 1990. The Oxoid Manual. 6th Edition. Unipath Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, England, 12-10 p.
3. Farmer III, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G.P., Asbury, M.A., Riddle, C., Wathen-Grady, H.G., Elias, C., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., O’Hara, C.M., Morris, G.K., Smith, P.B., Brenner, D.J. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 21 (1), 46-76.
4. Bailey, J.S., Chiu, J.Y., Cox, N.A., Johnston, R.W. 1988. Improved selective procedure for detection of Salmonellae form poultry and sausage products. Journal of Food Protection, 51 (5), 391-396.
5. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Bergey’s manual of determinative bacteriology.
6. Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Hickman-Brenner, F.W. 1997. Supplement 1996 (no. 40) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology, 148(9), 811-814.
7. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. 2000. The microbiological safety and quality of food, volume I, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
8. <http://www.Salmonella.org/info.html>
9. <http://www.Merck.com/pubs/mmanual/section13/chapter15//15/a.html>
10. Stock, I., Wiedemann, B. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. International Journal of Antimicrobial Agents, 16, 211-217.
11. van Duijkeren, E., Houwers, D.J. 2000. A critical assessment of antimicrobial treatment in uncomplicated *Salmonella enteritidis*. Veterinary Microbiology, 73, 61-73.
12. <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.html>
13. Angelillo, I.F., Viggiani, N.M.A., Rizzo, L., Bianco, A. 2000. Food handlers and foodborne diseases: Knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. Jourla of Food Protection, 63 (3), 381-385.

14. Suzuki, S. 1994. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. Int. J. Food Microbiology, 21(1-2), 89-105.
15. Lammerding, A.M., Garcia, M.M., Mann, E.D., Robinson, Y., Dorward, W.J., Truscott, R.B., Tittiger, F. 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. Journal of Food Protection, 51 (1), 47-52.
16. Jones, F.T., Axtell, R.C., Rives, D.V., Scheideler, S.E., Tarver, F.R., Walker, R.L., Wineland, M.J. 1991. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. Journal of Food Protection, 54 (7), 502-507.
17. Duffy, G., Cloak, O.M., O'Sullivan, M.G., Guillet, A., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. 1999. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products. Food Microbiology, 16, 623-631.
18. Escartin, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A., Saldana-Lozano, J. 1999. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. Food Microbiology, 16, 479-486.
19. Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, L., Humphrey, T.J. 2002. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology, 76, 151-164.
20. Escartin, E.F., Lozano, J.S., Garcia, O.R. 2000. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. Int. J. Food Microbiology, 54(1-2), 19-25.
21. Threlfall, E.J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food and water borne infections. FEMS Microbiology Reviews, 26, 141-148.
22. Archer, D.L., Kvenberg, J.E. 1985. Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the US. J. Food Protection, 48(10), 887-894.
23. Lacey, R.W. 1993. Foodborne bacterial infections. Parasitology, 107(suppl.), S75-S93.
24. Al-Ogaily, Z., Anastassiadou, H., Barrow, P.A., Bauerfeind, R., Blaha, T., Bulling, E., Cooper, G.L., Dinjus, U., Gerigk, K., Hafez, H.M., Hanel, I., Hartung, M., Helmuth, R., Humbert, F., Humphrey, T.J., Kothmann, D., Kohler, B., Kuhn, H., Lehmacher, W. 1994. Control of *Salmonella* infections in animals and prevention of human food-borne *Salmonella* infections. Bulletin WHO, 72(6), 831-833.
25. Swaminathan, B., Feng, P. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiology, 48, 401-426.
26. Sinell, H.J. 1995. Control of food-borne infections and intoxications. Int. J. Food Microbiology, 25(3), 209-217.
27. Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E., Anastasio, M.P. 1996. Food-borne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-1994. Epidemiology and Infections, 116(3), 257-265.
28. Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D. 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. Int. J. Food Microbiology, 40(1-2), 1-8.
29. Fleet, G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. Int. J. Food Microbiology, 50(1-2), 101-117.
30. Goodman, L., Segreti, J. 1999. Infectious diarrhea. Disease-a-Month, 45(7), 268-299.
31. Letellier, A., Messier, S., Quessy, S. 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. J. Food Protection, 62(1), 22-25.

32. Skovgaard, N. 1999. Impression from the 19th meeting of ISO/TC 34/SC 9 "agricultural and food products-microbiology", Paris-21/23 April 1999. *Int. J. Food Microbiology*, 51(1), 1-5.
33. Rose, N., Beaudreau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P. 1999. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine*, 39, 265-277.
34. Roberts, J.A. 2000. Economic aspects of food-borne outbreaks and their control. *British Medical Bulletin*, 56(1), 133-141.
35. De Louvois, J. 1993. *Salmonella* contamination of eggs. *Lancet*, 342(8867), 366-367.
36. Corry, J.E.L., James, C., James, S.J., Hinton, M. 1995. *Salmonella*, *Campylobacter* and *Escherichia coli* O157:H7 decontamination techniques for the future. *Int. J. Food Microbiology*, 28(2), 187-196.
37. Wallace, D.J., Gilder, T.V., Shallow, S., Fiorentino, T., Segler, S.D., Smith, K.E., Shiferaw, B., Etzel, R., Garthright, W.E., Angulo, F.J., FoodNet Working Group. 2000. Incidence of Foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (foodNet)-1997. *Journal of Food Protection*, 63 (6), 807-809.
38. Anonymous, 1996. Mikrobiyoloji-*Salmonella* aranması metotlarında genel kurallar. TS 7438 (ISO 6579/Nisan 1996), Türk Standartları Enstitüsü, Necatibey Cad. 112 Bakanlıklar/Ankara.
39. Andrews, W.H., 1985. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. *Food Technology*, 3, 77-82.
40. Fricker, C.R., 1987. A review: the isolation of salmonellas and campylobacters. *Journal of applied Bacteriology*, 63, 99-116.
41. Persaud, C., Abdalla, S. 1994. *Salmonella* identification. *British J. Biomedical Science*, 51(4), 375.
42. Anonymous, 1998. Food-borne pathogens, Monograph number 1, *Salmonella*, D.E. Post, Technical Support Manager, Oxoid, 40p, Unipath Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG248PW, Englang.
43. Bolton, F.J. 1998. Strategies in the development of media for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiology*, 45(1), 29-34.
44. Kilsby, D.C. 1999. Food microbiology: The challenges for the future. *Int. J. Food Microbiology*, 50(1-2), 59-63.
45. Allen, G., Bruce, V.R., Andrews, W.H., Satchell, F.B., Stephenson, P. 1991a. Recovery of *Salmonella* from frozen shrimp: Evalutaion of short-term selective enrichment, selective media, post-enrichment, and a rapid immunodiffusion method. *J. Food Protection*, 54(1), 22-27.
46. Flowers, R.S., 1985. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. *Food Technology*, 3, 103-108.
47. Göktan, D., Tuncel, G. 1987. Gıdalarda *Salmonella* izolasyonunda son çalışmalar. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, seri B: Gıda Mühendisliği, Cilt: 5, Sayı: 1.
48. D'Aoust, J. 1994. *Salmonella* and the International food trade. *Int. J. Food Microbiology*, 24(1-2), 11-31.
49. Tietjen, M., Fung, D.Y.C. 1995. *Salmonella* and food safety. *Crit. Rev. Microbiology*, 21(1), 53-83.

50. Odumeru, J.A., Steele, M., Fruhner, L., Larkin, C., Jiang, J., Mann, E., McNab, W.B. 1999. Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. *J. Clinical Microbiology*, 37(4), 944-949.
51. Swanson, M.J.K., Anderson, J.E. 2000. Industry perspectives on the use of microbial data for hazard analysis and critical control point validation and verification. *J. Food Protection*, 63(6), 815-818.
52. De Blackburn, W.C. 1993. Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Bacteriology*, 75(3), 199-214.
53. Duffy, G., Ellison, A., Anderson, W., Cole, M.B., Stewart, G.S.A.B. 1995. Use of bioluminescence to model the thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* in the presence of a competitive microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (9), 3463-3465.
54. Davies, R.H., Wray, C. 1996. Development and evaluation of a simple, one-step *Salmonella* isolation test. *Lett. Appl. Microbiology*, 22(4), 267-270.
55. Poppe, C., McFadden, K.A., Demczuk, W.H.B. 1996a. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 325-344.
56. Masso, R., Oliva, J. 1997. Technical evaluation of an automated analyser for the detection of *Salmonella* Enterica in fresh meat products. *Food Control*, 8(2), 99-103.
57. De Boer, E., Beumer, R.R. 1999. Methods for detection and typing of food-borne microorganisms. *Int. J. Food Microbiology*, 119-130.
58. Eyigor, A., Carli, K.T., Unal, C.B., 2002. Implementation of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 37-41.
59. Mercanoğlu, B., Aytaç, A.S. 2002. Immunomagnetic separation and a cultural reference method for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 53 (3), 43-45.
60. Gruenewald, R., Henderson, R.W., Yappow, S. 1991. Use of Rambach Propylene Glycol containing Agar for identification of *Salmonella* spp. *J. Clinical Microbiology*, 29(10), 2354-2356.
61. Afflu, L., Gyles, C.L. 1997. A comparison of procedures involving single step *Salmonella*, 1-2 Test, and modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for detection of *Salmonella* in ground beef. *Int. J. Food Microbiology*, 37(2-3), 241-244.
62. Hanai, K., Satake, M., Nakanishi, H., Venkateswaran, K. 1997. Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods. *Appl. Environ. Microbiology*, 63(2), 775-778.
63. De Medici, D., Pezzotti, G., Marfoggia, C., Caciolo, D., Foschi, G., Orefice, L. 1998. Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *Int. J. Food Microbiology*, 45(3), 205-210.
64. Peplow, M.O., Correa-Prisant, M., Stebbins, M.E., Jones, F., Davies, P. 1999. Sensitivity, specificity and predictivity values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *Appl. Environ. Microbiology*, 65(3), 1055-1060.
65. Baylis, C.L., MacPhee, S., Betts, R.P. 2000. Comparison of methods for the recovery and detection of low levels of injured *Salmonella* in ice cream and milk powder. *Lett. Appl. Microbiology*, 30(4), 320-324.

66. Cason, J.A., Bailey, J.S., Stern, N.J., Whittemore, A.D., Cox, N.A. 1997. Relationship between aerobic bacteria, *Salmonella* and *Campylobacter* on broiler carcasses. Poultry Science, 76(7), 1037-1041.
67. Setephenson, J. 1998. Fighting flora with flora: FDA approves an anti-*Salmonella* spray for chickens. J. Am. Med. Association, 279(15), 1152.
69. Peng, H.; Shelef, L.A. 1999. Automated rapid screening of foods for the presence of salmonellae. Journal of Food Protection, 62 (11), 1341-1345.
70. Huang, H., Garcia, M.M., Brooks, B.W., Nielsen, K., Parng, S. 1999. Evaluation of culture enrichment procedures for use with *Salmonella* detection immunoassay. Int. J. Food Microbiology, 51(2-3), 85-94.
71. Inami, G.B., Moler, S.E. 1999. Detection and isolation of *Salmonella* from naturally contaminated alfalfa seeds following an outbreak investigation. Journal of Food Protection, 62 (6), 662-664.
72. Rychlik, I., van Kesteren, L., Cardova, L., Svestkova, A., Martinkova, R., Sisak, F. 1999. Rapid detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 29, 269-272.
73. Skjerve, E., Olsvik, O. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. International Journal of Food Microbiology, 14, 11-18.
74. Vermunt, A.E.M., Franken, A.A.J.M., Beumer, R.R. 1992. Isolation of salmonellas by immunomagnetic separation. Journal of Applied Bacteriology, 72, 112-118.
75. Curiale, M.S., Mciver, D., Weatherby, S., Planer, C. 1990. Detection of salmonellae and other Enterobacteriaceae by commercial deoxyribonucleic acid hybridization and enzyme immunoassay kits. Journal of Food Protection, 53 (12), 1037-1046.
76. Fitts, R., Diamond, M., Hamilton, C., Neri, M. 1983. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. Applied and Environmental Microbiology, 46 (5), 1146-1151.
77. Rodrigues, U.M., Kroll, R.G. 1990. Rapid detection of salmonellas in raw meats using a fluorescent antibody-microcolony technique. Journal of Applied Bacteriology, 68, 213-223.
78. Monfort, P., Le Gal, D., Le Saux, J.C., Piclet, G., Raguene, P., Boulben, S., Plusquellec, A. 1994. Improved rapid method for isolation and enumeration of *Salmonella* from bivalves using Rambach Agar. J. Microbiological Methods, 19(1), 67-79.
79. Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Ruberto, A., Iannitto, G., Grasso, G.M. 1997. Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring *Salmonella* in raw pork sausages and chicken meat. Letters in Applied Microbiology, 24, 493-497.
80. Lucore, L.A., Cullison, M.A., Jaykus, L.A. 2000. Immobilization with metal hydroxides as a means to concentrate food-borne bacteria for detection by cultural and molecular methods. Appl. Environ. Microbiology, 66(5), 1769-1776.
81. Eckner, K.F., Flowers, R.S., Robison, B.J., Mattingly, J.A., Gabis, D.A., Silliker, J.H. 1987. Comparison of *Salmonella* Bio-EnzaBead immunoassay method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. J. Food Protection, 50(5), 379-385.
82. Flowers, R.S., Mozola, M.A., Curiale, M.S., Gabis, D.A., Silliker, J.H. 1987. Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. J. Food Science, 52(3), 781-785.
83. Fluit, A.C., Widjoatmodjo, M.N., Box, A.T.A., Torensma, R., Verhoef, J. 1993. Rapid detection of *Salmonella* in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiology, 59(5), 1342-1346.

84. Manafi, M., Willinger, B. 1994. Comparison of three rapid methods for identification of *Salmonella* spp. Lett. Appl. Microbiology, 19(5), 328-331.
85. Poppe, C., Elliott, L.A., Duncan, C.L. 1996b. Evaluation of immunomagnetic separation in combination with modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium and Rambach Agar for the isolation of *Salmonella*. J. Microbiological Methods, 25, 237-244.
86. Cudjoe, K.S., Krona, R. 1997. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads anti-*Salmonella* and a conventional reference method. Int. J. Food Microbiology, 37(1), 55-62.
87. Trkov, M., Majerikova, I., Jerasek, B., Stefanovicova, A., Rijpens, N., Kuchta, T. 1999. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. Food Microbiology, 16, 393-399.
88. Mossel, D.A.A., Weenk, G.H., Morris, G.P., Struijk, C.B. 1998. Identification, assessment and management of food-related microbiological hazards: Historical, fundamental and psychosocial essentials. Int. J. Food Microbiology, 39(1-2), 19-51.
89. Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mor-Mur, M. 1999. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. Food Microbiology, 16, 357-365.
90. Curtis, G.D.W., Beuchat, L.R. 1998. Quality control of culture media-perspectives and problems. Int. J. Food Microbiology, 45(1), 3-6.
91. Hoorfar, J., Baggesen, D.L. 1998. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. FEMS Microbiology Letters, 169, 125-130.
92. Tan, W., Shelef, L.A. 1999. Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. J. Microbiol. Methods, 37, 87-91.
93. Hammack, T.S., Amaguana, R.M., Andrews, W.H. 2001. An improved method for the recovery of *Salmonella* serovars from orange juice using universal preenrichment broth. Journal of Food Protection, 64 (5), 659-663.
94. Van der Zee, H. 1994. Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella* Enteritidis. Int. J. Food Microbiology, 21(1-2), 41-46.
95. Reissbrodt, R., Vielitz, E., Kormann, E., Rabsch, W., Kühn, H. 1996. Ferrioxamine E-supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for *Salmonella*. Int. J. Food Microbiology, 29(1), 81-91.
96. Slutsker, L., Altekruze, S.F., Swerdlow, D.L. 1998. Food-borne diseases: Emerging pathogens and trends. Inf. Dis. Clin. North America, 12(1), 199-216.
97. Chang, Y.H. 2000. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. J. Food Protection, 63(5), 655-658.
98. De Boer, E. 1998. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. Int. J. Food Microbiology, 45(1), 43-53.
99. Jensen, A.N., Sorensen, G., Baggesen, D.L., Bodker, R., Hoorfar, J. 2003. Addition of novobiocin in preenrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis. Journal of Microbiological Methods (in press).
100. Velazquez, M., Tatini, S.R., Feirtag, J.M. 2000. Evaluation of a two-step protocol for rapid detection of *Salmonella* in ice-cream and Cheddar cheese. Food Microbiology, 17, 349-359.
101. Arroyo, G., Arroya, J.A. 1995a. Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* serotypes in edible offal. J. Appl. Bacteriology, 79(4), 360-367.

102. Busse, M. 1995. Media for *Salmonella*. Int. J. Food Microbiology, 26(1), 117-131.
103. Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F., Colin, P. 1997. Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products. Int. J. Food Microbiology, 38(2-3), 211-216.
104. Chen, H., Fraser, A.D.E., Yamazaki, H. 1993. Evaluation of the toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enrichment period. Int. J. Food Microbiology, 18(2), 151-159.
105. Chen, H., Fraser, A.D.E., Yamazaki, H. 1994. Modes of inhibition of food-borne non-*Salmonella* bacteria by Selenite Cystine Selective Broth. Int. J. Food Microbiology, 22(2-3), 217-222.
106. Beckers, H.J., Heide, J.V.D., Fenigsen-Narucka, U., Peters, R. 1987. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. Journal of Applied Bacteriology, 62, 97-104.
107. Rappold, H., Bolderdijk, R.F., De Smedt, J.M. 1984. Rapid cultural method to detect *Salmonella* in foods. Journal of Food Protection, 47 (1), 46-48.
108. Miller, M., Koburger, J.A. 1984. Evaluation of direct enrichment at elevated temperature for recovery of Salmonellae from oysters. Journal of Food Protection, 47 (4), 267-269.
109. D'aoust, J.Y., Sewell, A., Jean, A. 1990. Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne *Salmonella*. Journal of Food Protection, 53 (7), 562-565.
110. Hammack, T.S., Satchell, F.B., Andrews, W.H., Amaguana, R.M., June, G.A., Sherrod, P.S., Koopman, L. 1993. Abbreviated preenrichment period for recovery of *Salmonella* spp. from selected low moisture dairy foods. Journal of Food Protection, 56 (3), 201-204.
111. Pignato, S., Giammanco, G., Giammanco, G. 1995a. Rambach Agar and SM-ID medium sensitivity for presumptive identification of *Salmonella* subsp. I-VI. J. Medical Microbiology, 43(1), 68-71.
112. Cloak, O.M., Geraldine, D., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. 1999. Isolation and detection of *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp using a simultaneous enrichment step followed by a surface adhesion immunofluorescent technique. J. Microbiological Methods, 39, 33-43.
113. Vassiliadis, P. 1983. the Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: A overview. Journal of Applied Bacteriology, 54, 69-76.
114. Rengel, A., Mendoza, S. 1984. Isolation of *Salmonella* from raw chicken in Venezuela. Journal of Food Protection, 47 (3), 213-216.
115. Yde, M., Ghysels, G. 1984. Performance of several enrichment media in the isolation of Salmonellae from liquid egg products. Journal of Food Protection, 47 (3), 217-219.
116. Allen, G., Bruce, V.R., Stephenson, P., Satchell, F.B., Andrews, W.H. 1991b. Recovery of *Salmonella* from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment. J. Food Protection, 54(7), 492-495.
117. D'aoust, J.Y., Sewell, A.M., Daley, E. 1992. Inadequacy of small transfer volume and short (6 h) selective enrichment for the detection of food-borne *Salmonella*. J. Food Protection, 55(5), 326-328.
118. Turantaş, F., Ünlütürk, A. 1992. Sucukta *Salmonella typhimurium* izolasyon ve sayım yöntemlerinin karşılaştırılması. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi, seri B: Gıda Mühendisliği, Cilt: 10, Sayı: 1.
119. Krosell, L., Skovgaard, N. 1993. Evaluation of a new semi-automated screening method for the detection of *Salmonella* in foods within 24 h. Int. J. Food Microbiology, 20(3), 123-130.

120. Oboegbulem, S.I. 1993. Comparison of two enrichment media and three selective media for isolation of *Salmonellae* from fresh chicken carcass rinse fluids and sewer swaps. *Int. J. Food Microbiology*, 18(2), 167-170.
121. Davies, R.H., Wray, C. 1994a. Evaluation of a rapid cultural method for identification of salmonellas in naturally contaminated veterinary samples. *J. Appl. Bacteriology*, 77(3), 237-241.
122. Davies, R.H., Wray, C. 1994b. Evaluation of SMID Agar for identification of *Salmonella* in naturally contaminated veterinary samples. *Lett. Appl. Microbiology*, 18(1), 15-17.
123. Madden, R.H., Espie, W.E., McBride, J. 1996. Benefits of indirect impedimetry, using Rappaport-Vassiliadis Broth, for the detection of *Salmonella* in processed animal protein. *Int. J. Food Microbiology*, 29(2-3), 387-390.
124. Wiberg, C., Norberg, P. 1996. Comparison between a culture procedure using Rappaport-Vassiliadis Broth and motility enrichments on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for *Salmonella* detection from food and feed. *Int. J. Food Microbiology*, 29(2-3), 353-360.
125. Hammack, T.S., Amaguana, R.M., June, G.A., Sherrod, P.S., Andrews, W.H. 1999. Relative effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* spp. from foods with a low microbial load. *J. Food Protection*, 62(1), 16-21.
126. Kafel, S., Pogorzelska, E. 1987. Transfer volume-dependent recovery of *Salmonella* from minced meat. *Journal of Food Protection*, 50 (7), 584-586.
127. Jetton, J.P., Bilgili, D.E., Conner, D.E., Kotrola, J.S., Reiber, M.A. 1992. Recovery of salmonellae from chilled broiler carcasses as affected by rinse media and enumeration method. *J. Food Protection*, 55(5), 329-332.
128. Garrick, R.C., Smith, A.D. 1994. Evaluation of Rambach Agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. *Lett. Appl. Microbiology*, 18(4), 187-189.
129. Warburton, D.W., Bowen, B., Konkle, A., Crawford, C., Durzi, S., Foster, R., Fox, C., Gour, L., Khorn, G., LaCasse, P. 1994. A comparison of six different plating media used in the isolation of *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiology*, 22(4), 277-289.
130. Arroyo, G., Arroya, J.A. 1995b. Selective action of inhibitors used in different culture media on the competitive microflora of *Salmonella*. *J. Appl. Bacteriology*, 78(3), 281-289.
131. Coleman, D.J., Nye, K.J., Chick, K.E., Gagg, C.M. 1995. A comparison of immunomagnetic separation plus enrichment with conventional *Salmonella* culture in the examination of raw sausages. *Lett. App. Microbiology*, 21(4), 249-251.
132. Bennett, A.R., MacPhee, S., Betts, R., Post, D. 1999. Use of pyrrolidonyl peptidase to distinguish *Citrobacter* from *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiology*, 28(3), 175-178.
133. Perales, I., Erkiaga, E. 1991. Comparison between semisolid Rappaport and modified semisolid Rappaport-Vassiliadis media for the isolation of *Salmonella* spp. from foods and feeds. *Int. J. Food Microbiology*, 14(1), 51-57.
134. De Smedt, J.M. 1998. AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods. *Int. J. Food Microbiology*, 45(1), 25-28.
135. Kung, D.H., Fung, D.Y.C. 2000. Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiology*, 54(1-2), 127-132.
136. Pignato, S., Marino, A.M., Emanuele, M.C., Iannotta, V., Caracappa, S., Giammanco, G. 1995b. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonellae in foods. *Appl. Environ. Microbiology*, 61(5), 1996-1999.

137. Perry, J.D., Ford, M., Taylor, J., Jones, A.L., Freeman, R., Gould, F.K. 1999. ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. J. Clinical Microbiology, 37(3), 766-768.
138. 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.
139. Scanga, J.A., Grona, A.D., Belk, K.E., Sofos, J.N., Bellinger, G.R., Smith, G.C. 2000. Microbiological contamination of raw beef trimmings and ground beef. Meat Science, 56, 145-152.
140. O'Donoghue, D., Winn, E. 1993. Comparison of the MSRV method with an in-house conventional method for the detection of *Salmonella* in various high and low moisture foods. Lett. Appl. Microbiology, 17(4), 174-177.
141. Poisson, D.M. 1992. Novobiocin, brilliant green, glycerol, lactose agar: a new medium for the isolation of *Salmonella* strains. Research in Microbiology, 143 (2), 211-216.
142. Cox, J.M. 1993. Lysine-mannitol-glycerol agar, a medium for the isolation of *Salmonella* spp., including *S. typhi* and atypical strains. Applied and Environmental Microbiology, 59 (8), 2602-2606.
143. June, G.A., Sherrod, P.S., Hammack, T.S., Amaguanna, R.M., Andrews, W.H. 1996. Relative effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp. from raw flesh, highly contaminated foods, and poultry feed: Collaborative study. J. AOAC Int., 79(6), 1307-1323.
145. Sarlin, L.L., Barnhart, E.T., Caldwell, D.J., Moore, R.W., Byrd, J.A., Caldwell, D.Y., Corrier, D.E., Deloach, J.R., Hargis, B.M. 1998. Evaluation of alternative sampling methods for *Salmonella* critical control point determination at broiler processing. Poultry Science, 77 (8), 1253-1257.
146. Conner, D.E., Bilgili, S.F. 1994. Skin attachment model for improved laboratory evaluation of potential carcass disinfectants for their efficacy against *Salmonella* attached to broiler skin. Journal of Food Protection, 57 (8), 684-688.
147. Kotula, L.K.; Davis, M.E. 1999. Broiler skin sampling for optimum recovery of *Salmonella* spp. J. Food Protection, 62(3), 284-286.
148. White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes and Infection, 4, 405-412.
149. Yamaguchi, K., Mathai, D., Biedenbach, D.J., Lewis, M.T., Gales, A.C., Jones, R.N. 1999. Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum β -lactam antimicrobial agents tested against over 2000 clinical isolates from 22 medical centres in Japan. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 34, 123-134.
150. Stapleton, P., Shannon, K., Phillips, I. 1995. The ability of β -lactam antibiotics to select mutants with depressed β -lactamase synthesis from *C. freundii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 36 (3), 483-496.
151. Manle, T., Khan, S., Brozel, V.S., Veith, W.J., Gouws, P.A. 1998. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. Letters in Applied Microbiology, 26 (4), 253-258.
152. Martel, J.L., Tardy, F., Brisabois, A., Lailier, R., Coudert, M., Chaslus-Dancla, E. 2000. The French antibiotic resistance monitoring proGrams. International Journal of Antimicrobial Agents, 14, 275-283.
153. Kambal, A.M. 1996. Antimicrobial susceptibility and serogroups of *Salmonella* isolates from Riyadh, Saudi Arabia. International Journal of Antimicrobial Agents, 7, 265-269.

154. Ling, J.M., Lo, N.W.S., Ho, Y.M., Kam, K.M., Ma, C.H., Wong, S.C., Cheng, A.F. 1996. Emerging resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhi in Hong Kong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 7, 161-166.
155. Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Samosornsuk, S., Kaneko, K., Ogawa, M. 1998. Significant increase in antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. *Veterinary Microbiology*, 62, 73-80.
156. Gashe, B.A., Mpuchane, S. 2000. Prevalence of salmonellae on beef products at butcheries and their antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Science*, 65 (5), 880-883.
157. Prats, G., Mirelis, B., Llovet, T., Munoz, C., Miro, E., Navarro, F. 2000. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (5), 1140-1145.
158. Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., pestana, N. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 97-103.
159. Zhao, S., Datta, A.R., Ayers, S., Friedman, S., Walker, R.D., White, D.G. 2003. Antimicrobial resistance *Salmonella* serovars isolated from imported foods. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 87-92.
160. Brown, A.W., Rankin, C.R., Platt, D.J. 2000. Detection and characterisation of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *FEMS Microbiology Letters*, 191, 145-149.
161. Siegrist, H.H., Nepa, M.C., Jacquet, A. 1999. Susceptibility to levofloxacin of clinical isolates of bacteria from intensive care and haematology/oncology patients in Switzerland: a multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, suppl. C, 51-54.
162. Ramos, J.M., Ales, J.M., Cuenca-Estrella, M., Fernandez-Roblas, R., Soriano, E. 1996. Changes in susceptibility of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella virchow* to six antimicrobial agents in a Spanish hospital, 1980-1994. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 (1), 85-88.
163. Aseffa, A., Gedlu, E., Asmelash, T. 1997. Antibiotic resistance of prevalent *Salmonella* and *Shigella* strains in northwest Ethiopia. *East African Medical Journal*, 74 (11), 708-713.
164. Gür, D., Ünal, S., Akalın, H.E. 1995. Resistance patterns in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 6, 23-26.