

Non-tifoidal *Salmonella* Gastroenteritin Neden Olduğu Küresel Yük

Shannon E. Majowicz,¹ Jennie Musto,³ Elaine Scallan,⁶ Frederick J. Angulo,⁶ Martyn Kirk,^{4,5} Sarah J. O'Brien,⁹ Timothy F. Jones,⁸ Aamir Fazil,² ve Robert M. Hoekstra,⁷ Enterik Hastalık 'Hastalık Yükü' Çalışmaları Üzerine Uluslararası İşbirliği

¹Center for Food-borne, Environmental and Zoonotic Infectious Diseases and ²Laboratory for Food-borne Zoonoses, Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario, Canada; ³Communicable Diseases Branch, New South Wales Department of Health, and ⁴Department of Health and Ageing and ⁵Australian National University Canberra, Australia; ⁶Enteric Diseases Epidemiology Branch, ⁷Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Zoonotic, Vectorborne, and Enteric Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia; ⁸Tennessee Department of Health, Nashville; and ⁹School of Translational Medicine, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

Non-tifoidal *Salmonella* gastroenteritin küresel yükünü tahmin etmek amacıyla, laboratuvara dayalı sürveyans yanında (1) ileriye dönük nüfusa dayalı çalışmalar, (2) “çarpan çalışmaları”, (3) hastalık bildirimleri, (4) geri dönen gezgin verileri ve (5) dış değer tahmini gibi özel çalışmalardan elde edilen mevcut verileri sentezledik. Küresel bir vaka sayısı elde etmek üzere toplanan bölgesel vaka sayılarını hesaplamak amacıyla 21 Küresel Hastalık Yükü bölgesi için nüfus projeksiyonlarına insidans tahminleri uyguladık. Belirsizlik hesaplamaları Monte Carlo simülasyonu kullanılarak yapılmıştır. Her yıl küresel olarak *Salmonella* türlerine bağlı 93,8 milyon gastroenterit vakası (5. ile 95. yüzdelik dilim, 61,8-131,6 milyon) ile 155.000 ölüm (5. ile 95. yüzdelik dilim, 39.000-303.000 ölüm) meydana geldiğini hesapladık. Bu vakaların 80,3 milyonunun gıda kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir. *Salmonella* enfeksiyonu, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde önemli bir yük teşkil etmektedir. *Salmonella*'nın gıda ve diğer yollarla bulaşmasını azaltmaya yönelik çabalar küresel ölçekte uygulanmalıdır.

Salmonella türleri, akut gastroenteritin önde gelen bakteriyel nedenidir. *Salmonella* enfeksiyonlarının küresel insan sağlığı üzerindeki etkisi henüz hesaplanmamasına rağmen, gastroenterit dünya çapında hem 5 yaşındaki çocuklarda [1, 2] hem de genel nüfusta önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir [3]. Dört gelişmiş ülkede yapılan bir çalışmada, Scallan ve arkadaşları [3] ishali hastalık insidansının kişi-yılbaşına 0,44 ila 0,99 atak arasında değiştiğini hesaplamışlardır; ihtiyatlı bir tahminle, öyle bir insidans dünya çapında her yıl 2,8 milyar ishali hastalık vakası anlamına gelmektedir. Halk sağlığı hedeflerini etkili bir şekilde belirlemeye ve hastalık yükünü azaltmaya yönelik kaynakları tahsis etmek için *Salmonella* türlerinin ve diğer gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu ishali hastalıkların yükünün doğru hesaplamalarına ihtiyaç bulunmaktadır. Yakın zamanda, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), küresel gıda kaynaklı hastalık tahminleri sağlamak için Gıda Kaynaklı Hastalık Yükü Epidemiyoloji Referans Grubunu kurmuştur [4].

Laboratuvara dayalı sürveyans, eğilimler konusunda bilgi sağlasa da hastalık yükü yeterince iyi hesaplanmamaktadır. [5–12]. Laboratuvara dayalı bir sürveyans sisteminde tespit edilebilmesi için hasta bir kişinin tıbbi yardım alması, bir numune (genellikle dışkı) vermesi gerekir; laboratuvar patojeni test etmeli ve pozitif bir bulgu bildirmeli ve laboratuvar tarafından doğrulanmış enfeksiyon halk sağlığı yetkilileri tarafından tespit edilmelidir. Bu nedenle, laboratuvara dayalı sürveyanstaki vakalar, toplam vakaların bir kısmını temsil etmektedir. Birkaç ülke, laboratuvara dayalı sürveyans kapsamındaki eksik saptamanın derecesini belirlemek için ya ileriye dönük nüfusa dayalı çalışmalar ya da kesitsel araştırmalar yürütmüştür [6, 11, 13–16]. Ancak, küresel tahminleri hesaplamak zordur çünkü birçok ülke, özellikle gelişmekte olan ülkeler, yetersiz sürveyans verilerine sahiptir.

2000 yılında, Crump ve arkadaşları [17] mevcut verileri özetleyerek ve verilerin eksik olduğu ülkeler ve bölgeler için tahminler yaparak tifo ateşinin küresel yükünü tahmin etmişlerdir. DSÖ, gıda kaynaklı hastalıkların küresel yükünü tahmin etmek için benzer bir yaklaşım önermiştir [18]. Bu nedenle, non-tifoidal *Salmonella* gastroenteritin küresel yükünü tahmin etmek için literatürden, özel çalışmalardan ve laboratuvara dayalı sürveyanstan elde edilen mevcut verileri sentezledik.

YÖNTEMLER

Bölgesel insidans. Dünya nüfusunu, 2005 Küresel Hastalık Yükü, Yaralanmalar ve Risk Faktörleri Çalışması tarafından belirlenen şekilde 21 bölgeye ayırdık (KHY; Tablo 1) [19]. Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İşler Departmanı, Nüfus Birimi 2005 yılı medyan doğurganlık değişkeni bölgesel nüfus tahminlerini kullandık [20] ve bölgesel popülasyonları stokastik modele nokta tahminleri olarak (yani, belirsizlik olmadan) dahil ettik.

Her KHY bölgesinde *Salmonella* gastroenterit insidansını tahmin etmek için bir veri kaynakları hiyerarşisi kullandık (Tablo 1). İdeal kaynağımız, hastalığı belirlemek ve numune toplamak için bir grup bireyi takip eden ve nüfustaki *Salmonella* enfeksiyonu insidansını tahmin eden ileriye dönük nüfusa dayalı bir çalışmaydı. KHY bölgesindeki bir ülkede böyle bir çalışma yapılmışsa, bu insidans tahmini tüm bölge için kullanılmıştır. Bu veriler mevcut değilse, bölgede yapılan “çarpan çalışmalarından” elde edilen verileri kullandık. Çarpan çalışmaları, *Salmonella* insidansını, laboratuvara dayalı sürveyanstan tespit edilen laboratuvar onaylı enfeksiyonların insidansını, eksik tespiti ayarlayan *Salmonella*'ya özgü bir çarpanla çarparak hesaplamaktadır. KHY bölgesindeki bir ülkede daha önce çarpan çalışması mevcutsa, bu insidans tahmini tüm bölge için kullanılmıştır.

Bir KHY bölgesinde ileriye yönelik nüfusa dayalı bir çalışma veya bir çarpan çalışması mevcut değilse, bölgedeki ülkelerin ortalama hastalık bildirim verilerini yani bölgedeki ülkeler arasındaki ortalamayı kullandık. Eksik saptamayı hesaba katmak için, bildirim verileri literatürden elde edilen *Salmonella*'ya özgü çarpan tahmini ile çarpılmıştır. Hastalık bildirim verileri mevcut değilse, bölgedeki bir veya daha fazla ülkeden dönen yabancı gezginlerde *Salmonella* insidansına ilişkin bir tahmin kullandık ve iki düzeltme yaptık. Yabancı gezginlerdeki insidans, kendi ülkelerine döndükten sonra tıbbi destek arayışına giren ve dışkı numunesi veren gezginlerin yalnızca bir kısmını temsil ettiği için, Literatürden *Salmonella*'ya özgü bir çarpan tahmini kullanarak eksik saptama için düzeltme yaptık. Potansiyel olarak bölgesel serotiplere önceden maruz kalmamış olma veya farklı maruz kalma riskleri nedeniyle, yabancı gezginlerin enfeksiyona duyarlılığı, yerleşik nüfusun duyarlılığından büyük olasılıkla daha fazla olduğu için, verilerin izin verdiği yerlerde bölgelere göre, geri dönen gezginlerin insidans tahminlerini yerleşik nüfustan gelenlerle karşılaştırarak bir "düzeltme faktörü" oluşturduk. Yukarıdaki veri kaynaklarından hiçbirinin mevcut olmadığı KHY bölgelerinde, veriler coğrafi olarak en yakın KHY bölgesinden ileriye dönük nüfusa dayalı ve çarpan çalışması verileriyle hesaplanmıştır, çünkü bu tür veriler diğer veri kaynaklarından daha üstün kabul edilmiştir.

Hastalık bildirim verileri kurumsal web sitelerinden

alınmıştır. *Salmonella*'nın insidansı ve eksik saptanması ile ilgili tahminler, 1966-2007 dönemi için yayınlanmış bilimsel literatürden “*Salmonella*” anahtar kelimesi ve aşağıdaki anahtar kelimelerden herhangi biri kullanılarak belirlenmiştir: “insidans”, “prevalans”, “halk sağlığı”, “mortalite”, “nüfus sürveyansı”, “sürveyans”, “yük”, “dağılım”, “alan”, “konum”, “gelişmekte olan ülkeler”, “gelişmiş ülkeler”, “ülke”, “epidemioloji”, “coğrafya” ve “gözlem” kelimesinin değişik şekilleri. Uzmanlara danışılarak ve yukarıda belirtilen makalelerden çapraz atıflarda bulunularak ek makaleler elde edilmiştir. Ayrıca, yayınlanmamış çalışmaları belirlemek için *Salmonella*'nın sürveyansı, izolasyonu, tanımlanması ve antimikrobiyal direnç testlerine katılan uluslararası bir laboratuvarlar ve bireyler ağı olan WHO Global Salm-Surv üyelerine danıştık. [21].

Küresel insidans. Her KHY bölgesi için tahmini nüfus, tahmini *Salmonella* gastroenterit insidansı ile çarpılmıştır. Ortaya çıkan yıllık vaka sayısı, dünya çapındaki yıllık *Salmonella* gastroenterit vaka sayısını elde etmek için tüm bölgelerde toplanmıştır. Bu hesaplama, tahmin edilen vakalardaki belirsizlikleri hesaba katmak için Monte Carlo simülasyonu kullanılarak tekraren yapılmıştır. Her bir insidans tahmini, bir PERT dağılımı olarak modellenmiştir [22]. PERT dağılımı, en olası değere yakın değerlere vurgu yapan ve genellikle uzman görüşü verilerini modellemek için kullanılan düzgün bir eğridir. Literatürde rapor edilen insidans tahmini, karşılık gelen PERT dağılımında en olası değer olarak kullanılmıştır. İnsidans tahminlerinin çoğu için, literatürde güven aralıkları rapor edilmiştir ve bu nedenle PERT dağılımında minimum ve maksimum değerler olarak kullanılmıştır. Bölge başına 11 güven aralığı olduğunda, rapor edilen en düşük ve en yüksek değerler, minimum ve maksimum değerler olarak kullanılmıştır. Hastalık bildirim verilerinin güven aralıkları olmadığı için bu verileri kullandığımız bölgelerde minimum ve maksimum değerler olarak bölge içindeki en düşük ve en yüksek ülkeye özgü insidansları kullandık.

Dünya çapında *Salmonella*'ya bağlı yıllık gastroenterit vakalarının tahminlerinin dağılımı, 10.000 yineleme ve Latin Hypercube örnekleme ile @RISK, sürüm 4.5.2'de (Palisade Corporation) oluşturulmuştur. Yıllık ölüm sayısını belirlemek amacıyla, tek tip bir dağılımı parametre haline getirmek için yayınlanmış iki ölüm vakası oranını kullandık: %0,0003 [15] ve %0,003 [23]. Her bir girdi parametresi ile yıllık vaka sayısı arasındaki korelasyon katsayılarını sıralayarak tahmini yıllık vaka sayısı üzerinde hangi parametrelerin en fazla etkiye sahip olduğunu belirlemek için bir duyarlılık analizi yapılmıştır. En etkili model parametresinin, seçili model varsayımlarının ve sonuçta ortaya çıkan insidansı coğrafi olarak çevreleyen bölgelerden belirgin şekilde daha düşük görünen bölgelerin potansiyel etkisinin araştırılması için senaryolar çalıştırılmıştır.

Gıda kaynaklı olan tahmini *Salmonella* gastroenterit

Tablo 1. Salmonella Gastroenteritin Küresel Yükü, 2006 Dolaylarında, 2005 Küresel Hastalık Yükü, Yaralanmalar ve Risk Faktörleri Çalışması (KHY) Bölgesi Tarafından Gösterilmiş ve 6 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Alt Bölgesine Göre Gruplandırılmıştır

KHY Bölgesi	2006 Nüfusu	Mevcut insidans verisi kaynakları			Tahmini küresel yük, ortalama değer		
		Veri tipi	100.000 kişi-yıl başına insidans		Vaka sayısı	Ölüm sayısı	İnsidans 100.000 kişi-yıl başına
			En olası değer (aralık)	Referans(lar)			
EMRO							
Kuzey Afrika/Orta Doğu	410.800.000	Çarpan	124 (58–267)	[27]	563,000	900	140
Toplam	410.800.000	563,000	900	140
AFRO							
Sahra Altı Afrika, Orta	84.412.000	Geri dönen gezgin	93 (43–205)	[30]	85,000	100	100
Sahra Altı Afrika, Doğu	314.208.000	Geri dönen gezgin	471 (294–755)	[30]	1.488,000	2500	470
Sahra Altı Afrika, Güney	68.021.000	Geri dönen gezgin	69 (48–98)	[30]	46,000	1100	70
Sahra Altı Afrika, Batı	300.598.000	Geri dönen gezgin	279 (180–432)	[30]	839,000	1400	280
Toplam	767.239.000	2.458,000	4100	320
WPRO							
Asya Pasifik, Yüksek Gelir	180.468.000	Çarpan	32 (15–69)	[13]	64,000	100	40
Asya, Orta	76.815.000	Geri dönen gezgin	39 (28–53)	[30]	29,000	1100	40
Avustralasya	24,407,000	Çarpan	257 (79–480)	[11]	66,000	100	270
Okyanusya	9,002,000	Dış değer tahmini	257 (79–480)	[11]	24,000	1100	270
Toplam	1,634,817,000	53,610,000	88,500	3280
SEARO							
Asya, Güney	1,498,563,000	Geri dönen gezgin	474 (330–681)	[30]	7,034,000	11,600	470
Asya, Güneydoğu	573,711,000	Dış değer tahmini	3,600 (1688–7763)	... ^a	22,805,000	37,600	3980
Toplam	2,072,274,000	29,839,000	49,200	1440
EURO							
Avrupa, Orta	118.750.000	Hastalık bildirim	160 (39–322)	[28]	2.835.000	4700	2390
Avrupa, Doğu	211.614.000	Hastalık bildirim	40 (23–69)	[28]	1.265.000	2100	600
Avrupa, Batı	407.707.000	Nüfus	220 (110–430)	[6]	965,000	1600	240
Toplam	738.071.000	5.065.000	8400	690
AMRO							
Kuzey Amerika, Yüksek Gelir	332.117.000	Çarpan	495 (250–870)	[14, 15]	1.716.000	2800	520
Karayipler	40.525.000	Geri dönen gezgin	107 (86–134)	[30]	42,000	1100	110
Latin Amerika, And	49.517.000	Geri dönen gezgin	80 (60–106)	[30]	39,000	1100	80
Latin Amerika, Orta	215.172.000	Geri dönen gezgin	108 (77–150)	[30]	229,000	400	110
Latin Amerika, Güney	58,371,000	Geri dönen gezgin	80 (60–106)	[30]	46,000	1100	80
Latin Amerika, Tropikal	192.735.000	Geri dönen gezgin	80 (60–106)	[30]	151,000	300	80
Toplam	888.437.000	2.222.000	3,700	250
Küresel toplam ^b	6.511.638.000	93.757.000	155,000	1140

NOT. KHY bölgeleri, bölgeler arasındaki ülkelerin çoğunluk örtüşmesine dayalı olarak, kabaca DSÖ alt bölgelerine ayrılmıştır. Hastalık bildirim, hastalık bildirim verileri artı eksik saptama çarpanı; dış değer tahmini, coğrafi olarak yakın bölgelerden dış değer tahmini; çarpan, çarpan çalışması (eksik saptama için ayarlanmış laboratuvar temelli insidans); nüfus, ileriye dönük nüfus temelli insidans çalışması; geri dönen gezgin; geri dönen gezgin verileri ve eksik saptama çarpanı ve duyarlı gezgin düzeltme faktörü.

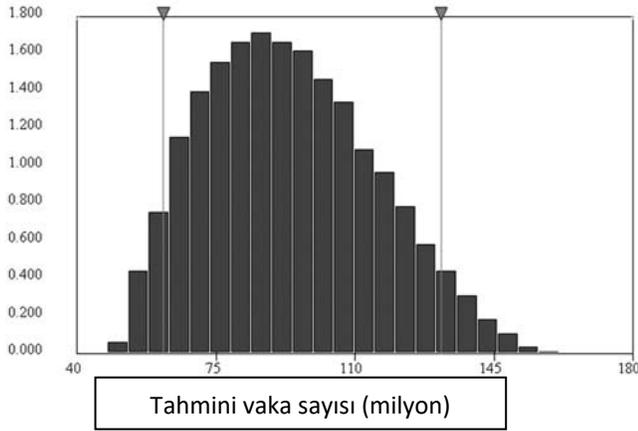
^a Ran Lu, Enterik Enfeksiyon Hastalıkları Kontrol ve Önleme Şubesi, Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, yayınlanmamış veriler

^b Rakamlar yuvarlamadan dolayı birbirini tutmayabilir.

vakalarının oranını tahmin etmek için, Gıda kaynaklı orana ilişkin yayınlanmış 6 tahminden ortalama "gıda kaynaklı oranı" kullandık [5, 8, 11, 24–26]. Salmonella türlerine bağlı gıda kaynaklı gastroenterit vakalarının yıllık sayısını tahmin etmek için gıda kaynaklı vakaların oranı yıllık vaka sayısı ile çarpılmıştır. Bu tür kaynak atfı değerleriyle ilişkili belirsizlik nedeniyle, yayınlanmış literatürdeki en düşük (%55) [24] ve en yüksek (%95) [5, 26] oranları kullanarak tahminleri de hesapladık.

SONUÇLAR

Veri mevcudiyeti. "Salmonella" anahtar kelimesine sahip 14.806 makale bulduk ve bu sayı, ikincil anahtar kelimelerle ilişkilendirildiğinde, 724'ü insanlarla ilgili olmak üzere 1.619 adet makaleye düşmüştür. Bunlar arasından, 1990'larda İngiltere'de *Salmonella* enfeksiyonunun toplumdaki insidansını tahmin eden ileriye dönük nüfusa dayalı bir çalışma tespit ettik [6]. Bu insidans "Avrupa, Batı" bölgesi için dış değer tahmini olarak kullanılmıştır.



Şekil 1. Dünya çapında tahmini yıllık *Salmonella* gastroenterit vakası sayısı için makul değerlerin dağılımı, 2006 dolaylarında, 5. ve 95. yüzdilik dilimleri göstermektedir.

5 KHY bölgesindeki altı ülkede, eksik saptamaya göre ayarlanmış laboratuvar onaylı vakaları kullanan “çarpan çalışmaları” bulunmaktaydı. Avustralya'nın tahmini *Salmonella* insidansı [11] “Avustralasya” bölgesi için, Ürdün'ün verileri [27] “Kuzey Afrika/Orta Doğu” bölgesi için, Japonya'nın verileri [13] “Asya Pasifik, Yüksek Gelir” bölgesi için ve Çin'in verileri (Ran Lu, Enterik Enfeksiyon Hastalık Kontrol ve Önleme Şubesi, Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, yayınlanmamış veriler) “Asya, Doğu” bölgesi için dış değer tahmini olarak kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri [15] ve Kanada'nın [14] tahmini insidansının ortalaması alınmış ve “Kuzey Amerika, Yüksek Gelir” bölgesi için dış değer tahmini olarak kullanılmıştır. İki KHY bölgesi, bölge içindeki bir veya daha fazla ülke için mevcut hastalık bildirim verilerine sahipti. 2004 verilerinin kullanıldığı Slovenya hariç, 2005 yılı için Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi [28] verileri kullanılmıştır. Bölgelerdeki ülkelerden gelen hastalık bildirim verilerinin ortalaması alınmış ve Hollanda'nın *Salmonella*'ya özel çarpanıyla çarpılmıştır [29] ve ortaya çıkan insidans tahmini ilgili “Avrupa, Orta” ve “Avrupa, Doğu” bölgelerine uygulanmıştır.

11 KHY bölgesinde, geri dönen İsveçli gezginlerde *Salmonella* gastroenterit insidansı hakkında bilgi mevcuttu [30].

Bu insidanslar Hollanda'nın *Salmonella*'ya özel çarpanıyla [29] ve sonra da belirli bir bölgede seyahat eden İsveçliler ile yerleşik nüfus arasındaki duyarlılık farklılıklarını hesaba katmak için düzeltme faktörü ile çarpılmıştır. Düzeltme faktörü, 1 bölge için 2 insidans tahmininin mevcut olması gerçeğinden yararlanılarak hesaplanmıştır (“Kuzey Afrika/Orta Doğu”): biri Ürdün'de [27] ve biri de İsveçli gezginler üzerinde [30] yapılan bir çarpan çalışmasından, eksik saptama açısından düzeltilmiş şekilde. Bu 2 tahminin oranı (0,0678), seyahat eden İsveçlilerin bölge sakinleri karşısında varsayımsal artan duyarlılığını düzeltmek için kullanılmıştır.

Son 2 KHY bölgesi için, komşu bölgelerin verileri

kullanılarak dış değer tahmini yapılması gerekmiştir. Avustralya çarpan çalışmasından hesaplanan insidans [11] “Okyanusya” bölgesi için dış değer tahmini olarak kullanılmış ve Çin çarpan çalışmasından hesaplanan insidans (Ran Lu, Enterik Enfeksiyon Hastalık Kontrol ve Önleme Şubesi, Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi; yayınlanmamış veriler) “Asya, Güneydoğu” bölgesi için dış değer tahmini olarak kullanılmıştır.

Dünya çapında *Salmonella* gastroenterit vakalarının yıllık sayısına ilişkin tahminlerin dağılımı Şekil 1'de gösterilmektedir. Genel olarak, non-tifoidal *Salmonella*'ya bağlı 93.757.000 gastroenterit vakasının yılda 61.768.000 (5. yüzdelik) ile 131.634.000 (95. yüzdelik) arasında değiştiğini tahmin ediyoruz (Tablo 1). 100.000 kişi başına tahmini yıllık ölüm sayısı ve insidans KHY bölgesi, DSÖ alt bölgesi ve genel olarak gösterilmektedir (Tablo 1). Non-tifoidal *Salmonella*'nın dünya çapında her yıl 155.000 ölüme (5. ila 95. yüzdelik dilim, 39.000-303.000 ölüm) neden olduğunu tahmin ediyoruz. Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarının oranının yayınlanmış değerlerinin ortalamasını uygulayarak (%86), 93.757.000 vakadan 80.318.000'inin gıda kaynaklı olduğunu ve gıda kaynaklı vakaların sayısının muhtemelen 51.566.000 (%55'inin gıda kaynaklı olduğunu varsayarak) ile 89.069.000 (%95'inin gıda kaynaklı olduğunu varsayarak) arasında olduğunu hesapladık.

Tahmini yıllık vaka sayısı üzerinde en fazla etkiye sahip girdi parametresi, “Asya, Doğu” bölgesi için insidans tahmini olmuştur (Tablo 2). Etkisini göstermek için 4 senaryo çalıştırdık: 1'inde insidans 10 kat azalmış şekilde, 1'inde insidans 2 kat azalmış şekilde ve 2'sinde hiyerarşide daha düşük olarak kabul edilen diğer kaynaklardan gelen verileri kullanarak (geri dönen gezgin verileri ve Japonya verileri kullanarak yapılan dış değer tahmini). Ayrıca, duyarlı gezgin düzeltme faktörümüzü 2 kat (yani, gezginler ~7 kat daha duyarlı) ve 7 kat (yani, gezginler ~2 kat daha duyarlıdır) azaltarak, bir bölgeye seyahat edenlerin bölge

Tablo 2. Girdi Parametreleri ile Dünya Çapında Yıllık *Salmonella* Gastroenterit Vaka Sayısının Dağılımı Arasındaki Korelasyon; En Önemli 5 Değişkeni Göstermektedir

Sıra	Oran	Korelasyon katsayısı
1	“Asya, Doğu” bölgesi için insidans tahmini	0917
2	“Asya, Güneydoğu” bölgesi için insidans tahmini ^a	0.391
3		
	A “Asya, Güney” bölgesi için insidans tahmini	0.059
	B “Avrupa, Orta” bölgesi için insidans tahmini	0.055
4	“Kuzey Amerika, Yüksek Gelir” bölgesi için insidans tahmini	0.024
5		
	A “Sahra Altı Afrika, Doğu” bölgesi için insidans tahmini	0.016
	B “Avrupa, Doğu” bölgesi için insidans tahmini	0.016
	C “Avrupa, Batı” bölgesi için insidans tahmini	0.015

^a “Asya, Doğu” bölgesinden çıkarım yapılarak tahmin edilen “Asya, Güneydoğu” insidansı

sakinlerinden ~ 15 kat daha duyarlı olduğu varsayımımızın etkisini değerlendirdik. "Asya, Güney" bölgesi için insidans tahmini coğrafi benzerlerinden belirgin şekilde düşük olduğundan, etkisini hem 2 kat hem de 10 kat artış kullanarak değerlendirdik (Tablo 3).

TARTIŞMA

Her yıl yaklaşık 80,3 milyonu gıda kaynaklı olmak üzere tahmini 93,8 milyon hastalık ve 155.000 ölümler birlikte, non-tifooidal *Salmonella*'nın küresel insan sağlığı üzerindeki etkisi yüksektir. Tahmini toplam vaka sayısı, daha önce yayınlanmış ishal hastalığı tahminleri göz önüne alındığında makuldür [3] ve bu da, ishaller hastalıkların toplam yıllık sayısının dünya çapında 2,8 milyar civarında olabileceğini düşündürmektedir. Eğer öyleyse, *Salmonella* enfeksiyonları bu hastalıkların yaklaşık %3'ünü temsil etmektedir. Dünya çapında, gıdaların seri üretimi ve dağıtımını patojenleri hızla yaymaktadır; bu da, antibiyotik kullanımına bağlı çoklu ilaç direnci zorluğuyla birleştiğinde, *Salmonella* enfeksiyonunu kontrol etmek ve önlemek için yeni zorluklar yaratmaktadır. Gıda güvenliğinin iyileştirilmesi ve *Salmonella* enfeksiyonu yükününün azaltılması, küresel ölçekte etkili gıda güvenliği müdahalelerinin teşvik edilmesi ve uygulanması anlamına gelmektedir.

21 KHY bölgesinin her birinde mevcut en iyi verileri kullanarak *Salmonella* gastroenteritin küresel yükünü hesapladık. Hiyerarşik yaklaşımımız, hastalık yükü tahminlerini hesaplamak için yayınlanmış verilerin yanı sıra özel çalışmalardan ve sürveyanstan elde edilen bilgileri kullanmamıza olanak sağlamıştır. Bu yöntemler, özellikle *Campylobacter*, *Shigella* ve *Yersinia* türleri gibi diğer patojenlere ilişkin veriler nedeniyle, diğer gıda kaynaklı patojenler için faydalı olabilir; bunlar muhtemelen *Salmonella* türlerinde karşılaşılanlarla aynı veri mevcudiyeti sorunlarına sahip olacaktır. İleriye dönük nüfusa dayalı insidans çalışmalarını, insidans belirlemek için altın standart olarak kabul ettik ve diğer veri kaynakları yerine tercih ederek bunları kullandık. Bununla birlikte, bu çalışmalar karmaşık ve pahalıdır, bu

nedenle çok az ülke bunları enterik hastalık insidansını tahmin etmek için kullanmıştır [6, 16].

İleriye dönük çalışma yerine, çeşitli ülkelerdeki araştırmacılar, eksik saptamayı düzeltmek için laboratuvar tarafından doğrulanmış enfeksiyonların insidansını bir çarpanla çarparak *Salmonella* gastroenterit insidansını tahmin eden çarpan çalışmaları yürütmüştür. Çarpan; genel nüfus ve klinik tanı laboratuvarlarının kesitsel araştırmalarından elde edilmiştir. Her bir sürveyans adımı (bakım, numune gönderimi, laboratuvar testi) vakaların sürveyansa kaybedilme sıklığını tahmin eden çarpan çalışmaları, Avustralya [11], Kanada [14], Amerika Birleşik Devletleri [15], Ürdün [27], Japonya [13] ve Çin'de (Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi; yayınlanmamış veriler) gerçekleştirilmiştir.

Her ikisi de Avrupa'da olan iki KHY bölgesi için, ileriye dönük nüfusa dayalı çalışma veya çarpan çalışması bulunmamaktaydı, ancak mevcut hastalık bildirim verileri, laboratuvar tarafından doğrulanmış *Salmonella* enfeksiyonunun ortalama insidansını belirleyerek ve literatürden alınan değerleri kullanarak eksik saptamaya yönelik düzeltme yaparak hastalık yükünü tahmin etmemize olanak sağlamıştır. *Salmonella*'ya özel çarpanlar İngiltere'de 3,2 [6], Avustralya'da 7 [31], Hollanda'da 14,3 [29], Kanada'da 25 [14], Amerika Birleşik Devletleri'nde 38 [15], Japonya'da 64 [13] arasında değişmektedir. Coğrafi yakınlık nedeniyle, bu 2 Avrupa bölgesindeki eksik saptamayı ayarlamak için 14,3'lük Hollanda *Salmonella* verisine özel çarpan [29] kullanılmıştır. Bununla birlikte, çeşitli sürveyans yöntemleri ve sosyoekonomik gelişme seviyeleri göz önüne alındığında, laboratuvarca doğrulanmış *Salmonella* enfeksiyonu vakalarının eksiksizliğinin ve eksiklik saptamasının tüm Avrupa ülkelerinde aynı olması pek olası değildir. Bu nedenle, Hollanda çarpanı muhtemelen nüfus insidansının ihtiyatlı bir tahminini sağlamaktadır.

Afrika, Asya (orta, güney ve güneydoğu), Latin Amerika ve Karayipler'de bölgesel insidans verilerinin eksikliğinin üstesinden gelmek için, bu bölgelerde laboratuvar tarafından doğrulanmış vakaların insidansını hesaplamak için seyahatle ilişkili *Salmonella* enfeksiyonları (belirsizlik bakımından düzeltilmiş şekilde) üzerine bir İsveç

Tablo 3. Salmonella Gastroenteritin Tahmini Yıllık Küresel Yükü, 2006 Dolaylarında, Farklı Senaryolarda

Değişken	Ortalama vaka sayısı	Ortalama ölüm sayısı	100.000 kişi-yıl başına ortalama insidans
Tablo 1'in Sonuçları	93,757,000	155,000	1140
Senaryo			
"Asya, Güney" bölgesinde tahmini insidansın 10 kat artması	157,059,000	259,000	2400
Duyarlı gezgin düzeltme faktörünün 7 kat azalması	153,916,000	254,000	2400
Duyarlı gezgin düzeltme faktörünün 2 kat azalması	103,783,000	171,000	1600
"Asya, Güney" bölgesinde tahmini insidansın 2 kat artması	100,790,000	166,000	1600
"Asya, Doğu" bölgesinde tahmini insidansın 2 kat azalması	55,639,000	92,000	850
"Asya, Doğu" bölgesinde tahmini insidansın 10 kat azalması	25,145,000	42,000	390
"Asya, Doğu" bölgesinin geri dönen gezgin verilerinden elde edilen tahmini insidans	22,545,000	37,000	350
("Asya Pasifik, Yüksek Gelir" bölgesinden) çıkarım yoluyla elde edilen tahmini "Asya, Doğu" insidansı	18,136,000	30,000	280

çalışmasından elde edilen verileri kullanarak yeni bir yaklaşım benimsedik. Bölgeler arasındaki göreceli riskin bir ölçüsü olarak bu tür verilerin kullanılması konsepti ilk olarak Ekdahl ve arkadaşları [30] tarafından İsveçli gezgin çalışmasında önerilmiştir. Yaygın olan belirli *Salmonella* serotiplerine karşı kazanılmış bağışıklığın, gezginlerin *Salmonella* ile enfekte olma olasılığının bölge sakinlerinden daha fazla olduğu anlamına gelebileceğini varsaydık. Denge sağlamak için, "Kuzey Afrika/Orta Doğu" bölgesinden dönen İsveçli gezginlerin insidansını Ürdün nüfusu için hesaplanan insidans tahminiyle karşılaştırarak bir düzeltme faktörü elde ettik ve seyahat edenlerin insidansın 15 kat daha fazla olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte, Ürdün'den daha az gelişmiş ülkelerin yerel nüfuslarının, Ürdün'deki muadillerine göre nispeten daha yetersiz beslenmesi ve *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı duyarlı olması muhtemeldir. Bu tür nüfuslarda, yerel duyarlılık bölgeye seyahat edenlerin duyarlılığına yaklaşabilir; bu nedenle, bu tür bölgeler için yapılan tahminler, gerçek insidansı önemli ölçüde düşük değerlendirecektir.

Burada kullanılan yöntemlerin, verilerle ilişkili gerçek belirsizliğin tam kapsamını yansıtmadığını kabul ediyoruz. Örneğin, bir bölgedeki veri kapsamıyla ilişkili belirsizliği yansıtmadık ve bu nedenle, yalnızca tek bir ülkenin bilgilerinin bulunduğu bölgeler ve birden fazla ülkenin bilgilerinin bulunduğu bölgeler arasında ayırım yapmadık. Ayrıca, değişkenlik ve belirsizlik arasında ayırım yapmadık. Ancak, *Salmonella* gastroenteritin küresel yükünü hesaplamak için mevcut verileri en iyi şekilde kullandık ve ana belirsizlik kaynaklarını yakalamaya çalıştık. Bu tür modellerde belirsizliği daha iyi karakterize etmek için daha fazla ilerlemeye ihtiyaç vardır.

Farklı türdeki hastalık yükü çalışmaları veya ülkeler veya bölgeler arasındaki çıkarıma dayalı dış değer bulma ile ilişkili kanıtların ağırlığı (örneğin, ileriye dönük hesaplamalar karşısında laboratuvara dayalı insidans hesaplamaları) veya belirsizliğine ilişkin şu anda herhangi bir fikir birliği veya kılavuz bulunmamaktadır. Bununla birlikte, ileriye dönük çalışmalardan uzaklaştıkça ve çalışmanın yürütüldüğü ülkeden uzaklaştıkça, kanıtların ağırlığının azaldığına ve belirsizliğin arttığına dair bir ölçüğün olduğu açıktır. Gelecekteki çalışmalar, örneğin, çalışma türüne göre belirsizlik dağılımlarının yayılımını artırarak ve ayrıca gerçekleştirilen çıkarıma dayalı dış değer bulmanın doğasının bir fonksiyonu olarak bazı bölgelerin sonuçlarındaki belirsizliği artırarak bunu hesaba katmalıdır.

Yıllık ölümleri tahmin etmek için %0,0003 [15] ile %0,003 [23] arasında değişen bir dizi olası vaka ölüm oranı değeri kullandık. Bununla birlikte, beslenmenin yetersiz olduğu ve sağlık hizmetlerine erişimin sınırlı olduğu ülkelerde *Salmonella* enfeksiyonu nedeniyle vaka-ölüm oranı ve dolayısıyla yıllık tahmini ölüm sayısı daha yüksek olabilir. Ne yazık ki, bu tahminleri iyileştirecek çok az yayınlanmış veri bulunmaktadır; bu nedenle burada bildirilen tahmini ölüm sayısı ılımlı bir değer olarak kabul edilmelidir. Bu çalışmayı, vaka ve ölüm sayılarıyla ölçülen *Salmonella*'nın neden olduğu gastroenteritin insan sağlığı yükünü değerlendirmekle sınırladık. Veri eksikliği nedeniyle hastaneye yatış, sakatlık, uzun vadeli komplikasyonlar veya ekonomik maliyetler açısından etkisini tahmin etmeye çalışmadık. Bu faktörler insan sağlığı üzerindeki yükü büyük ölçüde etkilemektedir ve

gelecekte dikkate alınmalıdır. Ayrıca, özellikle Sahra Altı Afrika gibi HIV'in yaygın olduğu bölgelerde önemli bir yük oluşturan invaziv *Salmonella* enfeksiyonunu da hesaba katmadık.

Gıda kaynaklı vakaların sayısını, gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarının tahmini oranının yayınlanmış değerlerinin ortalamasını alarak [5, 8, 11, 24-26] ve bu ortalamayı tahmini vaka sayımıza uygulayarak hesapladık. Bu kaba yaklaşım çeşitli sınırlamalara tabidir. İlk olarak, toplam vaka sayısına tek bir oran uyguladığımız için gıda kaynaklı *Salmonella* vakalarının oranının tüm dünya bölgelerinde aynı olduğunu varsaydık. Bununla birlikte, oran muhtemelen ülkeler ve bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Özellikle kaynaktan ve evde depolama sırasında daha sık kontaminasyon ve dezenfeksiyon eksikliği nedeniyle su yoluyla bulaşmanın öneminin muhtemelen daha fazla olduğu gelişmekte olan bölgeler için ülkeye ve bölgeye özgü gıda kaynaklı *Salmonella* bulaşması hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarının oranıyla ilgili yayınlanmış tüm tahminler şu anda gelişmiş ülkelerden geldiği için, gelişmekte olan ülkelere gelen bilgilere özellikle ihtiyaç duyulmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı oranın muhtemelen daha düşük olduğunu biliyoruz çünkü su kaynaklı oran muhtemelen daha yüksek. Bununla birlikte, bölgesel tahminlerin olmaması halinde, küresel bir değere ulaşmak için gıda kaynaklı oranın yayınlanmış tüm tahminlerinin bir ortalamasını çıkardık. Bu çalışmanın en büyük kısıtlaması, sonuçlarının önemli ölçüde yayınlanmamış Çin insidans tahminine bağlı olmasıdır. Bunu ele almak için, geri dönen gezgin verilerini kullanmanın ve Çin verileri yerine "Asya Pasifik, Yüksek Gelir" bölgesinden çıkarım yaparak tahmin yürütmenin etkisini araştırdık. Ne yazık ki, her iki alternatif veri kaynağının da kendine özgü önyargıları bulunmaktadır. Bunun gibi analizlere yönelik ana eleştiri, esas olarak gelişmiş ülkelere gelen verilerin kullanılması ve dolayısıyla gerçek hastalık insidansını önemli ölçüde düşük tahmin eden değerler vermesidir. Uluslararası epidemiyologlar ve laboratuvar bilim insanları ağı olan WHO Global Salm-Surv aracılığıyla, Çin'den yayınlanmamış bir çalışmayı saptayabildik ve bu çalışmanın, bu kalabalık bölgede *Salmonella* enfeksiyonu insidansını geri dönen yolcu verileri ve çıkarıma dayalı dış değer bulmaya kıyasla daha doğru bir şekilde tasvir ettiğini hissettik. Çin tahmini, diğer çarpan çalışmalarından önemli ölçüde daha yüksektir, ancak bu muhtemelen hastalık oranlarındaki gerçek nüfus farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda, "Asya, Doğu" ve diğer komşu bölgeler için geri dönen gezgin verilerinden daha yüksektir, ancak bunun nedeni muhtemelen yukarıda belirtildiği gibi geri dönen yolcu verileriyle ilişkili önyargıdır. Ne yazık ki, "Asya, Doğu" bölgesi için tahmin seçimimizi

doğrulamaya diğer bilgi kaynakları (örneğin hastalık bildirim verileri) mevcut değildi. Bu nedenle, bölgedeki insidansı en doğru şekilde temsil ettiğini düşündüğümüz verileri seçtik.

Salmonella, küresel olarak önemli bir yüke neden olmaktadır. Çeşitli sınırlamalara tabi olmakla birlikte, bu veriler belirli bölgelerde öncelik belirlemek için önemli bilgiler sağlamaktadır. Ayrıca, bu veriler, bazı bölgelerde insan kaynaklı gıda kaynaklı hastalıklar için geliştirilmiş halk sağlığı surveyansına olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Güney/Güneydoğu Asya ve dünya nüfusunun %39'unu oluşturan Güney Amerika gibi küresel nüfusun büyük bir oranına sahip olanlar da dahil olmak üzere, bazı bölgelerin kamuya açık hiçbir bildirim verisi bulunmamaktaydı. Bu iyi bir surveyans bilgisi eksikliği, küresel tahminin kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Örneğin, küresel yük tahminlerini iyileştirmek ve öncelik belirleme konusunda daha iyi bilgi sağlamak için WHO Global Salm-Surv gibi kapasite geliştirme girişimleri yoluyla, bu bölgelerdeki ülkelerde *Salmonella* enfeksiyonunun gerçek yükünün değerlendirilmesine öncelik verilmelidir.

SALMONELLA'NIN KÜRESEL YÜKÜ ÇALIŞMA GRUBU

Küresel *Salmonella* Yükü Çalışma Grubu üyeleri (yazarlar hariç, alfabetik sırayla) Donald Campbell, Birgitte De Jong, Henriette De Valk, Danilo Lo Fo Wong, Rob Lake, Ran Lu, Karin Nygard, Wilfred van Pelt, Paul Sockett, Kate Thomas, ve Hajime Toyofuku'dur.

Teşekkür Bölümü

İlk makale taslakların ve nihai sonuçların tartışılması için Uluslararası Enterik Hastalık "Hastalık Yükü" Çalışmaları İşbirliği üyelerine teşekkür ederiz. Yazarlar ayrıca Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda Kaynaklı Hastalık Yükü Epidemiyoloji Referans Grubuna yöntem ve sonuçlara yönelik eleştirel değerlendirmeleri için teşekkür etmektedir.

Potansiyel çıkar çatışmaları. Tüm yazarlar: çatışma yoktur.

Referanslar

1. Bern C, Martinez J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* 1992; 70:705-714.
2. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 2003; 81:197-203.
3. Scallan E, Majowicz SE, Hall G, et al. Prevalence of diarrhoea in the community in Australia, Canada, Ireland, and the United States. *Int J Epidemiol* 2005; 34:454-460.
4. Senior K. Estimating the global burden of foodborne disease. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:80-81.
5. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
6. Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *BMJ* 1999; 318:1046-1050.
7. de Wit MA, Koopmans MPG, Kortbeek LM, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and aetiology. *Am J Epidemiol* 2001; 154:666-674.
8. Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne dis-

- ease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 2002; 51:832-841.
9. Scallan E, Fitzgerald M, Collins C, et al. Acute gastroenteritis in Northern Ireland and the republic of Ireland: a telephone survey. *Commun Dis Public Health* 2004; 7:61-67.
10. Majowicz SE, Dore K, Flint JA, et al. Magnitude and distribution of acute, self reported gastrointestinal illness in a Canadian community. *Epidemiol Infect* 2004; 132:607-617.
11. Hall G, Kirk MD, Becker N, et al. OzFoodNet Working Group. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8):1257-1264.
12. Flint JA, Van Duynhoven YT, Angulo FJ, et al. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. *Clin Infect Dis* 2005; 41(5):698-704.
13. Kubota K, Iwasaki E, Inagaki S, et al. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. *Foodborne Path Dis* 2008; 5(5):641-648.
14. Thomas MK, Majowicz SE, Sockett PN, et al. Estimated number of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: pathogen-specific community rates. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2006; 17(4):229-234.
15. Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, et al; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2004; 38(Suppl 3):S127-S134.
16. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001; 154(7):666-674.
17. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 2004; 82(5):346-353.
18. World Health Organization. WHO consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases: taking stock and charting the way forward. Geneva: World Health Organization, 2006.
19. The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors study, operations manual, fi draft. 31 January 2008. http://www.globalburden.org/GBD_Study_Operations_Manual_Jan_31_2008.pdf. Accessed 10 December 2008.
20. United Nations Department of Economic and Social Affairs. World population prospects: the 2008 revision population database. <http://esa.un.org/unpp/> Accessed 28 December 2008.
21. Galanis E, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, et al. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(3):381-388.
22. Vose D. Risk analysis: a quantitative guide. 2nd ed. West Sussex, England: John Wiley & Sons, 2000.
23. Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 2002; 51:832-41.
24. Havelaar AH, Galindo AV, Kurowicka D, Cooke RM. Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Path Dis* 2008; 5(5):649-659.
25. van Duynhoven YTPH, de Wit MAS, Kortbeek LM, Koopmans MPG. Voedselinfecties in Nederland. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2002; 10: 79-83.
26. Anonymous. Morbidité et Mortalité Dues aux Maladies Infectieuses d'Origine alimentaire en France. Sainte-Maurice, France : Institut National de Vieille Sanitaire, 2004.
27. Gargouri N, Walke H, Belbeisi A, et al. Estimated burden of human *Salmonella*, *Shigella*, and *Brucella* infections in Jordan, 2003-2004. *Foodborne Path Dis* 2009; 6(4):481-486.
28. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* 2006; 94:2-228.
29. van Pelt W, de Wit MAS, Wannet WJB, Ligtoet EJJ, Widdowson MA, van Duynhoven YTHP. Laboratory surveillance of bacterial gastroen-

- teric pathogens in The Netherlands, 1991–2001. *Epidemiol Infect* **2003**; 130:431–441.
30. Ekdahl K, de Jong B, Wollin R, Andersson Y. Travel-associated nontyphoidal salmonellosis: geographical and seasonal differences and serotype distribution. *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11(2):138–144.
31. Hall G, Yohannes K, Raupach J, Becker N, Kirk M. Estimating community incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Australia. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14(10):1601–1609.

Derleme

Salmonella ve Yumurta: Üretimden Tabığa

Harriet Whiley * ve Kirstin Ross

Health and the Environment, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, 5001, Australia;

E-Mail: Kirstin.Ross@flinders.edu.au

* Yazışmanın gönderileceği yazar; E-Mail: Harriet.Whiley@flinders.edu.au; Tel.: +61-8-7221-8585;
Fax: +61-8-7221-8590.

Akademik Editör: Paul B. Tchounwou

Alındığı Tarih: 13 Ocak 2015 / Kabul Tarihi: 23 Şubat 2015 / Yayınlanma Tarihi: 26 Şubat 2015

Özet: Yumurtaların ve yumurta kabuklarının *Salmonella* kontaminasyonu dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olarak tespit edilmiştir. Tüketici tercihlerinde son zamanlarda meydana gelen değişim, kafesiz yumurta üretim yöntemlerine yönelik bir baskıyla yumurta endüstrisini etkilemiştir. Tüketicilerde ayrıca, potansiyel olarak salmonelloz riskini artıran çiğ ve işlenmemiş gıdalara yönelik artan bir talep ortaya çıkmıştır. Bu değişikliklere yanıt olarak, bu derleme, üretim işleme ve gıda işleme protokollerine kadar yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonuna ilişkin mevcut literatürü araştırmaktadır. Üretim sürecinde yumurtaların *Salmonella* ile kontaminasyonu, sürü büyüklüğü, sürü yaşı, stres, yem, aşılama ve temizlik rutinleri gibi birçok değişkenden etkilenen karmaşık bir konudur. Şu anda kafesli, kümesli ve serbest dolaşan yumurta üretiminin yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonu üzerindeki etkisi konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. Toplama sonrası, depolama, nakliye ve gıda işleme sırasında yönetim ve kontrol stratejilerine ilişkin literatür de incelenmiştir. Pastörizasyon ve ısınlama, *Salmonella*'yı kontrol altına almak için belirli yegane yöntem olarak tespit edilmiştir ve yüksek risk gruplarının korunması için esastır; oysa sıcaklık ve pH kontrolü ise, çiğ yumurta içeren gıdalar için riski en aza indirmeye yönelik potansiyel kontrol yöntemleri olarak belirlenmiştir; ancak yumurta tüketiminden kaynaklanan salmonelloz riskini azaltmak için daha ayrıntılı kontrol protokolleri ve eğitim programlarına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: *Salmonella*; salmonelloz; toplum sağlığı; risk değerlendirmesi; kafesli; serbest dolaşan; organik; besin işleme; besin kaynaklı hastalık

1. Giriş

Salmonella, dünya çapında besin kaynaklı hastalıkların en yaygın nedenlerinden biridir [1,2]. Küresel olarak, gıda kaynaklı salmonellozun yıllık insidansının ihtiyatlı bir şekilde 80,3 milyon vaka olduğu tahmin edilmektedir [3], ancak diğer tahminler 200 milyon ila 1,3 milyar vaka arasında değişmektedir[4]. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde, yılda 1 milyon besin kaynaklı hastalık vakasından, tifoid olmayan *Salmonella spp'nin* sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. [5]. Avrupa Birliği'nden yapılan bir araştırma, her 57 salmonelloz vakasından sadece 1'inin bildirildiğini tahmin etmektedir. Bu çalışma ayrıca, Avrupa Birliği üye devletlerinin her birinde yıllık salmonelloz insidansının 100.000 kişide 16 ila 11.800 arasında değiştiğini ve her ülkede salmonelloz insidansının yumurta tavuklarında *Salmonella enterica* serotipi Enteritidis'in varlığı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiş, bunun birincil enfeksiyon kaynağı olduğuna işaret etmiştir [6].

Yumurta ve yumurta kabuklarının kontaminasyonu, besin kaynaklı *Salmonella'nın* başlıca nedenlerinden biri olarak tanımlanmıştır. [1]. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1985 ve 2002 yılları arasında Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'ne (CDC) bildirilen tüm *Salmonella* vakalarının %53'ünün kaynağının yumurta kontaminasyonu olduğu tespit edilmiştir [7]. Besin kaynaklı salmonellozun en yaygın olarak tanımlanan iki etken maddesi *S. enterica* serotipleri Typhimurium ve Enteritidis'tir [2]. Her iki serotip de tavukların üreme organlarını (yumurta kanalı ve yumurtalık) kolonize etme yeteneğine sahiptir ve besin kaynaklı hastalıkların başlıca nedenleridir. Yumurta ile ilgili gıda kaynaklı salmonellozun çoğunluğunun *Salmonella* Typhimurium'dan kaynaklandığı Avustralya hariç olmak üzere, küresel olarak *Salmonella* Enteritidis daha yaygın olarak kontamine yumurtalarla bağlantılıdır [8–10].

Yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonu, birçok değişkenden etkilenen ve uygun yönetim stratejilerinin uygulanmasını zorlaştıran karmaşık bir konudur. Yumurtaların *Salmonella* ile içten kontamine olması için iki yol vardır. Doğrudan kontaminasyon, tavukların üreme sisteminde (yumurtalık ve yumurta kanalı dahil) yumurta oluşumu sırasında meydana gelir; dolaylı bulaşma ise yumurta yumurtlandıktan sonra meydana gelir ve yumurtanın dışını kontamine eden *Salmonella* kabuk zarından geçer. [1,11]. Bu kontaminasyon yolları; yumurta üretim süreci, depolama, taşıma ve gıda hazırlamadan etkilenebilir [7,12–14].

Son yıllarda, tüketici cephesinde daha insancıl yumurta üretimi yöntemlerine yönelik bir değişim yaşanmakta ve bu da geleneksel kafes tipi muhafaza sistemlerinden serbest dolaşımli üretime geçişe neden olmaktadır [15]. Çiğ ve işlenmemiş gıdalara olan talebin artmasıyla birlikte tüketici yeme alışkanlıklarında da bir değişim meydana gelmiştir [16,17]. Mayonez gibi çiğ yumurta, belirli soslar ve dondurma, tiramisü ve hatta milkshake gibi çiğ yumurta bazlı tatlılar içeren işlenmemiş ev yapımı gıdaların artan popüleritesi, potansiyel olarak salmonelloz riskini artırmaktadır [17–20].

Halihazırda, çeşitli yumurta üretim yöntemlerinin *Salmonella* kontaminasyonu üzerindeki etkisini değerlendiren yayınlar çelişkilidir ve bu da gıda güvenliğini sağlamak için bilinçli bir mevzuatın uygulanmasını zorlaştırmaktadır [21]. Bu makale kafeste, çiftlikte ve serbest dolaşan yumurta üretim süreçlerinde *Salmonella* kontaminasyonu ile ilgili mevcut bilgileri incelemektedir. Ayrıca üretim sırasında ve kullanım noktasında kontrol için çeşitli yöntemleri ve bunun tüketici tarafından nasıl etkilenebileceğini araştırmaktadır. Mevcut yönetim politikalarının tartışılması ve bilgi boşluklarının belirlenmesi, tüketicilerin güvenliğini sağlamak için gelecekteki yönetim protokollerini bilgilendirmeye yardımcı olacaktır.

2. Yumurta Üretim Süreçleri

Farklı yumurta üretim süreçlerinde *Salmonella* kontaminasyonunu karşılaştıran araştırmalar, çelişkili ve tutarsız kanıtlar ortaya koymuştur. Bu, karışıklığa neden olan faktörlerin ve değişkenlerin karmaşıklığından kaynaklanmaktadır. Bu faktörler; sürü boyutu, sürü yaşı ve kümes değişikliği, hava durumu, nakliye, yumurtlamanın başlaması ve tüy dökümünün neden olduğu stresi içermektedir. [22]. Sonuçların yorumlanmasındaki diğer bir zorluk da, kontaminasyon yollarındaki çeşitliliğidir. Yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonunu etkileyen faktörler, yumurtalıklar içindeki doğrudan kontaminasyon ve çevresel numunelerin dolaylı kontaminasyonu olarak farklılık göstermektedir [23].

Şu anda, barınma sistemlerinin *Salmonella* kontaminasyonu üzerindeki etkisini çevreleyen çelişkili kanıtlar hala ciddi tartışmalara neden olmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından yapılan bir araştırma, 25 Avrupa ülkesindeki 5000 yumurta üretim tesisinden alınan dışkı ve toz örneklerini test etmiş ve kafes sürülerinin *Salmonella* ile kontamine olma olasılığının daha yüksek olduğu sonucuna varmıştır [24]. Bununla birlikte, Holt ve arkadaşlarının [22] daha yakın tarihli bir incelemesi, hangi yumurta üretim muhafaza sisteminin daha az *Salmonella* kontaminasyonu ile sonuçlandığı konusunda genel bir fikir birliği olmadığı sonucuna varmıştır. Bu inceleme, Holt ve arkadaşlarının [22] Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından yayınlanan verileri, toplam çalışmanın dörtte birinden daha azını temsil eden yalnızca dört ülkeden bireysel çalışmalara atıfta bulunarak yanlış temsil ettiğini belirten Greger [25] tarafından eleştirilmiştir. Greger'e göre, sonuçların kümülatif olarak incelemesinden ziyade bireysel çalışmalar sunmak, okuyuculara daha derin ve bilgilendirici karşılaştırma sağlar. Verileri bu şekilde sunarak şu soruyu gündeme getirdi: 5 çalışmada da, serbest gezinen kümeslerde *Salmonella* insidansı, kafesli kümeslere oranla neden daha yüksekti? Bu soruyu yanıtlamak, *Salmonella* kontaminasyonunu teşvik edebilecek faktörler hakkında daha iyi bir fikir verebilir. Bu yayınlar, bu konunun karmaşıklığını ortaya koymakta ve tek bir yanıt olmadığını göstermektedir. Yumurta üretim süreçleri şu anda hızlı bir değişim içinde olduğundan, gelecekte en iyi yönetim uygulamalarını temin edeceği için *Salmonella* kontaminasyonunu destekleyen belirli faktörlerin tespit edilmesi önem arz etmektedir.

3. Doğrudan Kontaminasyon

Yumurtaların *Salmonella* ile iç kontaminasyonu, yumurta oluşumu sırasında üreme organlarında meydana gelmektedir [26]. Hem *S. Enteritidis* hem de *S. Typhimurium*'un tavukların üreme yollarını kolonize etme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir [8], ancak *S. Enteritidis* üreme yolu mukozasına *S. Typhimurium*'a göre daha iyi yapışması nedeniyle yumurtaların içeriklerinden daha sık izole edilmektedir [9]. İç kontaminasyon sadece insan sağlığı için değil, yumurta üretim endüstrisi için de önemli bir meseledir. Gantois ve arkadaşları [8], *Salmonella* ile enfekte olmuş tavuklarda yumurta üretiminin azaldığını ve enfeksiyondan sonraki 2 hafta içinde iyileşme olmadığını gözlemlemişlerdir. Halihazırda, farklı kafes sistemlerinin bu kontaminasyon yolu üzerindeki etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Gast ve arkadaşları [13] geleneksel kafeslerde ve tüneme, yuvalama ve tırmalama alanları ile zenginleştirilmiş koloni kafeslerinde tavukların *Salmonella* kontaminasyonunu karşılaştırmıştır. Tavuklar, ötenazi ve iç organların test edilmesinden önce 5 ila 6 gün süreyle 1.0×10^7 CFU *S. Enteritidis* ile oral yoldan dozlanmıştır. Geleneksel kafeslerde barındırılan tavukların karaciğerlerinde, dalaklarında, yumurtalıklarında ve yumurta kanallarında *S. Enteritidis*, zenginleştirilmiş kafeslerde barındırılan tavuklara nazaran önemli ölçüde daha yüksek sıklıkta tespit edilmiştir. Bunun stok yoğunluğu gibi barınma parametrelerine bağlı olabileceği veya davranışsal özelliklerin tavukların yayılmış enfeksiyona duyarlılığını etkileyebileceği öne sürülmüştür. Bununla

birlikte, Gast ve arkadaşlarının [23] başka bir çalışması, S. Enteritidis'in enfekte tavuklardan geleneksel kafeslerde veya zenginleştirilmiş kafeslerde barındırılan sağlıklı tavuklara bulaşma oranında önemli bir fark olmadığını deneysel olarak göstermiştir. Barınmanın S. Enteritidis enfeksiyonunun bulaşması üzerindeki etkisi De Vylder ve arkadaşları tarafından da araştırılmıştır [27]. Deneysel olarak enfekte olmuş tavuklar kullanılarak dört barınma sistemi araştırılmıştır. Buna geleneksel bir batarya tipi kafes, mobilyalı bir kafes (zenginleştirilmiş bir kafese en çok benzeyen), bir kuşhane ve bir zemin sistemi dahildir. Tavuklar arasında enfeksiyonun yayılması, iki kafesli barınma sistemine kıyasla, kuşhane ve zemin barınak sistemlerinde biraz daha fazla gerçekleşmiştir. Bu kısmen yumurta kontaminasyonu ile yansıtılmıştır, çünkü iki kafes ve zemin barınma sistemlerine kıyasla büyük kuş kafesi barınak sistemlerinde önemli ölçüde daha fazla kontamine yumurta bulunmuştur. Artan enfeksiyon yayılmasının, hijyenik durum, hava kalitesi ve kuşlar arasında artan fiziksel temas dahil olmak üzere barınma sistemleri arasındaki doğal farklılıklardan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

4. Çevresel Kontaminasyon

Çok sayıda çalışma, serbest dolaşimli kümeslerde bulunan çevresel kaynakların, kafesli kümeslere kıyasla daha düşük *Salmonella* kontaminasyonu insidansına sahip olduğunu göstermektedir. [12,24,28]. Belçika'da yapılan bir araştırma, kafesli kümeslerden toplanan toz örneklerinin %30'unun (45/148) ve dışkı örneklerinin %30'unun (45/148) *Salmonella* pozitif olduğunu bulmuştur; çiftlikten ve serbest dolaşimli kümeden toplanan 148 toz örneğinden sadece biri ve 148 dışkı örneğinden ikisi *Salmonella* pozitif [12]. Bu sonuçlar, çevre örneklerinde *Salmonella* insidansının serbest dolaşimli kümeslere (%10) kıyasla kafesli kümeslerde (%19) daha yüksek olduğunu tespit eden Wales ve arkadaşlarının [28] Birleşik Krallık'ta gerçekleştirdikleri araştırma ile desteklenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, Avrupa Birliği genelinde 5310 yumurta üretim tesisinden alınan dışkı ve toz örneklerinde S. Enteritidis'in varlığını araştıran Recio ve arkadaşlarının [24] çalışması, serbest dolaşimli kümes sistemlerinin, kafesli kümes sistemlerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük *Salmonella* kontaminasyonuna sahip olduğunu bulmuştur. Bununla birlikte, seksen dört adet sertifikalı *Salmonella* içermeyen Bovans Brown tavuğu kullanan Parisi ve arkadaşları [15] tarafından, serbest dolaşimli yumurtaların geleneksel batarya tip kafeslere kıyasla daha yüksek *Salmonella* kontaminasyonu insidansına sahip olduğunu deneysel olarak gösteren çelişkili kanıtlar ortaya konmuştur. Bu çalışmada, üç serbest dolaşimli kümeden 5/212 (%2) ve üç geleneksel batarya tip kafesten 0/212 adet yumurta *Salmonella* pozitif olarak test edilmiştir. Yumurtanın tavuğun fiziksel çevresinden daha hızlı çıkarıldığı kafes sistemlerine kıyasla, serbest dolaşimli kümeslerde görülen daha yüksek *Salmonella* insidansının, yumurtlamadan sonra tavuk ve yumurta arasındaki uzun süreli etkileşimden kaynaklandığı öne sürülmüştür.

5. Yumurtlama Sonrası Yumurtalara Nüfuz

Yumurtaların yumurtlama sonrası iç *Salmonella* kontaminasyonu, kabuk zarına nüfuz etme yoluyla çevresel kaynaklardan oluşmaktadır [11]. Miyamoto ve arkadaşları [29], yumurtaları yumurtlamadan sonra değişen zamanlarda S. Enteritidis ve S. Typhimurium solüsyonlarına daldırarak *Salmonella'nun* yumurta kabuklarına nüfuz etme potansiyelini araştırmıştır. En yüksek iç *Salmonella* kontaminasyonu insidansı, yumurtalar yumurtlamadan 15 dakika ila 3 saat sonra (bildirilen en kısa süre) ve 25 °C'de saklandığında (3.25 saat ila 6 saat, 1 gün ve 7 gün sonrasına kıyasla) meydana gelmiştir. Yumurtaları *Salmonella*'ya maruz kalmadan 15 dakika önce 4 °C'de soğutmak, yumurta kabuğunun penetrasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Bunun, düşük sıcaklıkta büyümenin azalmasından kaynaklandığı öne

sürülmüştür. Bu, yumurtaların toplanma sırasında soğutulmasının, iç *Salmonella* kontaminasyonunu en aza indirmek için yararlı bir araç olabileceğini göstermektedir; ancak, toplamadan önce muhafazada meydana gelen herhangi bir kontaminasyonu engellemeyeceğinden gerçekçi olarak bunun uygulanması zordur. *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'un yumurta kabuklarına nüfuz etme kabiliyetleri önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. De Reu ve arkadaşları [11] tavuğun yaşı ve alan, kabuk kalınlığı ve gözenek sayısı gibi yumurta kabuğu özelliklerinin *S. Enteritidis* tarafından yumurta kabuğu penetrasyonunu önemli ölçüde etkilemediğini deneysel olarak ortaya koymuştur. Messens ve arkadaşlarının [30] başka bir çalışmada, ticari olarak temin edilebilen yumurtaları kullanmış ve bunlar, 14 gün boyunca 20 °C'de 2.71 log CFU *S. Enteritidis* ile deneysel olarak aşılmıştır. İç kontaminasyon oranı, serbest dolaşan tavukların yumurtalarında %6, geleneksel batarya kafesli tavukların yumurtalarında %16 ve kahverengi, organik ve omega-3 ile zenginleştirilmiş yumurtalarda %30 ila %34 arasında gerçekleşmiştir. Bu çalışmada gözlemlenen bir başka eğilim de, mısır koçanı karışımı ile beslenen tavukların, standart yem verilen tavuklara kıyasla daha yüksek nüfuz etmiş yumurta kabuğu insidansına sahip olmasıdır; bu da yem tipinin yumurta kabuğu geçirgenliğini etkileyebileceğini akla getirmektedir.

6. Üretim Kontrol Tedbirleri

Üretim süreci boyunca *Salmonella* kontaminasyonunu kontrol altında tutmak için geliştirilen çok sayıda yöntem bulunmaktadır; temel yöntemlerden biri rutin temizlik ve sürüler arası dezenfeksiyondur. [28]. Bununla birlikte, bu temizleme rutinlerinin etkinliği oldukça değişken olabilir [14]. Wales ve arkadaşları [28], temizlik ve dezenfeksiyon sonrası *Salmonella* bulaşmış 12 adet katmanlı kümesi incelemiş ve 12 kümeden hiçbirinin *Salmonella* içermediğini tespit etmiştir. Davies ve Breslin [14] tarafından yapılan bir başka çalışma, serbest dolaşimli, çiftlik şeklinde ve katmanlı kümeslerde temizlik ve dezenfeksiyonun etkinliğini karşılaştırmış ve serbest dolaşan tavuk kümeslerinde gözlemlenen *Salmonella* kontaminasyonunda, toprağın kontamine kalmasına rağmen bir azalma olduğunu, ancak çiftlik ve kafes şeklindeki kümeslerde binaların ve ekipmanların yüzeylerinde önemli kontaminasyon kaldığını tespit etmiştir. Anekdot olarak, modern tarım yöntemlerinin bir sonucu olarak kontaminasyonda azalma olabileceği de ileri sürülmüştür. Örneğin, dışkı materyalini gübre bantları aracılığıyla bertaraf eden modern çiftlik sistemleri, dışkı materyalinin yeniden stoklanana kadar birikmesine olanak sağlayan eski çiftlik sistemlerine kıyasla daha düşük kontaminasyona sahip olacaktır. Yaban hayatı vektörlerinin çapraz kontaminasyonu da kümeslerin yeniden kontaminasyonu için bir mekanizma olarak tespit edilmiştir [14,28,31,32]. Örneğin, *S. Enteritidis*'in, *S. Typhimurium*'a kıyasla kafesli kümeslerde daha yaygın şekilde izole edildiği bulunmuştur. Bunun altında yatan mantığa yönelik olarak ileri sürülen fikir, *S. Enteritidis* ile *S. Typhimurium* için gözlenmeyen kemirgen aktivitesi arasındaki güçlü korelasyondur. Çiftliklerin yeniden kontaminasyonuna neden olan *Salmonella* taşıyıcıları olarak tespit edilen diğer hayvanlar arasında fareler, sıçanlar, tilkiler, kediler, sinekler, çöp böcekleri, karaböcekler ve kırkayaklar bulunmaktadır [31,32]. Yumurta üretim kümes sistemleri, iklim ve bölgedeki farklılıklar da bu hayvan vektörlerinin her birine karşı uygulanan biyogüvenlik önlemlerinin etkinliğini etkileyerek iyileştirme ve önleme tedbirlerinin başarısına tesir etmektedir [22].

Tavukların aşılması, aşuya ve *Salmonella* serotipine bağlı olarak *Salmonella* enfeksiyonuna karşı değişen bir başarı sergilemiştir. Berghaus ve arkadaşları [33] *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ve *S. enterica* serotip Kentucky'yi içeren bir aşının, tavukların ve yavrularının bu belirli serotiplere karşı bağışıklığını arttırdığını göstermiştir; ancak kümeden alınan çevresel örneklerde *Salmonella* insidansını azaltmamıştır. Arnold ve arkadaşları [34] tarafından yapılan bir başka çalışma, aşılanmanın

S. Enteritidis ve S. Typhimurium döken tavukların oranını etkilemediğini tespit etmiştir; ancak aşılınmamış tavuklara kıyasla yumurta kabuklarında bulunan S. Enteritidis ve S. Typhimurium insidansını önemli ölçüde azaltmıştır.

Antibiyotik tedavisi, antibiyotiğe dirençli popülasyonların erken ortaya çıkması nedeniyle *Salmonella* kontrolü bakımından tartışmalı bir yöntemdir [35]. Li ve arkadaşları [36] tarafından yapılan bir çalışmada, 78 haftalık bir süre boyunca ticari amaçlı bir yumurta kümesinden toplanan dışkı örnekleri test edilmiştir. PFGE kullanarak, bilinen serotipleri olan 45 farklı *Salmonella* izolatının özelliklerini tespit ettiler. Bu 45 izolattan 16'sı (%35) test edilen 15 antibiyotikten en az birine direnç göstermiştir. Bu, insanlarda sistemik salmonelloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan tetrasiklin, ampisilin, streptomisin ve seftiofura karşı direnci içermektedir. Daha yakın tarihli bir çalışma, etlik tavuklarda izole edilen antibiyotiğe dirençli *Salmonella* genotiplerinin varlığını araştırmış ve izolatların %43'ünden fazlasının ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, seftiofur, sefoksitin ve seftriaksona karşı dirençli olduğunu bulmuştur [37]. Bu, Trinidad ve Tobago, Grenada ve St. Lucia'daki yumurta üretim süreçlerinden 84 *Salmonella* izolatını izole eden Adesiyun ve arkadaşları [38] tarafından desteklenmiş ve 84 izolatın hepsinin test edilen yedi antimikrobiyal ajandan bir veya daha fazlasına direnç gösterdiği bulunmuştur. Eritromisin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, ampisilin ve tetrasikline karşı yüksek frekansta direnç gözlenmiştir. Antibiyotiğe dirençli suşların varlığı, daha invaziv olan salmonelloz vakalarının tedavisi açısından gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından oldukça önemlidir [37]. Başka bir kontrol yöntemi de Fiorentin ve arkadaşları [39] tarafından araştırılmış ve S. Enteritidis ile enfekte olmuş tavukların serbest dolaşan tavuklardan izole edilen bakteriyofajlarla oral olarak tedavi edilmesinin, çekumda bulunan S. Enteritidis kontaminasyonunu önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir. Bakteriyofajla tedaviden beş gün sonra S. Enteritidis CFU/g çekum maddesinde 3.5 büyüklük mertebesinde bir azalma gözlenmiştir ve tedaviden sonra 25 güne kadar toplanan numuneler, bakteriyofaj ile tedavi edilmeyen enfekte tavuklara kıyasla kontaminasyon konsantrasyonlarına sahip olmaya devam etmektedir.

7. Toplama Sonrası Kontrol Yöntemleri

Mevcut yumurta yıkama teknolojisinin yararları, sürecin *Salmonella*'yı yumurta kabuğu yüzeyinden yumurtanın içeriğine aktarabileceği endişeleri nedeniyle tartışılmaktadır [40]. Yıkamanın *Salmonella*'yı yayararak çapraz kontaminasyona neden olabileceği endişesi de bulunmaktadır [41]. Hutchison ve diğerleri [42], kontamine yumurtaların optimum koşullar altında yıkanmasının, kabuk yüzeyinde 5 log *Salmonella* CFU azalmasına yol açtığını ve yumurtanın içeriğinde *Salmonella* tespit edilmediğini deneysel olarak göstermiştir (konveyör bant hızı 111 cm/dk, ön yıkama suyu 44 °C ve 138 kPa idi, yıkama suyu 44 °C idi, 262 kPa ve 3 g/L kloro yıkama içeriyordu) (klor bazlı bir dezenfektan, durulama suyu 48 °C, 262 kPa idi ve 2.5 ml/L Quat 800 durulama suyu maddesi ve 2 dakika boyunca 42 °C'de yumurtaları yıkama sonrası havayla kurutma içeriyordu). Ancak, bu yıkama süresindeki ve daha düşük sıcaklıklardaki farklılıklar, hem S. Enteritidis hem de S. Typhimurium'un yumurta kabuğuna nüfuz etmesine ve yumurta içeriğini kontamine etmesine sebep olmuştur. Yumurta yıkama protokolleri, kimyasal bileşiklerin eklenmesiyle zenginleştirilmiştir. Wang ve Slavik [41], üç ticari yumurta yıkama bileşiğinin yıkama sonrası yumurta kabuğuna *Salmonella* nüfuzu üzerindeki etkisini deneysel olarak karşılaştırmıştır. Ticari olarak temin edilebilen kimyasal bileşiklerden ikisinin (kuaterner amonyum bileşiği (QAC, pH 7.5) ve hipoklorit (NaOCl, 100 ppm, pH 7.5)) yumurta kabuğuna *Salmonella* nüfuzunu azalttığı gösterilmiştir; bununla birlikte, sodyum karbonat (Na₂CO₃, pH 12) ile yıkamanın bakteri nüfuzunu kolaylaştırdığı ortaya konmuştur. Yumurta yıkama protokolüne

bir diğ er ilave ise hafif asidik elektrolize su kullanılmasıdır; bu, ç apraz kontaminasyonu önleyen kabuklu yumurtalar ve yıkama suyu üzerindeki *S. Enteritidis*'i deneysel olarak azaltmak ve hatta ortadan kaldırmak için Cao ve arkadaşları [43] tarafından ortaya konmuştur. Bu sonuçları gerçek dünyada uygulanması açısından yorumlamanın zorluğu, yumurta kabuğ una nüfuz etme üzerindeki etkinin araştırılmamış olmasıdır.

Kısa süreli ısı l işlemle bütün yumurta ve yumurta iç i pastörizasyonu, *Salmonella* kontaminasyonunu azalttığı kanıtlanmış bir başka yöntemdir [40,44]. Barbour ve arkadaşları [45], *Salmonella* aş ılanmış bütün yumurtalar 57 °C'de 25 dakika sıcak su banyosuna yerleştirilerek ve ardından bu yumurtalara 55 °C'de 57 dakika daha sıcak hava uygulanarak muamele edildiğ inde, *Salmonella* kontaminasyonunda önemli bir azalma gözlemlendiğ ini göstermişlerdir. İlk aş ılama yaklaşık 10⁶ CFU'ya düşürüldüğ ünde, bu ısıyla pastörizasyondan sonra tespit edilen canlı *Salmonella* bulunmamaktaydı [45]. Pasquali ve arkadaşları [46] ayrıca sıcak hava uygulamasının yumurta kabuklarının *S. Enteritidis* kontaminasyonunu 1,9 loga kadar azalttığı nı ve yumurtanın kalite özelliklerinin hiçbirinde önemli bir değ iş iklik olmadığını göstermiştir. Pastörizasyon, yaş lı bakım tesisleri ve hastaneler gibi yüksek risk grupları için yumurtalardan kaynaklanan salmonelloz riskini azaltmak için uygun bir yöntem sunabilir; ancak, tüketicilerin ç iğ bütün gı daları arzu etmeleri ve pastörize gı daların tüketimine ilişkin endiş eleri nedeniyle bunun herkes için bir ç özü m sağ laması olası değ ildir [47].

Yumurtaların ış ınlanması, salmonellozun önlenmesi için potansiyel bir yöntem olarak sunulmuştur. *Salmonella*'yı inaktive etmek için gereken minimum doz, yumurtanın duyu sal ve fonksiyonel özelliklerinde değ iş ikliklere neden olduğ u gösterilen 1.5 kGy'dir. Duyusal değ iş iklikler yumurta sarısının kokusunun artmasını ve yumurta akının berraklığ ının azalmasını içerirken, fonksiyonel değ iş iklikler yumurta akının köpük stabilitesinin azalmasını iç ermektedir [48]. Deneysel olarak, 2.5 ve 5 kGy dozlarında ış ınlanmış yumurta akının köpürme kabiliyetinin arttığı , ancak köpük stabilitesinin azaldığı ve bunun da yumurta akının iş levselliğ ini ve çekiciliğ ini bariz şekilde sınırladığ ı gösterilmiştir. [49]. Buna rağ men, ış ınlama ve pastörizasyon yaş lılar, bağı ş ıklığı baskılanmış olanlar, çocuklar ve hamile kadınlar gibi yüksek riskli popülasyonlar için kabul edilebilir bir seç enek olabilir. Hastaneler ve yaş lı bakım tesisleri için salmonelloza karşı uygun bir kontrol yönt emi olabilirler [48,50]. Bu itibarla, Hassas popülasyonlar için pastörize yumurta ürünlerinin kullanımını zorunlu kı lan düzenleyici kurallar, salmonelloz riskini azaltma yönt emi olacaktır.

Yumurta kabuğ unun kitosan (kabuklulardan elde edilen doğ rusal bir polisakarit) ile kaplanması nın *S. Enteritidis* tarafından penetrasyonu önemli ölç üde azalttığı nı gösteren Leleu ve arkadaşları [51] tarafından başka bir yaklaş ım ortaya konmuştur. Deneysel olarak, %2'lik bir kitosan yumurta kabuğ u kaplaması, işlem görmemiş yumurtalarda %24,5'ine kı yasla, yumurtaların yalnızca %6,1'inde penetrasyona neden olmuştur. Bununla birlikte, kitosan kaplama yumurta kabuğ u kontaminasyonunu azaltmamıştır ve bu da diğ er gı da ürünlerine hazırlık sırasında ç apraz kontaminasyonu engellemektedir.

8. Depolama ve Taşı ma

Radkowski [52] tarafından yapılan bir araşt ırmada, kabukların dış ının 10 CFU *S. Enteritidis* ile yapay olarak kontamine olmasıyla birlikte farklı sıcaklıklarda depolamanın 1440 adet yumurta üzerindeki etkisini araştırılmış tır. Kabukların yapay kontaminasyonu, oda sıcaklığ ında 0, 10 veya 20 günlük depolamadan sonra meydana gelmiştir ve yumurtalar, kalan *S. Enteritidis* kontaminasyonunu ölç meden önce 2 °C, 20 °C ve 30 °C'de 0, 7, 14 ve 21 gün süreyle saklanmıştır. Bu ç alış manın sonuçları, daha düşük sıcaklıklarda depolamanın aslında *S. Enteritidis*'in kabuklu yumurtaların dış ında

hayatta kalmasını arttırdığını göstermiştir. Alternatif olarak Humphrey ve arkadaşları [53] oda sıcaklığında saklamanın kontamine yumurtaların *S. Enteritidis*'in iç konsantrasyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Bu çalışma esnasında, 15 farklı *Salmonella* pozitif sürüden toplam 5262 adet tavuk yumurtası, yumurtlamadan sonra değişen sayıda gün içinde *S. Enteritidis* bakımından test edilmiş ve bu işlem esnasında yumurtalar oda sıcaklığında depolanmışlardır. Yumurtlama sonrası birinci, ikinci ve üçüncü haftalarda, 5/1085 (%0,5), 7/1353 (%0,5) ve 1/1221 (%0,1) yumurta *S. Enteritidis* ile kontamine olmuştu ve tüm kontamine yumurtalarda <20 hücre *S. Enteritidis* vardı.

21 gün sonra yumurtaların 12/1603'ü (%0,8) *S. Enteritidis* pozitif, bunlardan yedisi <20 hücre içeriyordu, ancak beşi, 1.5×10^4 ve 1.2×10^5 *S. Enteritidis* hücresi içeren iki yumurta ile >100 hücreye sahipti. Lublin ve arkadaşlarının [54] başka bir çalışması, 25 °C'de dört hafta saklandıktan sonra deneysel olarak aşılınmış yumurtalardaki *S. Enteritidis* konsantrasyonunun artmaya başladığını göstermiştir. Ayrıca yumurtaları 6 °C'de saklamanın 25 °C'de gözlemlenen konsantrasyondaki bu artışı önlediğini, ancak *S. Enteritidis*'in ilk konsantrasyonunun hayatta kalmasını engellemediğini ortaya koydular. Okamura ve arkadaşları tarafından, 10 °C ve 20 °C'de yumurta depolanmasının deneysel olarak aşılınmış yumurtalarda *S. Enteritidis* büyümesini kontrol altına aldığı gösterilmiştir [55]. Bununla birlikte, sıcaklıktaki dalgalanmanın büyüme desteklediğini ve yumurtaların 5 gün boyunca 22–30 °C veya 27–35 °C'de saklanması ve ardından 25 °C'de sabit depolanmasının, >10⁶ *S. Enteritidis* hücresi içeren yumurta sayısında sırasıyla yalnızca bir ve iki hafta sonra hızlı artışlara neden olduğunu keşfetmişlerdir. Sıcaklıktaki dalgalanmadan kaynaklanan bu hızlı artışın çiftlikten sofraya depolama ve nakliye yönetirken dikkate alınması önem arz etmektedir.

9. Besin İşleme ve Hazırlama

İşleme süreci boyunca *Salmonella* kontrol yöntemleriyle ilgili mevcut literatürde tutarsızlıklar bulunmaktadır ve sunulan kanıtlar çelişkilidir. Bu, besin işleme ve hazırlama sırasında *Salmonella'nın* kontrolü ve yönetimi üzerinde çok fazla baskı oluşturmaktadır. Besin işleme esnasında bu patojenin yönetiminin önemi, tüketicilerin çiğ gıda ürünlerine yönelik artan talebiyle daha da artmıştır [16,17]. Humphrey ve arkadaşları [56] bir model mutfak kullanarak ve deneysel olarak kontamine olmuş sağlam yumurtaları kullanarak yumurtaları karıştırmak için kullanılan kapların yıkamadan sonra bile bazen *Salmonella* pozitif olduğunu ortaya koymuştur. Çatal veya el mikseri ile elle çırpılmış bir hamur karışımında kontamine yumurtalar kullanıldığında, karıştırma kabından 40 cm'den daha uzak olan çalışma yüzeylerinde *S. Enteritidis* tespit edilmiştir. Kontaminasyondan 24 saat sonra yumurta veya hamur karışımının ince kuru noktalarında bakterinin hayatta kaldığı görülmüştür. Barker ve arkadaşları tarafından, *Salmonella* kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için mutfağı başarılı bir şekilde temizlemenin önemi de araştırılmıştır [57]. Bu çalışmada, model mutfakta hijyenik bir yüzey elde etmek için durulama aşaması olmadan deterjan bazlı temizlik kullanılması yetersiz kalmıştır. Deterjan bazlı temizleme yöntemi, durulama aşamasının eklenmesiyle geliştirilmiş olmasına rağmen, 5000 ppm'de hipoklorit kullanımı deterjan bazlı temizleme karşısında önemli ölçüde üstünlük sağlamıştır. *Salmonella'nın* diğer gıda ürünlerine çapraz bulaşmasını önlemek için mutfak yüzeylerinin ve mutfak eşyalarının yeterince temizlenmesi çok önemli olduğundan, bu önemli bir mesajdır.

Uygun besin işlemenin önemi, Avustralya'nın Tazmania kentinde Haziran ve Aralık 2005 arasında meydana gelen bir dizi ilgili Salmonelloz salgını örneği ile ortaya konmuştur. Bu dönemde beş salgın meydana gelmiştir ve Tazmania Sağlık Departmanına bildirilen toplam 125 *S. Typhimurium* faj vakası 135 laboratuvarca teyit edilmiştir. Bu vakaların %91'i yumurtalarını aynı çiftlikten temin eden gıda işletmeleriyle bağlantılıydı. Bu işletmelerin, *Salmonella'nın* çapraz kontaminasyonuna yol açan

yetersiz besin işleme ve saklama prosedürlerine sahip olduğu tespit edilmiştir [58]. Crespo ve arkadaşları [59] İspanya'da 2000–2002 yılları arasında yumurta ve yumurta ürünleri tüketimiyle ilişkili gıda kaynaklı hastalık salgınlarını araştırmıştır. Toplamda 895 salgın tespit edilmiş ve bunların %85'i *Salmonella* ile ilişkilendirilmiştir (bunların %58'inin *S. Enteritidis* olduğu doğrulanmıştır). Bu salgınların her birine ilişkin araştırmalar, en önemli kontrol önlemlerinin sağlık eğitimi olduğunu, ardından tesislerin denetlenmesi ve besin işleyicilerinin izlenmesi olduğunu tespit etmiştir. Bu salgınlardan elde edilen bulgular, besin işleyicilerinin bitmiş gıda ürünlerinin hijyenini sağlama ve yumurtaları hiçbir zaman "steril" olarak görmeme sorumluluğunu göstermiştir. Çoğu besin işleyicisi çiğ yumurtalardan kaynaklanan *Salmonella* riskini hafife almaktadır [60]. Nijerya, Owerri'deki restoran baş aşçıları ve catering yöneticileriyle yapılan yeni bir araştırma, tüm katılımcıların çiğ et, tavuk veya balık tattuktan sonra ellerini yıkadığını belirtmesine rağmen, %6'sının çiğ yumurtayı kırıktan sonra ellerini yıkamadığını tespit etmiştir [61].

Besin işleyicilerinin gıda güvenliği eğitimiyle ilgili uygun bilgilere sahip olmasını sağlamanın zorluğu, mesajın her zaman net olmamasıdır. Örneğin Radford ve Board [62] ev yapımı mayonez ve *S. Enteritidis*'in hayatta kalmasının rolünü araştırmıştır. Sirke ile yapılan ve pH'ı 4,1 veya daha az olan mayonezin *S. Enteritidis*'i kontrol altına aldığı bulunmuştur. Mayoneze sarımsak ve hardal ilavesi de *S. Enteritidis*'e karşı koruyuculuk sağlamıştır; bununla birlikte, tuz veya herhangi bir bitkisel materyalin eklenmesi *S. Enteritidis*'in hayatta kalmasını desteklemiştir. Kullanılan yağ ve sirke türleri, *S. Enteritidis*'in hayatta kalmasını etkilemiştir ve mayonezin soğutma sıcaklıklarında saklanması *Salmonella*'yı asitleştirici maddelerden gerçek manada korumuştur. Mayonezin buzdolabında saklanmadan önce 18-22 °C'de 24 saat saklanması önerilmiştir.

10. Sonuçlar

Yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonu, gıda üretim sürecinin her aşamasındaki değişkenlerden etkilenen karmaşık bir konudur. Şu anda, *Salmonella* kontaminasyonu ile ilgili olarak serbest gezerek, çiftlikte ve kafesli üretim süreçlerinin faydalarına ilişkin literatür çelişkilidir. Bununla birlikte, mevcut literatür, *Salmonella* içermediği garanti edilen yumurta üretiminin henüz mümkün olmadığını göstermektedir. Bu, *Salmonella* açısından toplama sonrası kontrol tedbirlerinin önemini pekiştirmektedir. Buna yıkama, pastörizasyon ve ışınlama gibi toplama sonrası dezenfeksiyon yöntemleri dahildir. İkinci olarak belirtilen iki yöntem tüm tüketiciler için cezbedici olmasa da, yüksek riskli hastalar için uygun bir çözüm sunmaktadırlar. Şu anda bilgiler oldukça karmaşık ve değişken olduğundan, depolama, sıcaklık ve besin işleme protokollerini optimize etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Tüketici tercihlerindeki mevcut değişim ve çiğ gıda ürünlerine yönelik artan talep göz önüne alındığında, çiğ yumurta içeren gıdaların hazırlanmasına ilişkin daha bilinçli kılavuzlara ihtiyaç duyulmaktadır. Gıda ürünlerinin sıcaklık ve pH'ı yoluyla *Salmonella*'nın kontrolünü sağlamak için farklı protokolleri keşfetmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca besin işleyicilerini ve tüketicileri çiğ yumurta ve gıda ürünlerinin çapraz kontaminasyonundan kaynaklanan riskler konusunda yeniden eğitmeye ve halk sağlığı riskini azaltmaya ihtiyaç vardır.

Yazarların Katkıları

Harriet Whiley ve Kirstin Ross, derlemenin tasarımı ve koordinasyonunu tasarlamış ve katılmıştır. Harriet Whiley makale taslağını hazırlamış ve Kirstin Ross akademik girdi sağlamıştır; her iki yazar da son taslağı onaylamıştır.

Çıkar çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Referanslar

1. Howard, Z.R.; O'Bryan, C.A.; Crandall, P.G.; Ricke, S.C. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 755–764.
2. Galiş, A.M.; Marcq, C.; Marlier, D.; Portetelle, D.; Van, I.; Beckers, Y.; Théwis, A. Control of *Salmonella* contamination of shell eggs—Preharvest and postharvest methods: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 155–182.
3. Majowicz, S.E.; Musto, J.; Scallan, E.; Angulo, F.J.; Kirk, M.; O'Brien, S.J.; Jones, T.F.; Fazil, A.; Hoekstra, R.M.; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 882–889.
4. Coburn, B.; Grassl, G.A.; Finlay, B.B. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunol. Cell Biol.* **2006**, *85*, 112–118.
5. Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.-A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 7–15.
6. Havelaar, A.H.; Ivarsson, S.; Lofdahl, M.; Nauta, M.J. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol. Infect.* **2013**, *141*, 293–302.
7. Food Drug Administration. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production, storage, and transportation. Final rule. *Fed. Regist.* **2009**, *74*, 33030–33101.
8. Gantois, I.; Eeckhaut, V.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol.* **2008**, *37*, 399–406.
9. Wales, A.; Davies, R. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathol.* **2011**, *40*, 429–436.
10. Moffatt, C.R.; Musto, J. *Salmonella* and egg-related outbreaks. *Microbiol. Aust.* **2013**, *34*, 94–98.
11. De Reu, K.; Grijspeerdt, K.; Messens, W.; Heyndrickx, M.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Herman, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *112*, 253–260.
12. Namata, H.; Méroc, E.; Aerts, M.; Faes, C.; Abrahantes, J.C.; Imberechts, H.; Mintiens, K. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Prev. Vet. Med.* **2008**, *83*, 323–336.
13. Gast, R.K.; Guraya, R.; Jones, D.R.; Anderson, K.E. Contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. *Poultry Science* **2014**, *93*, 728–733.
14. Davies, R.; Breslin, M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 283–287.

15. Parisi, M.A.; Northcutt, J.K.; Smith, D.P.; Steinberg, E.L.; Dawson, P.L. Microbiological contamination of shell eggs produced in conventional and free-range housing systems. *Food Control* **2015**, *47*, 161–165.
16. Broglia, A.; Kapel, C. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Vet. Parasitol.* **2011**, *182*, 2–13.
17. Kretser, A.; Dunn, C.; DeVirgiliis, R.; Levine, K. Utility of a new food value analysis application to evaluate trade-offs when making food selections. *Nutr. Today* **2014**, *49*, 185–195.
18. Fearnley, E.; Raupach, J.; Lagala, F.; Cameron, S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 219–227.
19. Moffatt, C.R.; Appuhamy, R.; Kaye, A.; Carswell, A.; Denehy, D. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium phage type 135a gastroenteritis linked to eggs served at an Australian Capital Territory café. *Commun. Dis. Intell. Quart. Rep.* **2012**, *36*, E281–E285.
20. Mitchell, E.; O'Mahony, M.; Lynch, D.; Ward, L.; Rowe, B.; Uttley, A.; Rogers, T.; Cunningham, D.; Watson, R. Large outbreak of food poisoning caused by *Salmonella* typhimurium definitive type 49 in mayonnaise. *BMJ Br. Med. J.* **1989**, *298*, 99–101.
21. Jones, D.R.; Anderson, K.E.; Guard, J.Y. Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 1195–1202.
22. Holt, P.S.; Davies, R.H.; Dewulf, J.; Gast, R.K.; Huwe, J.K.; Jones, D.R.; Waltman, D.; Willian, K.R. The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 251–262.
23. Gast, R.K.; Guraya, R.; Jones, D.R.; Anderson, K.E. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 3145–3151.
24. Recio, J.I.A.; Bailie, H.; Bedriova, M.; Beloeil, P.; Boqvist, S.; Borck, B.; Camilleri, K.; Chobanov, G.; Costache, A.; De Smet, K. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *Eur. Food Saf. Auth. J.* **2007**, *97*, 1–84.
25. Greger, M. Housing and egg safety review ignores best available science on *Salmonella* risk. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, doi:10.3382/ps.2011-01369.
26. Gantois, I.; Ducatelle, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Gast, R.; Humphrey, T.J.; Van Immerseel, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 718–738.
27. De Vylder, J.; Dewulf, J.; Van Hoorebeke, S.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 1391–1396.
28. Wales, A.; Breslin, M.; Carter, B.; Sayers, R.; Davies, R. A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathol.* **2007**, *36*, 187–197.
29. Miyamoto, T.; Horie, T.; Baba, E.; Sasai, K.; Fukata, T.; Arakawa, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 350–353.

30. Messens, W.; Grijspeerdt, K.; De Reu, K.; De Ketelaere, B.; Mertens, K.; Bamelis, F.; Kemps, B.; De Baerdemaeker, J.; Decuypere, E.; Herman, L. Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 623–628.
31. Liebana, E.; Garcia-Migura, L.; Clouting, C.; Clifton-Hadley, F.A.; Breslin, M.; Davies, R.H. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 1024–1029.
32. Davies, R.H.; Breslin, M. Persistence of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 79–84.
33. Berghaus, R.; Thayer, S.; Maurer, J.; Hofacre, C. Effect of vaccinating breeder chickens with a killed *Salmonella* vaccine on *Salmonella* prevalences and loads in breeder and broiler chicken flocks. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 727–734.
34. Arnold, M.E.; Gosling, R.J.; La Ragione, R.M.; Davies, R.H.; Martelli, F. Estimation of the impact of vaccination on faecal shedding and organ and egg contamination for *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium. *Avian Pathol.* **2014**, *43*, 155–163.
35. Smith, H.W.; Tucker, J.F. The effect of antibiotic therapy on the faecal excretion of *Salmonella* typhimurium by experimentally infected chickens. *Epidemiol. Infect.* **1975**, *75*, 275–292.
36. Li, X.; Payne, J.B.; Santos, F.B.; Levine, J.F.; Anderson, K.E.; Sheldon, B.W. *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses and characterization of the *Salmonella* Isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis, and pulsed field gel electrophoresis. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 591–597.
37. Diarra, M.S.; Delaquis, P.; Rempel, H.; Bach, S.; Harlton, C.; Aslam, M.; Pritchard, J.; Topp, E. Antibiotic resistance and diversity of *Salmonella enterica* serovars associated with broiler chickens. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 40–49.
38. Adesiyun, A.; Webb, L.; Musai, L.; Louison, B.; Joseph, G.; Stewart-Johnson, A.; Samlal, S.; Rodrigo, S. Resistance to antimicrobial agents among *Salmonella* isolates recovered from layer farms and eggs in the Caribbean Region. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 2153–2160.
39. Fiorentin, L.; Vieira, N.D.; Barioni W., Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol.* **2005**, *34*, 258–263.
40. James, C.; Lechevalier, V.; Ketteringham, L. Surface pasteurisation of shell eggs. *J. Food Eng.* **2002**, *53*, 193–197.
41. Wang, H.; Slavik, M.F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 276–279.
42. Hutchison, M.; Gittins, J.; Walker, A.; Sparks, N.; Humphrey, T.; Burton, C.; Moore, A. An assessment of the microbiological risks involved with egg washing under commercial conditions. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 4–11.
43. Cao, W.; Zhu, Z.W.; Shi, Z.X.; Wang, C.Y.; Li, B.M. Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* Enteritidis and its contaminated shell eggs. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *130*, 88–93.
44. Knowles, N.R. Observations on the microbiology of raw and heat-treated liquid eggs. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* **1953**, *16*, 107–118.

45. Barbour, E.K.; El Jurdi, L.; Issa, C.; Tannous, R. Preliminary attempts towards production of table eggs free from *Salmonella* Enteritidis. *J. Clean. Prod.* **2001**, *9*, 69–73.
46. Pasquali, F.; Fabbri, A.; Cevoli, C.; Manfreda, G.; Franchini, A. Hot air treatment for surface decontamination of table eggs. *Food Control* **2010**, *21*, 431–435.
47. Brewer, M.S.; Rojas, M. Consumer attitudes toward issues in food safety. *J. Food Saf.* **2008**, *28*, 1–22.
48. Mészáros, L.; Horti, K.; Farkas, J. Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments I. Gamma irradiation of shell eggs. *Acta Aliment.* **2006**, *35*, 229–236.
49. Liu, X.; Han, R.; Yun, H.; Jung, K.; Jin, D.; Lee, B.; Min, T.; Jo, C. Effect of irradiation on foaming properties of egg white proteins. *Poult. Sci.* **2009**, *88*, 2435–2441.
50. Patrick, M.E.; Adcock, P.M.; Gomez, T.M.; Altekruze, S.F.; Holland, B.H.; Tauxe, R.V.; Swerdlow, D.L. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985–1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1–7.
51. Leleu, S.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; De Reu, K.; Michiels, C.W.; De Baerdemaeker, J.; Messens, W. Effects on *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 43–48.
52. Radkowski, M. Effect of moisture and temperature on survival of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs. *Arch. Geflügelkund.* **2002**, *66*, 119–123.
53. Humphrey, T.J.; Baskerville, A.; Mawer, S.; Rowe, B.; Hopper, S. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: A study involving naturally infected hens. *Epidemiol. Infect.* **1989**, *103*, 415–423.
54. Lublin, A.; Sela, S. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the eggs. *Poult. Sci.* **2008**, *87*, 2208–2214.
55. Okamura, M.; Kikuchi, S.; Suzuki, A.; Tachizaki, H.; Takehara, K.; Nakamura, M. Effect of fixed or changing temperatures during prolonged storage on the growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis inoculated artificially into shell eggs. *Epidemiol. Infect.* **2008**, *136*, 1210–1216.
56. Humphrey, T.; Martin, K.; Whitehead, A. Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella* Enteritidis PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiol. Infect.* **1994**, *113*, 403–409.
57. Barker, J.; Naeni, M.; Bloomfield, S. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 1351–1360.
58. Stephens, N.; Sault, C.; Firestone, S.M.; Lightfoot, D.; Bell, C. Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium phage type 135 infections associated with the consumption of products containing raw egg in Tasmania. *Analysis* **2007**, *31*, 118–124.
59. Crespo, P.S.; Hernández, G.; Echeíta, A.; Torres, A.; Ordóñez, P.; Aladueña, A. Surveillance of foodborne disease outbreaks associated with consumption of eggs and egg products: Spain, 2002–2003. *Eurosurveillance* **2005**, *10*, 2726, Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2726> (accessed on 25 February 2015).
60. Allen, K.D. Eggs, recipes and *Salmonella* food poisoning. *J. Public Health Med.* **1994**, *16*, 491–492.
61. Onyeneho, S.N.; Hedberg, C.W. An Assessment of Food Safety Needs of Restaurants in Owerri, Imo State, Nigeria. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 3296–3309.

62. Radford, S.A.; Board, R.G. Review: Fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. *Food Microbiol.* **1993**, *10*, 269–278.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DERLEME

Salmonella, konak ve hastalık: kısa bir derleme

Bryan Coburn^{1,2,3}, Guntram A Grassl^{1,3} ve BB Finlay^{1,2}

Salmonella türleri, küresel olarak önemli ölçüde morbidite, mortalite ve hastalık yüküne neden olmaktadır. Salmonella türlerinin enfeksiyonları birden fazla klinik sendroma neden olmaktadır. Tüm insan salmonellozlarının patofizyolojisinin merkezinde, güçlü bir doğal immün/inflamatuar tepkinin uyarılması yer almaktadır. Bunun nihai olarak konakçıya veya patojene adapte olabilme avantajını yansıtmayı yansıtmadığı açık değildir. Bununla birlikte, hem konakçının hem de patojenin, diğerine zararlı olan konak tepkilerini tetikleyen mekanizmalar geliştirdiği açıktır. Bu derlemede, Salmonella enterica türleri ile enfeksiyona bağlı iki klinik sendromda mobilize olan bazı konakçı ve patojenik mekanizmalar araştırılmaktadır: enterokolit ve tifo.

Immunology and Cell Biology (2007) 85, 112–118. doi:10.1038/sj.icb.7100007; 5 Aralık 2006 tarihinde çevrimiçi yayınlandı

Anahtar Kelimeler: salmonella; enterokolit; SPI; tifo; virülans; PAMP

Salmonella enterica (*S. enterica*), dünya çapında öneme sahip, yılda 1,3 milyar hastalık vakasına neden olan, Gram-negatif fakültatif hücre içi bir anaerobdur. Altı alt türe ait 2500'den fazla *S. enterica* serotipi tanımlanmıştır.^{1,2} Alt türler ayrıca flagellar, karbonhidrat ve lipopolisakkarit (LPS) yapıları ile farklılaşan serotiplere bölünmüştür. *S. enterica* türleri tipik olarak dört ana sendromdan birine neden olan oral yolla edinilen patojenlerdir: enterik ateş (tifo), enterokolit/ishal, bakteriyemi ve kronik asemptomatik taşıyıcılık. Hastalığın tezahürü, hem konakçının duyarlılığına hem de bulaşıcı *S. enterica* serotipine bağlıdır.² İnsanlarda Typhi, Paratyphi ve Sendai serotipleri enterik ateşe neden olurken, çoğu serotip enterokolit/ishale neden olur. Choleraesuis ve Dublin dahil olmak üzere birkaç serotip, insanlarda bakteriyemi ile daha yaygın olarak ilişkilidir.² Typhi serotipi büyük ölçüde insanlarla sınırlıyken, diğer serotipler daha geniş ölçüde konakçıya adapte olur ve doğal hayvan enfeksiyonuna neden olur. Dublin, Typhimurium ve Choleraesuis serotipleri hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalığa neden olur, ancak farklı konakçılarda farklı sendromlara neden olur. Dublin serotipi ineklerde bağırsak iltihabı hastalığına, bakteriyemiye ve düşüklere neden olur; Typhimurium serotipi farelerde tifo benzeri sistemik bir hastalığa neden olur; Choleraesuis serotipi ise domuzlarda septisemiye neden olur.³ İnsanlarda tifo ateşi ve bağırsak/ishal hastalığı, *S. enterica* enfeksiyonu ile ilişkili en yaygın sendromları temsil etmektedir ve *Salmonella* patogenezinin bulaşıcı türlerinde en kapsamlı şekilde araştırılan hem bakteri hem de konakçının patojenik süreçlerini içermektedir. Belirgin inflammatuar hastalık, tifo ve enterokolitin ortak bir özelliğidir. *Salmonella* türleri tarafından kullanılan çeşitli virülans programları, enfeksiyonun farklı evrelerinde çeşitli dokulardaki konak savunma mekanizmalarıyla etkileşime girerek önemli konak immünopatolojisine, morbiditeye ve mortaliteye yol açar.

TİFO

İnsanlarda tifo, genellikle kontamine su veya hayvansal ürünlerden veya enfekte bir kişi veya taşıyıcı ile yakın temastan *S. enterica* serotip Typhi bakterisinin yutulmasını takiben ortaya çıkar.⁴ Tifo hastalığının oluşumunun anlaşılması büyük oranda, hastalık riskine açık farelerin *S. enterica* serotip Typhimurium ile enfeksiyonunun araştırılması sayesinde. Bu türde, oral aşılamaı takiben, virülans serotip Typhimurium gastrik asiditeyi atlatır ve muhtemelen yerleşik mikroflorayı yenerek ileum ve çekumu kolonize eder.^{5,6} Peyer plaklarını (PP) kaplayan fagositik epitelyal M hücrelerinin istilası ve ayrıca dendritik hücreler (DC'ler) üzerinden alım yoluyla, bakteriler bağırsak epiteli boyunca yer değiştirir ve konakçı dolaşımına erişim kazanır veya bağırsaktan CD18 eksprese eden fagositler içinde taşınır.⁷⁻⁹ Ekstraintestinal enfeksiyon üzerine, bakteriler retikulo-endotelial sistem (RES) yoluyla yayılır ve çeşitli splenositler, ağırlıklı olarak makrofajlar, DC'ler ve polimorfonükleer lökositler (PMN'ler) içindeki granülatöz odakların yanı sıra karaciğerdeki hepatositler ve diğer profesyonel olmayan fagositlerde ikamet eder.¹⁰⁻¹² Bağırsak enfeksiyonunun olmadığı durumda, hücre içi replikasyon ve hayatta kalma, tifonun merkezi virülans özellikleri olarak düşünülebilir. Sistemik bölgelere yerinin taşınması veya bakterilerin periton boşluğuna aşılması durumunda, fagositik öldürme sonucunda hayatta kalması, bakteriyel virülansın önemli bir özelliğidir. Fields ve diğerleri¹³, fagositler içinde bakteriyel hayatta kalmanın virülans için gerekli olduğunu göstermiştir. *Salmonella*; DC'ler, makrofajlar, hepatositler, nötrofiller, kolonositler ve diğer epitel hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücreleri enfekte etme kabiliyetine sahiptir. *In vitro* olarak, hücrelerle temas ettikten birkaç dakika sonra, *Salmonella* içselleştirilir ve bir fagozom veya lizozomdan farklı olarak, *Salmonella* içeren vakuol (SCV) olarak adlandırılan benzersiz bir zara bağlı bölgede ikamet eder.¹⁴⁻¹⁶ Fagositler içinde *Salmonella* SCV oluşumu, fagosit oksidaz

¹Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada and ²Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

³These authors have contributed equally to this work.

Correspondence: Professor BB Finlay, Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, 2185 East Mall, Vancouver, British Columbia, Canada V5T 1Z4.

E-mail: bfinlay@interchange.ubc.ca

Received 23 June 2006; accepted 17 July 2006; published online 5 December 2006



kompleksi ile endozomal füzyondan kaçınma gibi önemli bir işleve sahiptir.¹⁷

İnsanlarda, tifo hastalığı, genel ateş ve halsizlik, karın ağrısı, baş ağrısı, mialji, mide bulantısı, anoreksi ve kabızlık gibi başka semptomlarla birlikte veya bunlar olmaksızın bakteriyel aşılama bir ila 2 hafta sonra ortaya çıkar. İshal ara sıra meydana gelir, ancak yalnızca bağışıklığı baskılanmış kişilerde enfeksiyon tipiktir. Hepatosplenomegali siktir ancak tüm vakalarda görülmez ve yaygın abdominal hassasiyet olağandır. Ateş tipik olarak başlangıçta hafiftir ve hastalık ilerledikçe kötüleşir (Parry ve diğerleri¹⁸ tarafından incelenmiştir). Komplikasyonların yokluğunda, çeşitli enfeksiyon dönemlerini takiben hastalık düzelir, ancak bakterinin semptomatik hastalarda taşınması aylar veya yıllar boyunca devam edebilir ve hastaların küçük bir kısmında nüksetme meydana gelir. Serotip Typhi enfeksiyonunun birincil tedavisi florokinolonlardır, ancak nalidiksik asit ve diğer antimikrobiyal ajanlar da kullanılır. Tedavi vakalarının büyük çoğunluğunda etkilidir ve bakteri temizleme süresini, taşıma oranlarını ve enfeksiyonla ilişkili morbidite ve mortaliteyi azaltmaktadır.¹⁸

ENTEROKOLİT VE İŞHAL

Tutarlı teşhis ve raporlama eksikliği nedeniyle tahminler büyük ölçüde farklılık gösterse de, dünya çapında her yıl 200 milyon ila 1,3 milyar bağırsak hastalığı vakasının ve tifo dışı *Salmonella*'ya bağlı 3 milyon ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir.¹⁹ Tifo gibi, tifo olmayan *Salmonella* türlerinin neden olduğu bağırsak hastalıklarının meydana gelmesi, gelişmekte olan ülkelerde en yüksek düzeydedir, ancak gelişmiş ülkelerde de büyük önem taşımaktadır. *Salmonella* enteropatogenezinin²⁰ yeni fare modeli geliştirilinceye kadar, bağırsak hastalığı çalışması büyük ölçüde sığır ileal halka aşılama ve oral enfeksiyonlar ve kültürlenmiş bağırsak epitel hücrelerinin incelenmesiyle sınırlıydı.

Hayvanlarda, bağırsağın virülant *S. enterica* tarafından kolonize edilmesi durumunda, bakteriler apikal epitelde yerleşir, invazyonla ilişkili virülans mekanizmasını indükler ve fokal ve yaygın PMN infiltratı, kript apseleri, epitelyal nekroz, ödem ve sıvı sekresyonu dahil olmak üzere önemli inflamatuvar değişiklikler ortaya çıkarır.²¹⁻²⁴ İnsan, sığır, faregiller ve tavşan Typhimurium serotip enterokoliti en şiddetli olarak kaudal ileum, çekum ve proksimal kolonda görülür. Bağırsak epiteline nötrofilin gelmesi, bağırsak hastalığının histopatolojik özelliğidir. *In vitro*, kültürlenmiş epitelyal tek katmanlara PMN'nin gelmesi, apikal epitele yakın *Salmonella* tarafından interlökin-8'in (IL-8) indüklenmesi yoluyla gerçekleşir.²⁵ Çeşitli *S. enterica* suşlarının insan bağırsak hastalığına neden olma kabiliyeti, özellikle epitel istilası gerektirmeden T84 hücre tek katmanları boyunca PMN'leri kendine çekme kabiliyetleri ile ilişkilidir.²⁶ Serotip Typhimurium ile nötrofilin bölgeye gelmesi enfeksiyonun ilk 1-3 saatinde gerçekleşirken, yoğun nötrofil göçü ve protein bakımından zengin eksüdaların bağırsak lümenine salgılanması enfeksiyonu takip eden 8-10 saate kadar gerçekleşmez ve ishal bakteri kolonizasyonundan yaklaşık 8-72 saat sonra başlar.^{27,28} Hem inflamasyonun geçici olarak ayrılması ve sekretuar ishal hem de *Salmonella*'nın farklı büyüme evrelerinde farklı inflamasyon indüksiyonu ve sekretuar tepkiler gösterdiğini gösteren diğer kanıtlar, ishal ve inflamasyonun, belki de ilişkili olmasına rağmen,²⁹ enteropatogenezde bağımsız olarak meydana geldiğini düşündürmektedir.

İnsanlarda hastalık tipik olarak, kontamine yiyecek veya suda 50.000'den fazla bakterinin yutulmasını takip eder ve semptomlar tüketimden 6 ila 72 saat sonra ortaya çıkar. Semptomların başlangıcı, akut başlangıç, kramp, karın ağrısı ve kanlı veya kansız ishal ile kendini gösterir. Mide bulantısı ve kusma da sık görülür. Genellikle ileum hastalığıdır; tifo dışı hastalıkta inflamasyon kalın bağırsakta da görülür; nadiren jejunum, duodenum ve midede

enfeksiyonlar görülür.^{21,30} Çocuklarda enterokolit enfeksiyonu, artan inflamatuvar şiddet, kanlı ishal ve artan enfeksiyon süresi ve komplikasyon riski ile kendini gösterir.

Bağırsakla sınırlı enfeksiyonlar için tedavinin olmadığı durumlarda, semptomlar genellikle 5-7 gün sürer ve kendiliğinden düzelir. Sıvı kaybının fazla olduğu durumlarda sıvı ve elektrolit dengesizliklerinin oral veya intravenöz rehidrasyon ile tedavisi gereklidir. Yetişkinlerde, spesifik antimikrobiyal tedavi, yalnızca invaziv hastalığın pozitif belirtilerinin varlığında gereklidir ve hastalık süresini veya semptomların şiddetini azaltmaz. Yenidoğan bağırsak enfeksiyonu da istilanın önlenmesi için tedavi gerektirir.

BAĞIŞIK AKTİVASYONDA SALMONELLA VİRÜLANS BELİRLEYİCİLERİ

Salmonella enfeksiyonunun hücre kültürü ve hayvan modelleri kullanılarak, enfekte olmuş konakçılarda inflamatuvar/bağışıklık tepkilerini harekete geçirmek için kritik olan çok sayıda virülans belirleyicileri tespit edilmiştir. *Salmonella* enfeksiyonu sırasında proinflamatuvar uyarıcılar genel olarak iki kategorinin temsilcisi olarak kabul edilebilir: doğuştan gelen bağışıklığı uyarma yeteneğine sahip patojenle ilişkili motifler ve hastalık patolojisine neden olan konakçı süreçlerini kullanan veya istifade eden virülansla ilişkili proinflamatuvar davranışlar. *In vivo* virülans için kritik öneme sahip olanlar, *Salmonella* patojenite adaları (SPI), özellikle SPI-1 ve -2'dir. Her iki SPI da, konakçı biyokimyasını ve hücre fizyolojisini doğrudan etkilemek için bakteriyel ve konakçı membranlar yoluyla konakçı hücrelere (translokasyon) veya hücre dışı ortama (salgı) "efektörler" olarak bilinen bakteri proteinlerini enjekte edebilen tip III salgılama sistemi (T3SS) adı verilen moleküler bir aparatı kodlar.

SPI-1 VE İNFLAMASYON

1989 yılında Galan ve Curtis³¹, hücre kültüründe bakteriyel invazyon için gerekli olan *Salmonella* genlerini ve daha sonra yatay olarak edinilmiş bir patojenite adası olan SPI-1'in bir parçası olduğu gösterilen tam oral virülans tanımladılar.³² Başlangıçta bir invazyon adası olarak nitelendirilmesine rağmen, SPI-1 doğuştan gelen bağışıklık yollarının aktivasyonu ile ilgili ek fonksiyonlara sahiptir. SPI-1'e bağlı inflamasyon, birden fazla süreci yansıtır gibi görünmektedir: (1) SPI-1 tarafından salgılanan efektör SipA tarafından bağırsak epiteli boyunca PMN'nin bölgeye gelmesinin harekete geçirilmesi; (2) yeri değiştirilmiş SPI-1- efektörlerin uyumlu faaliyeti ile NF- κ B sinyalleşmesinin aktivasyonu ve (3) kaspaz-1-aracılı IL-1 β / IL-18 aktivasyonunun etkinleştirilmesi ve yeri değiştirilmiş SPI-1- efektörü SipB ile proinflamatuvar hücre ölümü.

SIPA VE NÖTROFİLİN BÖLGEYE GELMESİ

Nötrofillerin kültürlenmiş epitelyal tek katmanlara ve bunların arasına gelmesi, IL-8 ve patojenin neden olduğu epitelyal kemoatraktan (PEEC) ve SPI-1 efektörü SipA'nın üretimini gerektirir.³³⁻³⁵ Bağırsak epitelyal tek katmanlarının yakınında saflaştırılmış SipA'nın salgılanması veya doğrudan eklenmesi, PEEC üretimini ve bunun sonucunda bazolateral nötrofillerin apikal epitelyal membrana gelmesini ve aktivasyonunu başlatır.

SIPB VE 'PIROPTOZİS'

SPI-1 efektörü ve translokaz SipB, *in vivo* inflamatuvar hastalık için de kritik öneme sahiptir³⁶ ve spesifik inflamatuvar kaskadların indüksiyonu için *in vitro* gereklidir.³⁷ Konak hücre teması durumunda, SPI-1 T3SS, SipB'yi konak hücre sitozolüne yerleştirir, burada kaspaz-1'i (IL-1 β dönüştürücü enzim) bağlar ve bu da proinflamatuvar sitokinler IL-1 β ve IL-18.³⁷nin katalitik bölünmesine ve salınmasına neden olur.³⁷ Bu aynı zamanda hem apoptoz hem de nekroz özelliklerine sahip olan ve proinflamatuvar doğası nedeniyle 'piroptoz' olarak adlandırılan hızlı bir proinflamatuvar hücre ölümünü başlatır. Model enfeksiyonlarda kaspaz-1 aktivasyonunun önemine ilişkin çalışmalar, alternatif olarak, SPI-1 aracılı kaspaz-1 aktivasyonunun,

murin tifo patogenezi³⁸ sırasında bakterilerin bağırsak lümeninden sistemik bölgelere etkin bir şekilde yerleştirilmesi için gerekli olduğunu ve kaspaz-1 eksikliği olan farelerin *Salmonella* ile bağırsak enfeksiyonuna karşı artan hassasiyeti olduğunu düşündürülen çelişkili sonuçlar vermiştir^{38,39}. Kongenik farelerin kullanımı ve ikinci çalışmada hem kaspaz-1 hem de Ipaf eksikliği olan farelerin murin tifoya daha duyarlı olduğunu gösteren doğrulayıcı kanıtlar, kaspaz-1'in enfeksiyonda koruyucu bir proinflamatuvar rol oynadığını düşündürmektedir.

SPI-1 EFEKTÖRLERİ VE NF-KB SİNYALİZASYONU

Salmonella SPI-1 T3S, mitojenle ilişkili protein kinazların (MAPK'ler) aktivasyonu ile sonuçlanmakta ve bu da NF-kB'nin indüklenmesine neden olmaktadır.^{40,41} Bu, Cdc42'nin aktivasyonunu ve SPI-1 efektör SopE tarafından aşağı akış MAPK sinyalizasyonunu gerektirmektedir.⁴² İlginçtir ki, hücre içi sinyal kaskadlarını ve sitoskeletal mekanizmaları aktive ederek bakteri alımını indükleyen şey SPI-1 efektörleri SipA, SopB, SopD ve SopE/E2'nin koordineli aktivitesidir. Bu önemli proinflamatuvar kaskadın aktivasyonunu takiben, başka bir SPI-1 efektörü, olan SptP, bu yolu antagonize ederek, NF-kB sinyalinin önemli ancak geçici bir SPI-1'e bağlı aktivasyonu ile sonuçlanır.⁴³ İn vivo olarak, bu efektör kombinasyonu, farelerde ve ineklerde erken inflamatuvar patogenezi için esastır ve bazı enfeksiyon modellerinde bağırsak invazivliği ve inflamatuvar patojenite arasındaki örtüşmeyi kısmen açıklar.⁴⁴⁻⁵³

İn vivo olarak, SPI-1 aracılı davranışlar erken bağırsak inflamasyonu için kritik öneme sahip görünmektedir⁵⁴⁻⁵⁶ ancak bunların yokluğu, intraperitoneal zorlamayı takiben sistemik inflamasyonu etkilemez³¹ ve olmadıkları durumda gecikmiş bağırsak inflamasyonu meydana gelir.^{57,58} İlginçtir ki, Model epiteli boyunca PEEC aracılı nötrofil göçünü başlatamamasına rağmen, Yabani tip serotip Typhimurium ile enfekte olmuş kültürlenmiş bağırsak epitelyal tek katmanlarının veya SPI-1 patojenite adası tamamen silinmiş olanların inflamatuvar gen ekspresyon profillerinin karşılaştırılması, bu suşların proinflamatuvar potansiyelinde çok az fark olduğunu göstermiştir.⁵⁹ Bu nedenle, SPI-1'den bağımsız olarak faaliyet gösteren ek faktörlerin inflamatuvar hastalığı indüklemek için yeterli olduğu açıktır.

SPI-2

SPI-2 patojenite adası, murin tifoda hücre içi parazitizm ve sistemik virülans için gereklidir⁶⁰⁻⁶² ve konağın fagosit oksidaz mekanizmasından kaçmak için gereklidir.¹⁷ Son zamanlarda, SPI-2 T3SS'nin rolleri, inflamatuvar hastalıkta da tespit edilmiştir; bu, SPI-2'nin, sistemik hastalığın yanı sıra *Salmonella* enterokolitinin^{57,63,65} erken ve tam indüksiyonu için kritik olduğunu göstermektedir. SPI-2'nin proinflamatuvar aktivitesi daha az tanımlanmış olmasına rağmen, SPI-2 aracılı immün mücadelenin potansiyel yolları olarak birkaç ilginç aday tespit edilmiştir.

Farelerde SPI-1 yokluğunda indüklenen bağırsak inflamasyonu, Toll benzeri reseptör (TLR) adaptörü MyD88'i gerektirmektedir.⁶⁴ TLR aracılı aktivasyonda SPI-2'nin spesifik rolü açıklanmasına rağmen, kısmen diğer proinflamatuvar motiflerin bağırsağın uygun bölgesine, örneğin subepitelyal bölgeye iletilmesine bağlı olabilir.⁶⁶ Bir dizi makalede Uchiya ve diğerleri⁶⁷⁻⁶⁹, SPI-2'nin siklooksijenazın uyarılmasında ve ayrıca konakçı sitokin ekspresyonu ve sinyalizasyonunun modülasyonunda yer aldığını da göstermektedir.

SALMONELLA PATOJENİ İLE İLGİLİ MOLEKÜLER PATERNLER VE BAĞIŞIKLIK AKTİVASYONU

Patern tanıma reseptörleri (PRR'ler), geniş evrimsel soylar boyunca geniş çapta korunan çok önemli bir doğuştan gelen bağışıklık tepkisi

sistemidir. Patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler), bağışıklık tepkilerini harekete geçirmek için PRR'leri uyarabilen viral, mantar ve bakteriyel patojenlerin bileşenlerini içermektedir. Enfeksiyon sırasında *Salmonella* tarafından patofizyolojik öneme sahip birçok PAMP sunulmaktadır. Bunların başlıcaları, bakteriyel flagella aparatının tek parçalı alt birimi olan bakteriyel LPS ve flagellindir.

TLR4 VE LPS

Salmonella LPS'ye yanıt olarak TLR4'ün aktivasyonu, konakçı tepkilerini başlatmak için esastır. İşlevsel bir TLR4'ten yoksun fareler, diğer *Salmonella* direnç lokuslarının varlığından bağımsız olarak, enfeksiyona karşı önemli ölçüde artan duyarlılık gösterirler.⁷⁰⁻⁷⁴ TLR4, intravenöz olarak uygulanan *Salmonella* LPS'ye karşı tam bir inflamatuvar tepki için gereklidir ve *Salmonella* LPS, makrofajlarda güçlü bir inflamatuvar tepki indükleyicisidir,^{75,76} bu, *Salmonella* LPS'nin sistemik enfeksiyon sırasında önemli bir sepsis indükleyicisi olduğunu göstermektedir.⁷⁷ Murin tifosunun aksine, LPS'nin intestinal inflamatuvar salmonellozdaki rolü belirlenmemiştir. Makrofajların LPS stimülasyonu bağırsak hastalığında rol oynayabilmesine rağmen, bağırsak epitel hücrelerinde LPS reseptörü CD14'ün olmaması, *Salmonella* LPS'ye doğrudan tepkide bağırsak epitelinin rol oynamasını pek mümkün kılmamaktadır.

FLAGELLİN

Salmonella flagellin, epitelin bazolateral yüzeyine iletildiğinde polarize epitelyal tek katmanlarda güçlü bir konak inflamasyonu indükleyicisidir.^{59,78} Oroya iletildiğinde, *Salmonella* flagellin, bazolateral TLR5'i uyararak kalsiyuma bağımlı NF-kB aktivasyonu yoluyla IL-8 salgılanmasını başlatır.⁷⁸⁻⁸¹ Yakın zamanda yayınlanan kanıtlar, *Salmonella* flagellin'in hücre içi inflamatuvar sinyalizasyonu da aktive edebileceğini göstermektedir. Birincil ve kültürlenmiş makrofajlarda, hücre içi tek parçalı flagellin, hücre içi PRR sinyali gerektiren bir şekilde IL-1b ve IL-18'in kaspaz-1 aktivasyonunu başlatabilir.^{82,83} Özellikle, bu aktivasyon TLR5'in yokluğunda ve LPS-tolerize makrofajlarda meydana gelir, bu da TLR aktivasyonu gerektirmediğini göstermektedir. *Salmonella*, bağırsak epitelyal kültür süpematnaları ile stimülasyonun ardından tek parçalı flagellini yeniden üretir ve salgılar,⁸⁴ bu, *Salmonella*'nın konak hücreleri tespit ettiği, flagellin ürettiği ve SPI-1 T3SS yoluyla onu konak hücre sitozölüne yerleştirdiği bir diziye işaret etmektedir.

Doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin flagellin tarafından uyarılması, bağırsak inflamasyonu için kritik öneme sahiptir, ancak murin tifo için değil. Bir murin bağırsak inflamasyonu modelinde, flagellar *Salmonella* mutantları, zayıflatılmış erken bağırsak hastalığına neden olmaktadır.⁸⁵ İlginçtir ki, flagellinin proinflamatuvar potansiyeli, en azından kısmen, bağırsak epitelinin bazolateral membranına SPI-2'ye bağlı translokasyonunu gerektirmektedir.⁸⁶

SPI2 VE FLAGELLİNİN UYGULANMASI

Bağırsak epitelyal tek katmanlarında ayrı ayrı bağırsak inflamatuvar tepkilerini başlatabilmelerine rağmen, SPI-1 ila -2 ve PAMP uygulaması iç içe geçmiş görünmektedir. *Salmonella* flagellin monomerlerinin proinflamatuvar kabiliyeti hem SPI-1 hem de -2'ye bağlıdır. Tek parçalı flagellinin kaspaz-1 aktivasyonunu başlatma kabiliyeti, fonksiyonel bir SPI-1 T3SS gerektirmektedir.⁸³ Ayrıca, flagellinin transsitoz bağırsak epiteli ile temastan sonraki 15 dakika içinde gerçekleşir ve bakteriyel içselleştirme gerektirmez,⁷⁸ SPI-2 T3SS gerektirir,⁸⁶ ve belirtildiği gibi, SPI-2'ye bağlı SPI-1'den bağımsız inflamasyon, TLR sinyal adaptörü MyD88'in varlığını gerektirir.⁸⁷ Bu veriler, işlevlerinin bazı bileşenlerini virülans faktörleri olarak hesaba katarak, SPI-1 ve SPI-2'nin *Salmonella* immün aktivasyonunun in vivo patogenezi esnasında PAMP uygulama sistemlerini temsil etmesi olasılığını ortaya koymaktadır.

SALMONELLA ENFEKSİYONLARINDA SİTOKİNLER

Salmonella immün aktivasyonunda şüphesiz birden fazla proinflamatuvar yolak yer almaktadır. Çeşitli virülans stratejilerinden yoksun bakteri suşları ile faregiller ve sığır enfeksiyonlarından elde edilen veriler, bu gözlemi in vivo olarak doğrulamaktadır. Bununla birlikte, hastalık belirtileri konakçı ve patojen arasındaki bir etkileşimi gösterdiği için, bakteriyel virülans programları tifo veya enterokolitin immünopatolojisinden tek başına sorumlu değildir. Hastalığın gelişimi için kritik olan şey, büyük ölçüde sitokin sinyalinin aracılık ettiği çeşitli dokulardaki mikrop ve konakçı hücreler arasındaki temas tarafından harekete geçirilen konak sinyal ortamıdır.

Sitokinler, *Salmonella*'ya karşı doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık tepkisini başlatmada ve düzenlemede çok önemli bir rol oynamaktadır. Enfeksiyonları kontrol etmek ve konakçıya zarar vermeme için pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki doğru denge esastır. Sitokinler birçok farklı hücre tipi tarafından eksprese edilir ve çeşitli hücreler üzerinde etki gösterirler. Doku kültürü, kemik iliği kaynaklı veya birincil hücrelerdeki deneyler, *Salmonella*'nın epitelyal hücrelerdes, makrofajlarda^{89,90} ve DC'lerde sitokinlerin ve kemokinlerin sentezini tetikleyebileceğini göstermektedir.⁹¹⁻⁹³ Sitokin aktivasyonunun sonuçları değişiklik gösterir. İnterferon (IFN)-g, IL-12, tümör nekroz faktörü (TNF)-a, IL-18, dönüştürücü büyüme faktörü -b ve CCL2 *Salmonella* enfeksiyonu esnasında koruyucu işlevlere sahipken, IL-4 ve IL-10, konak savunmasına müdahale etmektedir. (Eckmann ve Kagnoff tarafından incelenmiştir⁹⁴).

İNSANLARDA SİTOKİN ANORMALLİKLERİ VE SALMONELLA'YA KARŞI DUYARLILIK

Çeşitli sitokin anormallikleri, insanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı duyarlılığa yol açar. Tip I sitokin yolundaki (IFN-g/IL-12/IL-23) genetik eksiklikler, *Salmonella* ve *Mikobakteriler* gibi hücre içi patojenlerle enfeksiyona karşı duyarlılığın artmasına neden olmaktadır.^{95,96} Tifo olmayan *Salmonella* serotipleri, bu anormallikleri olan hastalarda ağır bağırsak dışı hastalığa neden olabilir. Makrofajlar ve DC'ler gibi antijen sunan hücreler (APC) tarafından üretilen IL-12, doğal öldürücü (NK) hücreler ve T hücreleri tarafından IFN-g üretimini harekete geçirir ve bu da APC'de IL-12 üretimini yukarı yönlü regüle eder. IFN-g daha sonra makrofajlarda, NK hücrelerinde ve nötrofillerde antimikrobiyal aktiviteyi artırır, ancak *Salmonella* enfeksiyonundaki bu rol enfeksiyonun kontrolü için kritik öneme sahip olmayabilir. IL-12 ve IL-23'ün ortak p40 alt birimi olan IL-12b'deki ve IL-12 ve IL-23 için ortak reseptör alt birimi olan IL-12Rb1'deki eksiklikler, *Salmonella*'ya duyarlılığa yol açmaktadır. Buna karşılık, IFN-gR1 veya IFN-gR2'de eksiklikleri olan hastalar sıklıkla *Mikobakterilerle*, ancak daha az sıklıkla *Salmonella* ile enfekte olmaktadır.⁹⁷⁻¹⁰¹ Bu nedenle, IL-12/IL-23'ün, IFN-g'nin uyarılmasından bağımsız olarak *Salmonella* enfeksiyonuna karşı koruyucu etkiler gösterdiği görülmektedir. Olası bir IFN-g'den bağımsız mekanizma, sırasıyla, makrofajlarda artan bakteri ölümü ve artan nitrik oksit (NO) üretimine yol açan TNF-a, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ve IL-23 tarafından IL-17'nin yukarı yönlü regülasyonu olabilir.

SALMONELLA ENFEKSİYONUNUN KONTROLÜNDE MURİN SİTOKİNLER

Farelerde, *Salmonella*'nın karşılaştığı ilk hücreler, bağırsak epitel hücreleri, DC'ler ve makrofajlardır. Bu hücrelerle etkileşim, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin sentezine neden olmakta ve bu da büyük miktarda nötrofil, makrofaj ve olgunlaşmamış DC'lerin akışına yol açmaktadır. IFN-g, enfeksiyonun erken evresinde bakteriyel replikasyonun kontrolü için önemlidir,¹⁰² ancak

bakterilerin yok edilmesi için yeterli değildir.¹⁰³ TNF-a, IFN-g ile sinerjik olarak mikrobisidal aktiviteyi artırır ve NO üretimini tetikler.¹⁰⁴ IFN-g'nin nötralizasyonu, *Salmonella*'nın öldürülmesinde azalma ile sonuçlanırken, TNF-a'nın nötralizasyonu, artan bir bakteri replikasyonu ile sonuçlanır.¹⁰⁵

IFN-g üretimi, serotip Typhimurium enfeksiyonu ile bağırsakla ilişkili lenfoid dokuda (GALT) ve dalakta hızla yukarı regüle edilir.^{106,107} CD1d-sınırlı NKT hücrelerin, APC'ler tarafından üretilen IL-12'ye bağlı bir şekilde *Salmonella* ile enfekte olmuş farelerde erken IFN-g üretimine de katkıda bulunmasına rağmen,¹⁰⁹ daha önce deneylerde kullanılmamış *Salmonella* ile enfekte olmuş farelerde IFN-g ve TNF-a'nın ana üreticilerinin makrofajlar ve nötrofiller olduğu görülmektedir.¹⁰⁸ T hücreleri ve NK hücreleri, birincil enfeksiyonda yalnızca eser miktarda IFN-g üretmektedir. Buna karşılık, bağışıklık kazanmış hayvanların enfeksiyonu, APC'ler tarafından değil, esas olarak T hücreleri ve NK1.1+ hücreleri tarafından IFN-g üretimine yol açmaktadır.¹⁰⁸ Ayrıca, IFN-g'nin serotip Typhimurium ile kronik enfeksiyonları kontrol ettiği gösterilmiştir. *Salmonella* içeren kronik bir enfeksiyon taşıyan farelerin anti-IFN-g antikor tedavisi, enfeksiyonu yeniden aktive etmekte ve sistemik bölgelerdeki bakteri yükü artmaktadır.¹¹⁰

Ek olarak, önceden süttten kesilmiş fareler, yetişkin farelere kıyasla *Salmonella*'ya karşı artan duyarlılık sergilemektedir. Bunun nedeni, bu farelerde IFN-g'nin düşük ekspresyonudur. IFN-g, enterokolit enfeksiyon sırasında genç hayvanlara kıyasla 6 haftalık farelerde yukarı yönlü regüle edilir ve önceden süttten kesilmiş hayvanlarda bağırsak inflamasyonu hastalığı, IFN-g/- farelerinin enfeksiyonuna benzer şekilde, dalakta daha yüksek bakteri yükü ve daha düşük TNF-a ile sonuçlanır.¹¹¹ Dolayısıyla IFN-g, hem tifo hem de enterokolit hayvan modellerinde önem arz etmektedir. İnsan hastaların verilerinden de açıkça anlaşılacağı gibi IL-12, *Salmonella* enfeksiyonlarını kontrol etmek açısından önemlidir.¹¹² IL-12, IFN-g üretiminin güçlü bir aktivatörü olduğundan, bu IFN-g fonksiyonu ile ilgili olabilir. Bununla birlikte, kısmen yukarıda belirtildiği gibi IFN-g'den bağımsız IL-23'ün aracılık ettiği etkilerden de kaynaklanabilir. IL-12p40/- daha yüksek bakteri yüküne sahip olduğundan, IFN-g ve TNF-IL-18'in azalmış serum sitokin seviyeleri, *Salmonella* ile enfekte olmuş farelerde IL-12 ile indüklenen IFN-g'ye katkıda bulunduğundan ve anti IL-18 tedavisi, enfeksiyon ve hayatta kalma süresinin sonlarında PP'deki IFN-g seviyelerini azalttığından, IL-12p35/- fareleri, serotip Typhimurium veya serotip Enteritidis ile enfeksiyona karşı IL-12p40/- farelerinden daha dirençlidir.^{114,115}

Sitokin ve kemokin üretiminin konakçı için sadece faydalı değil aynı zamanda patolojik sonuçları da olabilir. MCP-1, CCL2, CCL20 ve CCL3 gibi kemokinlerin *Salmonella* enfeksiyonlarında koruyucu rolleri vardır (119, 120) fakat aynı zamanda, enfekte organlara yoğun bir inflamatuvar hücre akışını tetikleyerek doku yıkımına da yol açabilir. Herhangi bir konakçıdaki inflamasyon heterojen bir süreçtir ve konakçı ve patojenik davranışlardan toplu olarak etkilenen çok sayıda karmaşık ve etkileşimli proinflamatuvar kaskadların aktivasyonunun doruk noktasıdır. İki ucu keskin bir kılıç olan inflamasyon, konağın enfeksiyonu kontrol ettiği stratejidir, tüm akut enfeksiyonlarda bazı patojenlerin konak fizyolojisi üzerinde etki kazandığı ve nihayetinde hem patojenin hem de konakçının ölüm nedeni olan Truva atıdır. Açıkça görülüyor ki, *Salmonella enterica* türleri ile enfeksiyon esnasında, hem konakçı hem de bakteri, doğuştan gelen bağışıklık/inflamatuvar tepkileri barındırmak için güçlü uyarıcılar temin etmektedir.

Salmonella, aktive edildiğinde, konakçıda bir inflamatuvar tepkinin harekete geçirilmesiyle sonuçlanan çok sayıda virülans mekanizması içermektedir. İnsan hücrelerinde ve hayvan modellerinde doğuştan gelen bağışıklık ve iltihaplanmanın aktivasyonunda SPI 1 ve 2 için

yeni keşfedilen roller, bu bakterilerin tesirli bir konak tepkisi ortaya çıkarmak için özel mekanizmalar geliştirdiğini göstermektedir. Doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunda bazı SPI-1 davranışlarının rolü iyi belirlenmiş olsa da, yeni keşfedilen yollar da - örneğin, PAMP'lerin hücre içi model tanıma reseptörlerine SPI-1'e bağımlı teslimi gibi - *Salmonella* kaynaklı hastalığın etyopatogenezindeki kritik adımları açıkça göstermektedir. SPI-2'nin intestinal inflamatuvar hastalıkta yakın zamanda tarif edilen rolleri, *Salmonella*'nın bir dizi spesifik inflamatuvar değişikliği etkilemek için doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunun birden çok ve paralel sistemlerini kullandığını göstermektedir. Bu davranışlar, harekete geçirilen konakçı tepkisinin bariz potansiyel antibakteriyel etkilerine rağmen gelişmiştir; bu da, bu davranışların bakterilere bazı adaptif avantajlar sağladığını, belki invazyona daha duyarlı yeni bir konakçı ortamı yarattığını veya bakterilerin sistemik organlara yayılması için kritik olan hücrelerin bölgeye gelmesine ve bunun sonucunda ortama yeniden bulaşmasına neden olduğunu işaret etmektedir.

Benzer şekilde, *Salmonella* enfeksiyonuna duyarlı konakçılar, enfeksiyonun etkin kontrolü için gerekli olan tepkileri harekete geçirirler. Sitokin tepkilerinin aktivasyonu veya TLR4, Nrpml veya fagosit oksidaz gibi kritik konakçı direnç faktörlerinin varlığı, *Salmonella*'ya karşı güçlü ve etkili bir bağışıklık tepkisi için olmazsa olmazdır. Bunların olmadığı durumlarda, bakterilerle yapılan deneysel enfeksiyonlar hemen hemen her zaman ölümcüldür. Yine de, sepsis, septik şok ve inflamasyon gibi *Salmonella* enfeksiyonunun klinik komplikasyonların ortaya çıkması bu tepkilerin çoğunun harekete geçirilmesinden kaynaklanmaktadır.

Salmonella ve konakçıların doğal ve adaptif immün disfonksiyon üretmek için etkileşime girdiği yeni yollar araştırıldıkça, bu önemli hastalığın patofizyolojisi daha iyi anlaşılacaktır. Antimikrobiyallerin akılcı kullanımı *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinin bel kemiğini oluşturabilir ve aynı zamanda immünomodülatör ajanların kullanımı, antibiyotik direnci geliştirme riski olmaksızın konağın enfeksiyonu kontrol etme kabiliyetini seçici olarak geliştirme potansiyeline sahiptir. Dahası, bakteriyel kolonizasyona karşı hastalığın harekete geçirilmesi için kritik öneme sahip bakteriyel faktörlerin tespiti, daha etkili aşılardan üretilmesi için bakteriyel hedefler ortaya koymaktadır.

İnflamasyonun konakçıyı mı yoksa bakterileri mi tercih ettiği, sadece şiddetine değil, aynı zamanda inflamatuvar tepkinin doğasına da bağlı olabilir. Çeşitli *Salmonella* türleri ve serotiplerle enfeksiyon, çok sayıda etkileşimli virülans stratejileri kullanarak önemli düzeyde bağışıklık aktivasyonuna yol açmakta ve bunun sonucunda morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır. Konak tepkileri, enfeksiyonun kontrolü açısından kritik öneme sahip olmakla birlikte, immünoopatolojinin doğasına ve ciddiyetine de katkıda bulunabilir. Bu mücadelenin nihai sonucu, henüz anlamadığımız şekillerde konakçının veya bakterilerin lehine olabilir, ancak bu mücadele eden güçlerin anlaşılmasının, *Salmonella* enfeksiyonunun profilaksisi ve tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirmede önemli bir adımı temsil ettiği aşikardır.

TEŞEKKÜR BÖLÜMÜ

Makalenin eleştirel incelemesi için laboratuvar üyelerine teşekkür etmek istiyoruz. Finlay laboratuvarındaki çalışma, Kanada Sağlık Araştırmaları Enstitüleri (CIHR) ve Howard Hughes Tıp Enstitüsü'nden (HHMI) BBF'ye verilen faaliyet hibeleri ile desteklenmektedir. BAC, CIHR'de Öğrencilik yapmaktadır; GAG ise, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Michael Smith Sağlık Araştırmaları Vakfı (MSFHR) ve Genome Canada'dan burs almaktadır. BBF, CIHR'nin Seçkin bir Araştırmacısı, HHMI'nin Uluslararası Araştırmacı Bilim İnsanı ve British Columbia Üniversitesi Peter Wall Enstitüsü'nün Seçkin bir Profesörüdür.

- 1 Ochman H, Groisman EA. The origin and evolution of species differences in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *EXS* 1994; 69: 479–493.
- 2 Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 2001; 107: 775–780.
- 3 Baumler AJ, Tsois RM, Ficht TA, Adams LG. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 1998; 66: 4579–4587.
- 4 Hornick RB. Pathogenesis of typhoid fever. *J Egypt Public Health Assoc* 1970; 45: 247–259.
- 5 Bonhoff M, Drake BL, Miller CP. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 86: 132–137.
- 6 Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* 2005; 73: 3228–3241.
- 7 Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994; 180: 15–23.
- 8 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R *et al*. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361–367.
- 9 Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W *et al*. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999; 401: 804–808.
- 10 Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 1997; 186: 569–580.
- 11 Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers BJ, Ljunggren HG, Wick MJ. *In vivo* activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2001; 69: 5726–5735.
- 12 Nakoneczna I, Hsu HS. The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis. *Br J Exp Pathol* 1980; 61: 76–84.
- 13 Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5189–5193.
- 14 Gorvel JP, Meresse S. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect* 2001; 3: 1299–1303.
- 15 Meresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* 1999; 18: 4394–4403.
- 16 Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB. Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1999; 1: 33–49.
- 17 Vazquez-Torres A, Xu YS, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC *et al*. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 2000; 287: 1655–1658.
- 18 Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. *N Engl J Med* 2002; 347: 1770–1782.
- 19 World Health Organization Drug-Resistant *Salmonella*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>. 2005. WHO website.
- 20 Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M *et al*. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 2003; 71: 2839–2858.
- 21 McGovern VJ, Slavutin LJ. Pathology of *Salmonella* Colitis. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 483–490.
- 22 Giannella RA, Formal SB, Dammin GJ, Collins H. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum. *J Clin Invest* 1973; 52: 441–453.
- 23 Clarke RC, Gyles CL. Virulence of wild and mutant strains of *Salmonella typhimurium* in ligated intestinal segments of calves, pigs, and rabbits. *Am J Vet Res* 1987; 48: 504–510.
- 24 Finlay BB, Heffron F, Falkow S. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 1989; 243: 940–943.
- 25 McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993; 123: 895–907.
- 26 McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae – a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 1995; 63: 2302–2309.
- 27 Tsois RM, Adams LG, Ficht TA, Baumler AJ. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 1999; 67: 4879–4885.
- 28 Wray C, Sojka WJ. Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res Vet Sci* 1978; 25: 139–143.
- 29 Wallis TS, Hawker RJ, Candy DC, Qi GM, Clarke GJ, Worton KJ *et al*. Quantification of the leucocyte influx into rabbit ileal loops induced by strains of *Salmonella typhimurium* of different virulence. *J Med Microbiol* 1989; 30: 149–156.
- 30 Boyd JF. Pathology of the alimentary tract in *Salmonella typhimurium* food poisoning. *Gut* 1985; 26: 935–944.
- 31 Galan JE, Curtiss III R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6383–6387.
- 32 Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 1995; 15: 749–759.
- 33 McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 1998; 160: 455–466.
- 34 Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL, McCormick BA. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect Immun* 1999; 67: 608–617.

- 35 Lee CA, Silva M, Siber AM, Kelly AJ, Galyov E, McCormick BA. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12283–12288.
- 36 Zhang SP, Santos RL, Tsois RM, Stender S, Hardt WD, Baumler AJ *et al.* The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 2002; 70: 3843–3855.
- 37 Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2396–2401.
- 38 Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* 2000; 192: 249–258.
- 39 Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ *et al.* Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J Exp Med* 2006; 203: 1407–1412.
- 40 Chen LM, Hobbie S, Galan JE. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 1996; 274: 2115–2118.
- 41 Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997; 159: 5550–5559.
- 42 Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998; 93: 815–826.
- 43 Fu Y, Galan JE. A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999; 401: 293–297.
- 44 Watson PR, Paulin SM, Bland AP, Jones PW, Wallis TS. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infect Immun* 1995; 63: 2743–2754.
- 45 Lodge J, Douce GR, Amin II, Bolton AJ, Martin GD, Chatfield S *et al.* Biological and genetic characterization of TnphoA mutants of *Salmonella typhimurium* TML in the context of gastroenteritis. *Infect Immun* 1995; 63: 762–769.
- 46 Watson PR, Galyov EE, Paulin SM, Jones PW, Wallis TS. Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect Immun* 1998; 66: 1432–1438.
- 47 Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S *et al.* A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 1997; 25: 903–912.
- 48 Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson PR, Wallis TS, Galyov EE. Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* 1998; 66: 5799–5804.
- 49 Wallis TS, Wood M, Watson P, Paulin S, Jones M, Galyov E. Sips, Sops, and SPIs but not STN influence *Salmonella* enteropathogenesis. *Mech Pathogen Enteric Dis* 2 1999; 473: 275–280.
- 50 Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 1998; 29: 883–891.
- 51 Wood MW, Jones MA, Watson PR, Siber AM, McCormick BA, Hedges S *et al.* The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cell Microbiol* 2000; 2: 293–303.
- 52 Zhang S, Santos RL, Tsois RM, Mirold S, Hardt WD, Adams LG *et al.* Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEBS Microbiol Lett* 2002; 217: 243–247.
- 53 Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymeris H, Tran QT, Lawhon S *et al.* SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 2005; 73: 146–154.
- 54 Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymeris H, Raffatellu M, Figueiredo J *et al.* Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003; 71: 1–12.
- 55 Santos RL, Tsois RM, Baumler AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 3–12.
- 56 Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 2004; 72: 795–809.
- 57 Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhor K, Li Y *et al.* Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005; 73: 7161–7169.
- 58 Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M *et al.* The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; 174: 1675–1685.
- 59 Zeng H, Carlson AQ, Guo YW, Yu YM, Collier-Hyams LS, Madara JL *et al.* Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol* 2003; 171: 3668–3674.
- 60 Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 1995; 269: 400–403.
- 61 Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2593–2597.
- 62 Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7800–7804.
- 63 Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005; 73: 3219–3227.
- 64 Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M *et al.* The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; 174: 1675–1685.
- 65 Bispham J, Tripathi BN, Watson PR, Wallis TS. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* 2001; 69: 367–377.
- 66 Hapfelmeier S, Hardt WD. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* 2005; 13: 497–503.
- 67 Uchiya K, Groisman EA, Nikai T. Involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2 in the up-regulation of interleukin-10 expression in macrophages: Role of protein kinase A signaling pathway. *Infect Immun* 2004; 72: 1964–1973.
- 68 Uchiya K, Nikai T. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent expression of suppressor of cytokine signaling 3 in macrophages. *Infect Immun* 2005; 73: 5587–5594.
- 69 Uchiya K, Nikai T. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection induces cyclooxygenase 2 expression in macrophages: involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Infect Immun* 2004; 72: 6860–6869.
- 70 MacVittie TJ, O'Brien AD, Walker RI, Weinberg SR. Inflammatory response of LPS-hyporesponsive and LPS-responsive mice to challenge with Gram-negative bacteria *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Adv Exp Med Biol* 1982; 155: 325–334.
- 71 O'Brien AD, Weinstein DA, Soliman MY, Rosenstreich DL. Additional evidence that the Lps gene locus regulates natural resistance to *S. typhimurium* in mice. *J Immunol* 1985; 134: 2820–2823.
- 72 O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol* 1980; 124: 20–24.
- 73 Weinstein DL, Lissner CR, Swanson RN, O'Brien AD. Macrophage defect and inflammatory cell recruitment dysfunction in *Salmonella* susceptible C3H/HeJ mice. *Cell Immunol* 1986; 102: 68–77.
- 74 Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J *et al.* Toll-like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to *Salmonella*: importance of the Kupffer cell network. *J Immunol* 2004; 172: 6202–6208.
- 75 Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock RE, Finlay BB. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J Immunol* 2000; 164: 5894–5904.
- 76 Royle MC, Totemeyer S, Alldridge LC, Maskell DJ, Bryant CE. Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *J Immunol* 2003; 170: 5445–5454.
- 77 O'Brien GC, Wang JH, Redmond HP. Bacterial lipoprotein induces resistance to Gram-negative sepsis in TLR4-deficient mice via enhanced bacterial clearance. *J Immunol* 2005; 174: 1020–1026.
- 78 Gewirtz AT, Simon Jr PO, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD *et al.* *Salmonella typhimurium* translocates fl gellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 2001; 107: 99–109.
- 79 Yu Y, Zeng H, Lyons S, Carlson A, Merlin D, Neish AS *et al.* TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G282–G290.
- 80 Gewirtz AT, Rao AS, Simon Jr PO, Merlin D, Carnes D, Madara JL *et al.* *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca(2+)-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 2000; 105: 79–92.
- 81 Zeng H, Wu H, Sloane V, Jones R, Yu Y, Lin P *et al.* Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G96–G108.
- 82 Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R *et al.* Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol* 2006; 7: 576–582.
- 83 Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI *et al.* Cytosolic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 2006; 7: 569–575.
- 84 Subramanian N, Qadri A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic *salmonella*. *Nat Immunol* 2006; 7: 583–589.
- 85 Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 2004; 72: 4138–4150.
- 86 Lyons S, Wang L, Casanova JE, Sitaraman SV, Merlin D, Gewirtz AT. *Salmonella typhimurium* transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J Cell Sci* 2004; 117: 5771–5780.
- 87 Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M *et al.* The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; 174: 1675–1685.
- 88 Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E *et al.* A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95: 55–65.

- 89 Rosenberger CM, Pollard AJ, Finlay BB. Gene array technology to determine host responses to *Salmonella*. *Microb Infect* 2001; 3: 1353–1360.
- 90 Svensson M, Johansson C, Wick MJ. *Salmonella typhimurium*-induced cytokine production and surface molecule expression by murine macrophages. *Microb Pathog* 2001; 31: 91–102.
- 91 Yrlid U, Wick MJ. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter. *J Immunol* 2002; 169: 108–116.
- 92 Pietila TE, Veckman V, Kyllonen P, Lahteenmaki K, Korhonen TK, Julkunen I. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in *Salmonella*-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 909–920.
- 93 Yrlid U, Svensson M, Johansson C, Wick MJ. *Salmonella* infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27: 313–320.
- 94 Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microb Infect* 2001; 3: 1191–1200.
- 95 Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet* 2002; 32: 97–105.
- 96 van d V, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 739–749.
- 97 de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, Breda Vriesman PJ *et al*. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998; 280: 1435–1438.
- 98 Doffinger R, Patel S, Kumararatne DS. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 440–446.
- 99 Sanal O, Turul T, De Boer T, van d V, Yalcin I, Tezcan I *et al*. Presentation of interleukin-12/23 receptor beta1 deficiency with various clinical symptoms of *Salmonella* infections. *J Clin Immunol* 2006; 26: 1–6.
- 100 Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998; 19: 491–494.
- 101 MacLennan C, Fieschi C, Lammas DA, Picard C, Dorman SE, Sanal O *et al*. Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against *Salmonella* in humans. *J Infect Dis* 2004; 190: 1755–1757.
- 102 Muotiala A, Makela PH. The role of IFN-gamma in murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microb Pathog* 1990; 8: 135–141.
- 103 Muotiala A, Makela PH. Role of gamma interferon in late stages of murine salmonellosis. *Infect Immun* 1993; 61: 4248–4253.
- 104 Tite JP, Dougan G, Chatfield SN. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J Immunol* 1991; 147: 3161–3164.
- 105 Gulig PA, Doyle TJ, Clare-Salzler MJ, Maiese RL, Matsui H. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1997; 65: 5191–5197.
- 106 Nauciel C, Espinasse-Maes F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 450–454.
- 107 Ramarathinam L, Niesel DW, Klimpel GR. *Salmonella typhimurium* induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J Immunol* 1993; 150: 3973–3981.
- 108 Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ. The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J Immunol* 2002; 169: 4450–4459.
- 109 Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003; 4: 1230–1237.
- 110 Monack DM, Bouley DM, Falkow S. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1+/+ mice and can be reactivated by IFN-gamma neutralization. *J Exp Med* 2004; 199: 231–241.
- 111 Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric *Salmonella* infection. *J Immunol* 2005; 175: 1127–1136.
- 112 Mastroeni P, Harrison JA, Chabalgoity JA, Hormaeche CE. Effect of interleukin 12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect Immun* 1996; 64: 189–196.
- 113 Lehmann J, Bellmann S, Werner C, Schroder R, Schutze N, Alber G. IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. *J Immunol* 2001; 167: 5304–5315.
- 114 Dybing JK, Walters N, Pascual DW. Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated *Salmonella typhimurium* infections. *Infect Immun* 1999; 67: 6242–6248.
- 115 Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H *et al*. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1999; 67: 478–483.

İçerik listesi burada mevcut: [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Food Research International

Dergi ana sayfası: www.elsevier.com/locate/foodres

Kabuklu yumurtalarda *Salmonella* Enteritidis: Mevcut sorunlar ve kontrole ilişkin beklentiler

Zoe R. Howard^a, Corliss A. O'Bryan^b, Philip G. Crandall^b, Steven C. Ricke^{b,*}^a Department of Defense, San Antonio, Texas 78215, United States^b Center for Food Safety and Department of Food Science, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas 72704, United States

Makale Bilgileri

Makale geçmişi:

Alındığı tarih 10 Mart 2011

Kabul tarihi 14 Nisan 2011

Anahtar kelimeler:

Salmonella Enteritidis

Kabuklu yumurtalar

Yatay bulaşma

Dikey bulaşma

Özet

Salmonella spp'nin neden olduğu gıda kaynaklı hastalık dünya çapında bir sorundur. Amerika Birleşik Devletleri'nde *Salmonella* Enteritidis, insan hastalıklarından en sık izole edilen ikinci serotiptir ve kabuklu yumurtalar ve yumurta içeren ürünlerle güçlü bir ilişkisi olduğu bilinmektedir. Yumurtalar, ya kabuğun içine nüfuz yoluyla ya da doğrudan üreme sisteminde oluşum esnasında dahili olarak kontamine olabilir. Bu derleme, yumurta üretiminin fizyolojisinin ve yumurtanın bakteri bulaşmasını önlemek için sahip olduğu çeşitli fiziksel ve kimyasal bariyerlerin kısa bir açıklamasıyla başlamaktadır. *S. Enteritidis*'in dikey ve yatay bulaşmasında rol oynayan faktörlerin yanı sıra, tavuğun kolonizasyonunda zorunlu tüy dökümünün rolü de incelenmiştir. Hasat öncesi ve sonrası azaltma stratejileri de tartışılmaktadır.

© 2011 Elsevier Ltd. Tüm hakları saklıdır.

1. Giriş

Salmonelloz, son yıllarda dünya çapında, gıda ile ilgili bir hastalık olarak yükseliştir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), ABD'de her yıl 1 milyon non-tifoidal salmonelloz vakasının meydana geldiğini tahmin etmektedir (Scallan ve arkadaşları, 2011). Dünya çapında, non-tifoidal *Salmonella* insidansının 200 milyon ila 1,3 milyar arasında değiştiği ve her yıl tahmini ölüm sayısının 3 milyon olduğu tahmin edilmektedir (Coburn, Grassi, & Finlay, 2007). ABD'de hastaların %27'sinin hastaneye yatırılması gerektiği ve 378 vakanın ölümle sonuçlandığı, yani %0,5'lik bir ölüm oranı olduğu tahmin edilmektedir (Scallan ve arkadaşları, 2011).

Serotip *Salmonella* Enteritidis, ABD'de insan hastalıklarından en sık izole edilen *Salmonella* serotipi olarak Typhimurium'dan sonra ikinci sıradadır. Verilerin mevcut olduğu en son yıl olan 2006'da, *S. Enteritidis*, rapor edilen salmonelloz vakalarının neredeyse %17'sine neden olmuştur (CDC, 2010a). Avrupa Birliği (AB), *Salmonella*'ya bağlı tüm doğrulanmış salgınların %60'ından *S. Enteritidis*'in sorumlu olduğunu bildirmiştir (EFSA, 2009). *Salmonella* spp. ve özellikle *S. Enteritidis*, yumurta ve yumurta ürünleri ile güçlü bir ilişkiye sahiptir (Patrick ve arkadaşları, 2004). A sınıfı kabuklu yumurtalar veya yumurta içeren ürünler, *S. Enteritidis*'in bulaşması için en yaygın araç olmuştur (Braden, 2006). 2010 yılında, ABD'de ülke çapında yaklaşık 2000 hastalığa yol açan yumurtayla ilişkili bir salgın meydana gelmiştir (CDC, 2010b).

Bu derlemede yumurta ve yumurta ürünlerinin kısa bir açıklaması ve yumurta oluşumunun fizyolojisinin tartışılması yer alacaktır. Yumurtanın doğal savunmasını ve ayrıca

Salmonella enfeksiyon yollarını özetleyeceğiz. *S. Enteritidis* ile sürü enfeksiyonu için risk faktörlerinin yanı sıra hasat sonrası müdahale yöntemleri de tartışılacaktır.

2. Yumurta ve yumurta ürünleri

Amerika'da, 2008 yılında kişi başına ortalama 248 yumurta tüketilmiştir (Evans, 2009). Yumurta; kabuklu yumurta, sıvı, dondurulmuş ve kurutulmuş ürünler şeklinde ucuz bir besin kaynağı olarak kullanılmaktadır (Ricke, Birkhold, & Gast, 2001). ABD yumurta endüstrisi, Çin'den sonra dünyanın en büyük ikinci tavuk yumurtası üreticisidir (NASS, 2009). 2007 ABD Tarım Nüfus Sayımına göre, 2007'de çoğunluğu küçük ölçekli üreticiler olan yumurta tavuğuna sahip 146.000 ABD yumurta çiftliği bulunuyordu (USDA, 2009). Bununla birlikte, daha büyük üreticiler, ticari olarak üretilen sofralık yumurtaların büyük bir kısmını temin etmektedir. United Egg Producers'a göre, yumurta üretiminin %95'inden fazlası, yalnızca sürü başına 75.000'den fazla yumurtaya sahip olan 240 yumurta üreticisi şirketten gelmektedir. ABD'de her biri 1 ila 5 milyon yumurta tavuğuna sahip altı yumurta üreticisi ve her biri 5 milyondan fazla yumurta tavuğuna sahip 12 şirket bulunmaktadır.

Yumurta ve yumurta ürünleri yalnızca güvenilir bir besin kaynağı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda diğer ürünlerde de çeşitli işlevlere sahiptir. Yumurta sarısındaki lesitin ve kolesterolün emülsifiye edici özellikleri, yumurtaları mayonez ve emülgatör gerektiren diğer gıda sistemlerinin değerli bileşenleri yapmaktadır (Baker & Bruce, 1994). Albümin veya yumurta akı, keklerde, kremalı pastalarda ve diğer fırınlanmış ürünlerde kullanılan ısıya dayanıklı köpük oluşturma kabiliyeti ile tanınmaktadır. Yumurta ürünleri içeren diğer ürünler arasında erişte, şekerleme ve dondurmalar bulunmaktadır (Ricke ve arkadaşları, 2001). Başka temel bileşenlere sahip ürünlerde kullanılan yumurtalara gizli yumurta denmektedir.

Yumurta ürünleri, kullanım kolaylığı, maliyet tasarrufları (işçilik ve depolama için) ve porsiyon kontrolü nedeniyle gıda

hizmeti operasyonlarında popülerdir. (Messens, Grijspeerd, Herman, & Billet, 2002). Yumurta ürünleri, dondurulmuş, soğutulmuş sıvı ve kurutulmuş formlardaki bütün yumurtaları, yumurta aklarını ve yumurta sarılarını ve ayrıca özel yumurta ürünlerini içermektedir. Özel yumurta ürünleri arasında önceden soyulmuş katı pişmiş yumurtalar, omletler, yumurta köfteleri, kişler, kiş karışımları, çırpılmış yumurtalar, sahadna yumurtalar ve diğerleri bulunmaktadır. Yumurthanın gıda kaynağı olarak yaygın kullanımı nedeniyle bu ürünün güvenliği önem arz etmektedir. Yumurta ve yumurtanın içerikleri, yalnızca yumurtlamadan sonra değil, aynı zamanda yumurtalıkta oluşum sırasında da bakteriler tarafından çeşitli şekillerde kontamine olabilir. Transovarian enfeksiyon yoluyla kontamine olmuş yumurtalar hem endüstri hem de tüketiciler için önemli bir tehlike oluşturabilir ve bu nedenle yumurta tavuğunun üreme sisteminin anlaşılmasını gerektirir.

3. Yumurtlamanın fizyolojisi

Tavuğun dışı üreme sistemi iki ayrı bölüme ayrılmaktadır: yumurtalık ve yumurta kanalı. Çoğu tavukta, yalnızca sol yumurtalık ve yumurta kanalı işlevseldir, sağ tipik olarak gelişim sırasında geriler ve yetişkin tavukta işlevsel değildir. (Okubo, Akachi, & Hatta, 1997). Bununla birlikte, sol yumurtalık ve yumurta kanalının hasar gördüğü ve onun yerini almak için sağ yumurtalığın geliştiği durumlar olmuştur.

3.1. Foliküler hiyerarşi

Olgun bir yumurta tavuğunda yumurtalık, herhangi bir zamanda farklı büyüklük ve olgunluktaki foliküllerden oluşur ve her 24 ila 40 saatte bir folikül ovulasyona uğrar (Etches, 1990). Henüz büyük miktarda yumurta sarısı materyaline sahip olmayan olgunlaşmamış foliküller, daha olgun foliküllerde çeşitli hormonlar salgılayan ayrı bir hücre tabakası olan granüloza hücreleri içerir (Etches, 1990). Olgun yumurta tavuğunun foliküler hiyerarşisi, 10 ila 35 mm'lik 7 ila 10 folikül, 1 ila 10 mm'lik 15 ila 20 folikül ve 1 mm'den küçük birkaç bin folikülden oluşmaktadır (Williams & Sharp, 1978). Hiyerarşinin en büyük ve en olgun folikülü F1 folikülü olarak adlandırılır ve olgunlaşma tamamlandığında üreme sistemine salınır. F1 folikülü, tamamen olgunlaşmış bir yumurta sarısı görünümündedir, ancak yine de, yumurta sarısı materyalinin taşınması ve biriktirilmesi amacıyla folikülün yüzeyini kaplayan görünür kılcak damarlarla birlikte bir folikül kese içinde kapsüllenmiş biçimdedir (Johnson, 2000). F1 folikülünden daha küçük olan ve olgunluk hiyerarşisinde giderek küçülen foliküller F2, F3, F4 ve F5 olarak adlandırılır; F1 folikülü ile birlikte bunlara büyük sarı foliküller denmektedir. Ayrıca yumurta sarısı materyalinin birikmeye başladığı küçük sarı foliküller de mevcuttur ve karaciğerden gelişen folikül içine kan akışı yoluyla daha fazla yumurta sarısı materyali taşındığından, bunlar boyut ve hacim olarak F folikülleri olmak üzere ileriye hareket ederler (Johnson, 2000).

3.2. Folikül büyümesi

Foliküllerin olgunlaşması ve büyümesi üç ayrı aşamaya ayrılmaktadır. Birincisi, birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilen yavaş bir büyüme dönemidir. Bu yavaş büyüme aşamasını, yumurta sarısı proteininin gelişen folikül içine getirildiği birkaç aylık daha hızlı bir dönem takip eder. Folikül büyümesinin son aşaması, 6 ila 11 günlük bir süre boyunca hızlı büyüme ile karakterize edilmektedir. Folikülün üreme sistemine salınmasından önceki bu son günlerde, folikül içine büyük miktarda yumurta sarısı materyali alınır (Johnson, 2000). Yumurta sarısı bileşenleri karaciğerde sentezlenir ve vasküler sistem yoluyla yumurtaya taşınır. Yumurta sarısı içerikleri, vitellogenin (VTG) ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) için öncüler, kan kılcak damarları tarafından granüloza hücreleri boyunca (Johnson, 2000). VTG ve VLDL oosit içinde biriktirilir ve folikül ağırlığı ve hacminde gözlenen artışa katkıda bulunur.

3.3. Üreme sisteminin hormon düzenlemesi

Luteinize edici hormon (LH), yumurta tavuğunda ovulasyonun düzenlenmesinde özellikle önemli bir hormondur. Olgun F1 folikülünün ovulasyonundan yaklaşık 6 saat önce LH'de bir artış gözlenir (Wilson & Sharp, 1973). LH'nin amacı hiyerarşideki en büyük F folikülünün ovulasyonunu harekete geçirmektir (Etches, 1990). LH ayrıca tavuğun yumurtlama döngüsü için önemli olan steroidlerin üretimini de destekler (Etches, 1990). Robinson ve arkadaşları (1988) androstenedion ve estradiolün küçük sarı foliküllerde üretildiğini, adrostenedionun teka tabakası tarafından salgılandığını ve hepsinin LH tarafından uyarıldığını ortaya koymuşlardır. Luteinize edici hormon ayrıca folikül içindeki granüloza hücrelerinden progesteron üretimini uyarıma hizmet etmektedir. Androjenler, yumurtlamadan yaklaşık 12 ila 36 saat öncesine kadar folikülün teka tabakasından salınır ve ana dalgalanmadan önce LH tarafından uyarılır (Etches, 1990). Tüm büyük F folikülleri, yumurtlama döngüsü boyunca kullanılan steroidleri ve hormonları üretse de, F1 folikülü, belirli bir yumurtlama esnasında tipik olarak yalnızca en büyük F folikülünün salındığı gerçeğini hesaba katarak, LH'nin etkisine çok daha fazla tepki verir (Robinson & Etches, 1986).

Folikül uyarıcı hormon (FSH) da yumurtlama döngüsünde önemli bir rol oynar, ancak icraatları LH'ninkinden daha az tanımlanmıştır (Hammond, Burke, & Hertelendy, 1981). LH gibi, FSH de küçük sarı foliküllerden progesteron üretimini ve salınımını uyarır. Daha küçük, yumurtlama öncesi foliküller, görünüşe göre FSH'nin ana hedefidir (Imai & Nalbandov, 1971). FSH'nin tüm foliküllere en sık şekilde yumurtlamadan 12 ila 16 saat önce bağlandığı da bilinmektedir (Etches, Croze, & Duke, 1981).

Progesteron, foliküler hiyerarşinin büyük F1 folikülünden salınır ve görünüşe göre nispeten düşük LH seviyeleri tarafından uyarılmaktadır (Etches, MacGregor, Morris, & Williams, 1983). Progesteron salınımı da hipotalamus bezinden gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) salgılanmasını harekete geçirir. GnRH'nin, yumurtlamadan 4 ila 6 saat önce büyük LH dalgalanmasını başlattığı bilinmektedir (Wilson & Sharp, 1973). LH'deki bunun ardından gelen artış, progesteron üretimini hızlandırır. Hem LH hem de progesteron, F1 folikülünü çevreleyen foliküler keseyi parçalama ve üreme kanalı açıklığı olan infundibulumu düşmesine olanak sağlama yeteneğine sahiptir (Etches, 1990).

3.4. Yumurthanın üreme kanalına inişi

Yumurtlanmış folikül infundibulumda 15 ila 30 dakika kalır ve burası büyük olasılıkla, vitellin zarın dış tabakasının ve albuminin kalazal tabakasının üretildiği yerdir (Burley & Vadehra, 1989). Folikül daha sonra yumurta kanalının albumin salgılayan kısmına iner ve burada yaklaşık 3 saat kalır (Okubo ve arkadaşları, 1997). Albumin kaplı yumurta sarısı daha sonra kabuk zarlarının biriktiği isthmusa hareket eder ve bu işlem bir saatten biraz fazla sürer (Okubo ve arkadaşları, 1997). Rahim, yumurta kanalının çok kısa bir kısmıdır, ancak yumurta, kalsifikasyon sürecini tamamlamak için yaklaşık 21 saat orada tutulur (Okubo ve arkadaşları, 1997). Yumurta, yumurta kanalının son kısmı olan vajinadan, kış olarak bilinen dış açıklığa doğru geçer. Kış, hem yumurtlama hem de dışkıların giderilmesi için ortak bir açıklıktır, ancak bir tavuk her iki işlevi aynı anda gerçekleştiremez. Kloak olarak bilinen bir iç kapak, bir yumurta veya dışkı deliğe ulaşana kadar vajinal kanalı ve bağırsak yolunu birbirinden ayırır; bir tavuk yumurtlarken, kloak aşağı iner ve bağırsak yolunu kapatır (Koch, 1973).

4. Bakteriyel kontaminasyona karşı yumurta savunma mekanizmaları

Yumurtalar tavuk türleri için öncelikle bir üreme aracı olarak işlev görmektedir ve bu nedenle yumurta, bir civcivin yumurtadan çıkana kadar olgunlaşacağı 21 günlük bir süre boyunca gelişmekte olan bir embriyoyu

koruyabilmelidir (Haines, 1939). Bu nedenle, biyolojik bir sistem olarak yumurtalar, mikrobiyal kontaminantların civciv gelişimine müdahalesini sınırlamak için hem kimyasal hem de fiziksel olarak belirli savunma mekanizmalarını gerektirmektedir.

4.1. Fiziksel savunma mekanizmaları

4.1.1. Kütikül

Yumurtlamadan hemen önce kabuğun üzerine salgılanan bir protein tabakası olan kütikül, yumurtanın kalsiyum bazlı kabuğun gözeneklerini tıkayarak bakteri, maya ve küfleri besin açısından zengin yumurta sarısından uzak tutmak için sahip olduğu ilk fiziksel savunma mekanizmasıdır (Mayes & Takeballi, 1983; Simkiss, 1968). Bununla birlikte, kütikül, aşınma ile büyük ölçüde ortadan kalkmadan önce yalnızca yaklaşık 96 saatlik bir etkinliğe sahiptir. (Fromm, 1963; Mayes & Takeballi, 1983). Nem, yumurtanın sıcaklığı, yumurtlamadan hemen sonra yumurtayı çevreleyen ortam hava sıcaklığı ve yumurtanın yıkanması, yumurtanın içine *Salmonella* gibi bakterilerin nüfuz etmesini önlemek için kütikülün görevinin başında kaldığı süreyi etkileyebilir (Ball, Logan, & Hill, 1975).

4.1.2. Kabuk

Yumurta kabuğu, dış kontaminasyona karşı gözle görünür fiziksel engellerden birini temsil etmektedir. Tavuk yumurtası kabukları, çoğu kabuğun dışından içine uzanan 7000 ila 17.000 arasında gözenek içermektedir (Mayes & Takeballi, 1983). Gözenekler üstte daha geniştir ve spiral bir yol boyunca alt uca doğru daralır. Yumurtanın büyük ucunda küçük ucundan daha fazla gözenek bulunabilir (Walden, Allen, & Trussell, 1956). Yumurtaların hava hücrelerinin genellikle kabuğun geniş ucunda bulunmasının nedeni budur. Bazı hatalı biçimlendirilmiş gözeneklerin çapı çok daha büyüktür ve bakteriler için yumurtaların içine daha kolay erişim sağlayabilirler (North, 1978). Bakterilerin yumurtanın içine girmesi konusunda kabuğun kalınlığı da rol oynayabilir (Taylor & Martin, 1929). Kabuk kalınlığı arttıkça gözenek uzunluğu da artar. Gözenekler düz değildir ve bunun yerine kabuk maddesinin kalınlığı boyunca sarmal şeklindedir. Daha uzun gözeneklerin daha fazla spiral yapısı olması muhtemeldir ve bu nedenle sınırlı hareketlilikleri nedeniyle bakterilerin gezinmesi için daha zor bir yol teşkil eder (Mayes & Takeballi, 1983).

Yumurta yüzeyindeki nem, kütikül yeterince kurumadan önce kabuk yüzeyine ulaşırsa, bakteri hücreleri yumurtanın iç kısmına daha iyi erişebildiğinden, bakterilerin nüfuz etme sürecine yardımcı olabilir (Humphrey, 1999). Yumurtanın hızlı soğuması, kabuk sabit kalırken yumurta sarısının ve yumurta akının büzülmesine neden olur, bu da negatif bir basınç üretir ve böylece bakteri hücrelerini yumurtanın dışından kabuğun sarmal şeklindeki gözeneklerinden çeker (Lock & Board, 1992). Mevcut USDA yönetmelikleri, yumurta yıkama suyunun en az 32,2 °C olmasını veya işleme hattına giren en sıcak yumurtadan 11,1 °C daha sıcak olmasını zorunlu kılmaktadır (USDA/AMS, 2004).

4.1.3. Kabuk zarları

Doğrudan kabuğun altında, son fiziksel savunma hattı olarak, dış ve iç zar şeklinde iki kabuk zarı bulunmaktadır. Bu iki kabuk zarı, hücrenin içindeki ve dışındaki gazların solunumunun hava hücresi oluşturduğu durumlar dışında, genellikle yumurta kabuğunun sivri ucunda tüm noktalarda bağlanmaktadır. (Mayes & Takeballi, 1983). Dış zar doğrudan yumurtanın kabuğuna bağlıdır ve bakteri ve diğer mikroorganizmaların nüfuz etmesi çok zor olan karmaşık bir yapı sağlayan üç lifli katmandan oluşmaktadır (Moran & Hale, 1936). İç kabuk zarı, yumurtanın iç merkezine en yakın olandır ve iki katmandan oluştuğu düşünülmektedir (Mayes & Takeballi, 1983). Kabuk zarlarının, sundukları karmaşık gözenekler ve lifler sistemi aracılığıyla potansiyel kontaminantlara karşı bir şekilde bir filtre görevi gördüğü varsayılmaktadır. Ortak hareket eden kabuk zarlarının, bakteri istilasına karşı kabuktan daha iyi bir savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir (Garibaidi, 1960).

4.2. Kimyasal savunma mekanizmaları

Mikroorganizmalar kütikül, kabuk ve kabuk zarlarının sağladığı fiziksel engeller karşısında başarılı olur ve nüfuz ederlerse, albüminin zorlu ortamında bir takım kimyasal engellerle karşı karşıya kalacaklardır (O'Leary & Busta, 1974). Bu kimyasal savunma mekanizmalarından biri, lizozim enzimidir (Cuguenec, Nau, Molle, Le Graet, & Brule, 2000). Lizozim, süt, idrar ve kan gibi biyolojik sıvılarda bulunur ve hücre duvarındaki N-asetilnöramin ve N-asetilglukosamin arasındaki (1,4) bağı parçalayarak Gram pozitif bakterileri parçalar (Cuguenec ve arkadaşları, 2000). Gıda kaynaklı hastalık salgınlarıyla ilişkili patojenlerin çoğu Gram negatif olmasına ve lizozime duyarlı olmamasına rağmen, yumurtalardan izole edilen bozulma organizmalarının %60 kadarı Gram pozitifdir (Lucore, Jones, Anderson, & Curtis, 1997). Yumurtanın kimyasal savunmasında daha önemli bir oyuncu da, yumurta akının demirini şelatlayarak işlev gören ve böylece onu bakterilerin büyümesi için kullanılamaz hale getiren ovotransferrin proteindir (Lock & Board, 1992). Ovomukoid, bakterilerin albüminin proteinlerini kullanma yeteneğini engelleyen bir proteinaz inhibitörüdür (Baron, Gautier, & Brule, 1997). Yumurta akı ayrıca hücre büyümesi için gerekli olan bir B vitamini olan biyotini bağlayan avidin bileşenini içermektedir (Baron ve arkadaşları, 1997). Avidin yumurta kanalında üretilir ve yumurta akının küçük bir bileşenidir (Mine, 2000).

4.3. Vitellin zarı

Bakteriler, hem kabuğun fiziksel engellerini hem de albümin kimyasal engellerini geçtikten sonra, yumurta sarısına ulaşmadan önce bir savunma mekanizmasıyla daha karşı karşıya kalır. Vitellin zar yumurta sarısını çevreler ve yumurtanın bölümlere ayrılmasından sorumludur (Burley & Vadehra, 1989). Bu zar bozulursa, yumurta sarısı ve yumurta sarısı içerikleri karışabilir, bu da yumurtaya demir ve diğer bileşiklerin girmesine neden olur ve yumurtanın savunması yok olursa da zayıflar (Burley & Vadehra, 1989). Vitellin zar, sadece yumurta sarısı ve albümin ayrımından sorumlu olmakla kalmaz, aynı zamanda döllemeye yer alan materyallerin nüfuz etmesine olanak sağlamada da rol oynar, ancak besin moleküllerinin ve bakteri hücrelerinin transferini önlemesi gerekmektedir (Debruyne & Stockx, 1978; Mann, 2008).

4.4. *Salmonella* tarafından yumurta kontaminasyonu yolları

Sağlam yumurta içeriğinin *Salmonella* kontaminasyonu için iki olası yol bulunmaktadır. Yatay bulaşmada, *Salmonella* yumurta kabuğundan geçer veya transovarian yolda (dikey bulaşmada), yumurtalar kabuk bileşenleri tarafından kaplanmadan önce üreme organlarının *Salmonella* ile enfekte olması sonucu yumurta doğrudan kontamine olur (Miyamoto ve arkadaşları, 1998). Yumurta içeriğinin *Salmonella* ile özellikle de *S. Enteritidis* ile kontaminasyonu için hangi yolun en önemli olduğu net değildir.

4.5. Yatay bulaşma

Yumurtlamadan sonra yumurta potansiyel olarak çeşitli kontamine alanlara maruz kalır ve dışkı dahil üzere yüksek düzeyde nemli organik maddeler, koruma ve besin kaynağı sağlayarak *Salmonella*'nın hayatta kalmasına ve büyümesine yardımcı olabilir. *ES. Enteritidis*, *S. Heidelberg* veya *S. Typhimurum* içeren dışkı ile yapay olarak kontamine olmuş yumurtalar 25 °C'de saklanmış ve 3 gün sonra tüm serotiplerin sayısında 4 ila 5 log artış meydana gelmiştir (Schoeni, Glass, McDermott, & Wong, 1995). Bununla birlikte, özellikle sıcaklıklar ve bağl nem düşük tutulursa, *Salmonella* fekal kontaminasyon olmadığında da yaşayabilir ve büyüyebilir (Messens, Grijspeerd, & Herman, 2006). Yumurtanın sahip olduğu fiziksel ve kimyasal engellere rağmen, *Salmonella*'nın yumurtaya nüfuz ettiği ortaya konmuştur (Messens, Grijspeerd, & Herman, 2005).

Çevresel kontaminasyon ile kabuğun kontaminasyonu arasındaki korelasyon çalışmaları, karmaşık sonuçlar vermiştir. Çevresel numunelerin %72'sinden *Salmonella*'nın izole edildiği bir yumurtlama tesisinde

kabukların sadece %7,8'inin kontamine olduğu bulunmuştur (Jones, Rives, & Carey, 1995). Davies ve Breslin (2004) aşılanmamış sürülerin yumurta kabuklarının %1,0'inin S. Enteritidis ile kontamine olduğunu ve çevresel numunelerin %25,6'sına kıyasla aşılı tavukların yumurta kabuklarının sadece %0,18'inin kontamine olduğunu tespit etmiştir. Yumurtaların numune alınma zamanı da kabuklarda *Salmonella*'nın saptanmasında bir faktördür. S. Enteritidis ile deneysel olarak oral yolla aşılanmış tavuklardan elde edilen yumurta kabukları aşılamadan sonraki ilk hafta boyunca incelendiğinde kabukların %50'den fazlasının kontamine olduğu görülmüştür ve bu görülme sıklığı aşılamadan 8 hafta sonra %8'e kadar düşmektedir (Bichler, Nagaraja, & Halvorson, 1996; Gast & Beard, 1990).

Araştırmacılar, bakterilerin yumurta kabuğuna en kolay yumurtlamadan sonraki ilk birkaç dakika içinde nüfuz ettiğini öne sürmüşlerdir (Miyamoto ve arkadaşları, 1998; Padron, 1990). Ek olarak, yumurta, tavuğun vücut sıcaklığından (42 °C) daha soğuk sıcaklıklara maruz kalmakta, bu da belki de bakterilerin yumurta kabuğuna ve zarlara daha kolay nüfuz etmesine imkân verecek bir negatif basınç oluşturmaktadır (Board, 1966). Sıcak yumurta nemli, serin bir ortamla karşılaştığında, bakterilerin kabuğa nüfuz etmesi için koşulların ideal olduğu varsayılmaktadır (Berrang, Cox, Frank, & Buhr, 1999).

Bazı araştırmacılar, kütikülün yumurtanın bakteri nüfuzuna karşı ilk savunma hattı olduğunu ve kütikülün kuruyup yumurta yaşlandıkça ve küçüldükçe gözeneğin bakteri nüfuzuna maruz kaldığını varsayılmaktadır (Mayes & Takeballi, 1983). Bazı çalışmalar, kütikül birikiminin kritik öneme sahip olduğuna ve birikimin yokluğunda bakterilerin nüfuzunun çok muhtemel olduğuna işaret etmektedir (De Reu ve arkadaşları, 2006; Messens ve arkadaşları, 2007). Bununla birlikte, diğer araştırma grupları, kütikülün birikmesi ile *Salmonella*'nın kabuktan nüfuz etmesi arasında bir ilişki bulamamıştır (Messens ve arkadaşları, 2005; Nascimento, Cranstoun, & Solomon, 1992).

Kabuğun özgül ağırlığı, kabuk ağırlığı veya kabuk kalınlığı ile tanımlanan yumurta kabuğu kalitesinin de yumurtaya bakteri nüfuzunda bir rolü olduğu varsayılmaktadır. Daha yüksek yumurta üretimi ve daha fazla yumurta ağırlığına yönelik tavuk türlerinin seçilmesi, kabukların daha düşük kaliteli neden olmuştur (Roberts & Brackpool, 1994) ve Jones, Anderson, Curtis, ve Jones (2002) tarafından gösterildiği gibi bunlar kontaminasyona daha yatkındır. Tavuğun yaşı, kabuk kalitesini etkileyen diğer bir faktördür ve kabukların, hava hücrelerinin ve içeriğin kontaminasyonunun daha yaşlı tavuklarda daha fazla olduğu bulunmuştur (Jones ve arkadaşları, 2002). Yerden kafese hareket veya aşılama gibi stres faktörlerinin de kabuk kalitesini etkilediği gözlemlenmiştir (Roberts & Brackpool, 1994).

Farklı bakteri cinsleri ve türlerinin de yumurtanın kabuğuna nüfuz etme bakımından farklı yeteneklere sahip olduğu görülmektedir. De Reu ve arkadaşları (2006) yumurtaların içeriğinden izole edilen seçilmiş 7 bakteri türünün yumurta kabuğuna nüfuz etme yeteneklerini karşılaştırdılar. Gram negatif hareketli ve kümelenmeyen bakteriler olan *Pseudomonas* sp., S. Enteritidis ve *Alcaligenes* sp.'nin kabuğa nüfuz etme potansiyelinin en yüksek olduğunu bulmuşlardır. S. Enteritidis ve ardından *Carnobacterium* sp. ve *Serratia marcescens* sağlan yumurtalara girmiş ve karşılaştırılan 7 türden arasında en sık üylen bakteriler olmuştur.

Albümin birçok antibakteriyel kimyasala sahip olsa da, yumurtaya girdikten sonra bakterilerin uzun süre hayatta kalabileceklerine dair kanıtlar bulunmaktadır. Howard ve arkadaşları (2006) S. Typhimurium'un 8 haftalık depolama süresince, soğutma koşullarında bile yumurta içinde yaşayabildiğini ve hatta net büyüme gösterebildiğini ortaya koymuşlardır. Daha sonraki çalışmalarda, Howard ve arkadaşları (2007) yumurta bileşenlerini S. Enteritidis ile aşıladı ve 8 hafta boyunca buzdolabında saklama süresine bağlı olarak bakterinin hayatta kalmasını ve büyümesini gözlemlədiler. Depolama periyodu sırasında yumurta sarısı kontaminasyonuna yol açan vitellin zarı bozulmasına dair hiçbir kanıt bulamamış olmalarına rağmen, S. Enteritidis'in vitellin zarı üzerinde ve albümin içinde hayatta kaldığını gözlemlədiler ve bazı durumlarda patojenin net bir şekilde büyüdüğünü kaydettiler (Howard ve arkadaşları 2007). Bu araştırma, depolama sırasında hızlı soğutma ve soğuk zincirin sürdürülmesi ihtiyacını desteklemektedir.

4.6. Dikey bulaşma

Gıda kaynaklı hastalık salgınlarında yaygın olarak rol oynayan bakterilerin çoğu, dış kaynaklardan yumurtaya göç etme yeteneğine sahip olsa da, bazılarının alternatif bir yolu var gibi görünmektedir (Mayes & Takeballi, 1983). Bir takım *Salmonella* serotipi, özellikle de S. Enteritidis söz konusu olduğunda, yumurta tavuğunun transovaryan enfeksiyonu meydana gelebilir ve enfeksiyondan sonra bırakılan yumurtalar *Salmonella* içerebilir (Humphrey, 1999). Kanıtlar, tavuk yumurtalarının S. Enteritidis ile transovaryan enfeksiyonunun, NPIP programında takip edilen izolatların neden olan kanatlı konakçıya özgü *Salmonella* hastalığında söz konusu olan aynı enfeksiyon yoluna benzer olabileceğini göstermektedir (Benson & Keller, 1999).

4.6.1. Yumurtalığın kolonizasyonu

Bazı araştırmacılar, özellikle tavuğun bağırsağının S. Enteritidis tarafından kolonizasyonunun söz konusu olmadığı durumda S. Enteritidis üreme dokusunda lokalize olabileceğinden, tavuğun üreme kanalında meydana gelebilecek yumurta kontaminasyonunun yumurta kabuğuna nüfuzdan daha olası olduğuna inanmaktadır (Lister, 1988). Ek olarak, S. Enteritidis, muhtemelen üreme sistemi hücreleri içinde hayatta kalarak, tavuğun bağışıklık tepkisinden kaçınılabiliyor gibi görünmektedir (Gast & Holt, 2000).

Çok sayıda deneysel çalışma, yumurtalığın, yumurta kanalından daha sık S. Enteritidis tarafından kolonize edildiğini göstermektedir (Gast, Guraya, Guard, Bouldin, Holt, & Moore, 2007). Bu durumda S. Enteritidis'in, yumurtlamadan önce foliküllerin hücreleri ile etkileşime girmiş olması gerekmektedir. S. Enteritidis'in foliküler granuloza hücrelerine yapışması gözlenmiştir (Thiagarajan, Saeed, & Asem, 1994) ve organizma bu hücreleri istila edebilir ve hücrelerin içinde çoğalabilir (Thiagarajan, Saeed, Turek, & Asem, 1996). Howard ve arkadaşları (2005) olgunlaşmamış küçük beyaz foliküllerin, küçük ve büyük sarı foliküllere göre istilaya daha duyarlı olduğunu ve belki de üreme döngüsü boyunca yumurtaların sürekli olarak enfeksiyonuna yol açtığını tespit etmişlerdir. Dawoud ve arkadaşları (2011) farklı S. Enteritidis suşları tarafından folikül istilasını değerlendirmek için benzer bir in vitro istila tahlili kullandılar. Test edilen beş S. Enteritidis suşunun tamamının, negatif kontrol olan *Escherichia coli* K12'nin elde ettiği değer %0,00003'e kıyasla, %0,016 ila %0,034 arasındaki ortalama istila yüzdesi ile 2 saat sonra folikülleri istila edebildiğini belirlediler. Bununla birlikte, foliküllerin dejenerasyonunun sonuçlanacağına inanıldığından, yumurta kontaminasyonunun ana kaynağının yumurtalık kolonizasyonu olduğu varsayılmamaktadır ve enfekte tavuklarda yumurtlamanın azaldığına dair bir kanıt bulunmamaktadır (Gantois ve arkadaşları, 2009). Diğer araştırmacılar, S. Enteritidis'in yumurta sarısının kendisinden daha çok vitellin zar ile ilişkili olduğunu belirlediler (Gast & Beard, 1990; Gast & Holt, 2000). S. Enteritidis, görünüşe göre diğer serotiplerin sahip olmadığı bazı özelliklere de sahiptir; Okamura ve arkadaşları (2001a,b) S. Enteritidis'in yumurtalıkları ve folikülleri diğer serotiplerden çok daha yüksek oranda kolonize ettiğini buldular. S. Typhimurium'un yumurtalığı eşit derecede kolonize edebilmesi istisnasıyla, Gantois ve arkadaşları (2008), tarafından da benzer sonuçlar bulunmuştur.

Diğer araştırma, albüminin kontaminasyon için en yaygın alan olduğunu göstermiştir ve bu da, yumurta kanalı dokularının kolonizasyonunu göstermektedir (Keller, Benson, Krotec, & Eckroade, 1995). Vajina, isthmus veya magnumun kontaminasyonu, *Salmonella*'nın kabuğa, kabuk zarlarına veya albümin içine girmesine neden olabilir.

4.6.2. Vajina kolonizasyonu

Salmonella ile intravajinal olarak aşılanan tavuklarda, yumurta kabuğunda yüksek oranda kontaminasyon bulunmuş, (Miyamoto ve arkadaşları, 1997), yumurtlamadan sonra yumurtanın soğuması nedeniyle yumurtanın içine nüfuz etmesine yol açmıştır (Miyamoto ve arkadaşları, 1998). Ayrıca, S. Enteritidis'in diğer serotiplere kıyasla vajinanın epiteline daha fazla tutunma kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir (Miyamoto ve arkadaşları, 1998). Görünüşe göre serotiplerin invazivliği lipopolisakarit tipi ile bağlantılıdır, tip O9 (S. Enteritidis), O4 (S. Typhimurium, S. Heidelberg ve S. Agona) ve diğer lipopolisakarit tiplerinden daha invazivdir (Mizumoto, Sasai, Tani, & Baba, 2005).

4.6.3. Isthmus ve magnum kolonizasyonu

S. Enteritidis'in hem isthmus hem de magnum hücrelerinin doku kültürlerini istila edebildiği ve içinde çoğalabildiği gösterilmiştir (De Buck, Pasmans, Van Immerseel, Haesebrouck, & Ducatelle, 2004). Bir in vivo döngü modeli

deneyi, S. Enteritidis'in isthmus döngüsünde magnum döngüsünden daha istilacı olduğunu göstermiştir (De Buck ve arkadaşları, 2004). Yumurtlayan tavuklara intravenöz olarak S. Enteritidis bulaştırıldığında, isthmusun tübuler bez hücrelerinden magnuma kıyasla daha fazla bakteri izole edilmiştir (De Buck ve arkadaşları, 2004). Bu sonuçlar, S. Enteritidis'in yumurtaya albümin yoluyla girdiği ve yumurtaları kontamine ettiği hipotezi ile uyumludur (Schoeni ve arkadaşları, 1995).

Bu kontaminasyon yolu üzerinde artan araştırmalara rağmen, kabuklu yumurtaların S. Enteritidis ile enfeksiyonu biraz nadir görünmektedir. Ticari sürülerde, bırakılan yumurtaların %0.03'ünden daha azı S. Enteritidis ile kontaminedir (Gast & Holt, 2001). Yumurtalarda S. Enteritidise ilişkin olarak gerçekleştirilen bir risk değerlendirmesi, Amerika Birleşik Devletleri'nde 20.000 yumurtadan sadece 1'inin (%0,005) S. Enteritidis ile kontamine olduğunu tahmin etmektedir (Ebel & Schlosser, 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl üretilen 90 milyardan fazla yumurta ile her yıl pazara 4,5 milyon kontamine yumurta girme potansiyeli bulunmaktadır (USDA/NASS, 2010). AB'de yumurta üretimi 2008'de 104 milyar yumurtaydı. AB'de S. Enteritidis için yürütülen bir risk değerlendirmesi, mevcut verilerden bir milyon yumurtada kontamine yumurta sayısını tahmin etmenin zor olduğu sonucuna varmıştır. Bir ülkede bir milyon yumurtada kontamine yumurta sayısının 14 ile 150 arasında olduğu tahmin edilirken, ikinci bir ülkede bu sayının 2 ile 28 arasında olduğu tahmin edilmiştir (EFSA, 2010).

4.7. Yumurta tavuklarında S. Enteritidis enfeksiyonu için risk faktörleri

4.7.1. Biyo-güvenlik

Çiftlikteki insanların ve ekipmanların hareketlerinin kontrolü ve tavukların kemirgenlere, böceklerle veya *Salmonella* taşıyabilecek yabani kuşlara ve memelilere maruz kalmasının sınırlandırılması organizmayı sürüye sokma veya mevcut sürüler arasında veya eski bir sürüden yeni bir sürüye aktarma potansiyelini azaltır (Crippen, Sheffield, Esquivel, Droleskey, & Esquivel, 2009; Henzler & Opitz, 1992; Olsen & Hammack, 2000). Henzler ve Opitz (1992) 5'i S. Enteritidis'ten temiz olarak değerlendirilen ve 5'i çevresel örneklerin kültür sonuçlarıyla belirlendiği üzere kontamine olarak değerlendirilen, farelerin bulaştığı 10 kümes hayvanı çiftliğini araştırdılar. Kontamine çiftliklerde, farelerin %24,0'ından S. Enteritidis izole edilmiş, ancak temiz çiftliklerdeki farelerde tespit edilmemiştir. Fare dışı peleti başına 10^5 S. Enteritidis kadar tespit edilmiş ve enfeksiyon, enfekte olmuş fare popülasyonunda 10 ay kadar devam etmiştir. Küçük un kurdu böceği, *Alphitobius diaperinus* (Panzer), yumurtacılık endüstrisinde ciddi bir zararlıdır; dış kaynaklardan elde edilen *Salmonella*'yı içselleştirdiği ve sindirim kanalında bakterileri barındırdığı gösterilmiştir ve bu nedenle *Salmonella*'nın yayılması için aktif bir kaynak olabilir (Crippen ve arkadaşları 2009). İki S. Enteritidis salgınında araç olduğu düşünülen ve yumurtaları üreten kafesli yumurta tesislerinde toplanan karasinekler analiz edilmiş ve patojen açısından pozitif test edilmiştir (Olsen & Hammack, 2000).

Kümes sistemlerindeki farklılıklar da biyo-güvenlik önlemlerini etkileyebilir. Serbest dolaşimli kümeslerde tavukların zamanlarının bir kısmını dışarıda geçirmelerine izin verilir, bu da vahşi yaşamla etkileşimi artırır ve kalıcı bir *Salmonella* kaynağı olarak hizmet edebilecek toprağı kontamine eder (Holt ve arkadaşları, 2011). Bununla birlikte, birçok geleneksel kafes sistemi 20 yıldan daha eskidir ve derin gübre çukurları, istiflenmiş kafesler ve bantlar içeren sistemin doğası gereği temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi zordur, bu da eski sürüden yeni sürüye *Salmonella*'nın taşınmasına neden olabilir (Carrique-Mas ve arkadaşları 2009). 2012'den itibaren geleneksel kafes sistemlerinin yasaklanacağı Avrupa'da yapılan bir araştırma, S. Enteritidis'in saçılması için risk faktörlerinin geleneksel batarya tipi kafeslerini, üretim rauntları arasında temizlik yapılmamasını ve kışın gelişini içerdiğini bulmuştur (Van Hoorebeke ve arkadaşları, 2010).

4.8. Tüy dökümü sağlamak için yemden kesme

Yetişkin tavukların tüylerini yenilemek için yılda bir kez tüy dökmesi doğaldır ve aynı zamanda vücut ağırlığı kaybolur ve yumurtlama durur (Mrosofsky & Sherry, 1980). ABD'deki bazı ticari yumurtacılık operasyonlarında, tavuklar ilk yumurtlama döngüsünün bitiminden önce tüy dökme teşvik edilir; bu onların üreme sistemini yeniler (Brake, 1993) ve ikinci bir yumurtlama

döngüsüne girmelerini sağlar (North & Bell, 1990). Tüy dökümünü zorlamak için tarihsel olarak yaygın olan yöntem, birkaç gün boyunca yemin kesilmesi yöntemidir. (Bell, 2003; Mrosofsky & Sherry, 1980; Ricke, Dunkley, McReynolds, Dunkley, & Nisbet, 2010). Bununla birlikte, tüy dökme teşvik etmek amacıyla yemin kesilmesi süreci streslidir ve çoğu kez, tüy dökümünün ilk 2 haftasında artan ölüm oranlarına yol açar (Bell, 2003). Yemin kesilmesiyle tüy dökümünün tetiklenmesi de S. Enteritidis'in dışı yoluyla sağlanmasında artışa (Holt, 1993; Holt & Porter, 1992; Holt, Macri, & Porter, 1995), S. Enteritidis'in organlarda yayılmasına (Holt, 1995), eski enfeksiyonun nüksetmesine (Holt & Porter, 1992) ve tüy dökme kontrollerine kıyasla S. Enteritidis ile enfeksiyona karşı artan duyarlılığa (Holt, 1993) yol açar. Tavuklar aç kaldığında S. Enteritidis için bulaşıcı doz azalır (Holt, 1995). Ek olarak, araştırmacılar, tüy dökme tavuklara kıyasla tüy dökme tavukların ortamdaki *Salmonella* kontaminasyonunda bir artış olduğunu kaydetmişlerdir (Murase ve arkadaşları, 2001). Durant, Corrier, Byrd, Stanker ve Ricke (1999) yemin 9 gün kesilmesinin, tüy dökmemiş tavuklara kıyasla hem mahsulde hem de tavukların çekumunda S. Enteritidis kolonizasyonunu artırdığını belirtmişlerdir.

4.8.1. Tüy dökümü için yemden kesmeye alternatifler

Çoğu tavukların beslenmesini bir şekilde manipüle etmeyi içeren ve aç bırakmadan tüy dökme teşvik eden alternatif yöntemler araştırılmıştır. Ricke (2003)'ye göre, aç bırakmadan tüy dökme beslenme düzeninin başarılı olabilmesi için, bu beslenme düzeni tavukların yemek yemeyi reddetmemeleri için lezzetli olmalı, tüy dökümünü üreme kanalının gerilediği noktaya kadar uyarmalı, ikinci döngünün yumurta üretimi ve yumurta kalitesinin yemin kesilmesiyle elde edilenlere eşdeğer olmasını sağlamalı ve ikerik öğeleri hazır ve ekonomik olmalıdır.

Tüy dökme teşvik etme yöntemleri, beslenme düzenindeki temel besin seviyelerinin azaltılmasını veya yumurta üretimini azaltan şeylerle beslemeyi içermektedir (Bell, 2003; Park, Birkhold, Kubena, Nisbet, & Ricke, 2004). Bazı başarılı beslenme düzenlerinde tuzun veya sodyumun (Naber, Latshaw, & Marsh, 1984) veya kalsiyumun (Martin, Morris, Gehle, & Harwood, 1973) azaltılmasını içermektedir, ancak bu beslenme düzenleri diğer araştırmacılar tarafından test edildiğinde tutarsız sonuçlar vermiştir (Berry, 2003). Yüksek konsantrasyonlarda çinko ile besleme, geleneksel yem kesme ile karşılaştırıldığında daha yüksek yumurta üretimine ve daha büyük yumurta ağırlıklarına yol açmıştır (Park ve arkadaşları, 2004). Moore ve arkadaşları (2004) ayrıca, çinko kullanımının tüy dökümü esnasında S. Enteritidis kolonizasyonunu azaltma potansiyeline sahip olduğunu bulmuştur. Alüminyum veya potasyum iyodürün de yumurta üretimini durdurduğu kanıtlanmıştır (Arrington, Santa Cruz, Harms, & Wilson, 1967; Hussein, Cantor, & Johnson, 1989; McCormick & Cunningham, 1987), ancak bu beslenme düzenleri tutarsız sonuçlar vermektedir, daha pahalıya mal olmaktadır ve tavukların birbirini galalamasına neden olabilir (Webster, 2003; Biggs, Persia, Koelkebeck, & Parsons, 2004). Doğal ürünler de test edilmiştir. 10 ppm tiroksin eklenmiş, esas olarak üzüm çekirdeği posası içeren bir beslenme düzeni, geleneksel yem kesme yöntemi kadar etkili olmuştur (Keshavarz & Quimby, 2002). Besin değeri düşük tahıl veya yüksek lifli yemler de başarıyla test edilmiştir. Beslenme düzeninde %12 jojoba unu kullanılması, başarılı bir tüy dökümü ve tüy dökümü öncesine göre daha yüksek yumurta üretimi ile sonuçlanmıştır (Vermant ve arkadaşları, 1998). Araştırmacılar, %50 öğütülmüş pamuk tohumu ile beslenmenin, yem alımında gönüllü bir azalmaya yol açtığını ve yemi tamamen kesmek kadar etkili olduğunu belirlediler (Davis, Lordelo, & Dale, 2002). Yüksek düzeyde kaba buğday kepeği kullanmanın etkili bir beslenme düzeni olduğu tespit edilmiştir (Seo, Holt, & Gast, 2001), ancak büyük bir ticari ölçekte kullanımı uygun değildir, çünkü yüksek oranda kaba buğday kepeği içeren yemler, yem tankında sertleşir ve yemliklere akmaz. (Shimmura, Eguchi, Uetake, & Tanaka, 2008).

Bu beslenme düzenlerinin tüy dökümünü başarılı bir şekilde başlatmasına ve yumurta üretiminin yüksek bir düzeye geri dönmeye olanak sağlamasına rağmen, araştırmacılar özel olarak S. Enteritidis kolonizasyonu konusunu ele almamışlardır ve

test edilen değişikliklerin çoğu atık veya işleme yan ürünleridir ve her zaman hazır bulunmayabilir. (Dunkley ve arkadaşları, 2009; Park ve arkadaşları, 2004). Yonca, düşük metabolik enerjiye sahip, kolayca bulunabilen bir yem maddesidir Landers ve arkadaşları (2005) yonca kespisi veya peletlenmiş yonca ile beslemenin tüy dökme başlatma konusunda yemden keme kadar etkili olduğunu ve tüy dökümü sonrası yumurta üretimi ve kalitesinin, yem kesme ile tüy dökümü yapılan tavuklarınkine eşdeğer olduğunu tespit etmişlerdir. Ağız yoluyla S. Enteritidis bulaşması tehdidi altındaki yemden kesilen tavuklara kıyasla yonca ile beslenme düzeninde mahsul kolonizasyonunda önemli bir azalma görülmüştür (Woodward ve arkadaşları, 2005). McReynolds ve arkadaşları (2006) %100 yonca ile beslemenin yanı sıra %30 standart yumurta tavuğu rasyonlu %70 yonca beslenme düzenlerinin, çekumda S. Enteritidis kolonizasyonunu azalttığını belirlediler Dunkley ve arkadaşları (2007c) farklı tüy dökümü beslenme düzenlerini tavuklara oral olarak uyguladılar ve tavuklara %100 yonca kırıntısı verildiğinde, yemden kesmeye kıyasla S. Enteritidis kolonizasyonunda bir azalma olduğunu belirlediler. Yonca kırıntılarına kıyasla yemden kesilen grupta *Salmonella*'nın virülans geni olan *hlyA* geninin ekspresyonunda da bir artış meydana gelmiştir (Dunkley ve arkadaşları, 2007c). Toplam kısa zincirli yağ asitleri, yemden yoksun bırakılan tavukların dışkı ve çekal içeriklerinde, yumurta tavuğu rasyonu veya %100 yonca kırıntıları ile beslenen gruplara göre daha düşük gerçekleşmiştir ve bu da, yonca ile beslenen tavuklar için fermentasyon modellerinin, yemi kesilen gruba nazaran tam beslenen tavuklara daha çok benzediğini göstermektedir (Dunkley ve arkadaşları, 2007d). Yonca kırıntısı ile beslenen tavuklar, yemi kesilen tavuklara göre daha az stres ve daha az iltihaplanma yaşayabilirler (Dunkley ve arkadaşları, 2007a,b; Landers ve arkadaşları, 2008a,b). Yonca kırıntısı ile beslenen tavuklar, yemi tamamen kesilen tavuklara göre besleyici olmayan gagalama davranışını, baş hareketlerini daha az ve beslenme aktivitesini ise daha fazla sergilemiştir (Dunkley ve arkadaşları, 2008a,b). McReynolds ve arkadaşları (2009) ayrıca, tüy dökme beslenme düzeninde yonca kullanımının, yemden kesilen tavuklara kıyasla tam beslenen tavuklara daha yakın bir bağlılık tepkisi ürettiğini de gösterdiler.

4.8.2. Prebiyotikler

Prebiyotikler, faydalı bakterilerin büyümesini uyaran ve böylece konakçının sağlığını iyileştiren sindirilemeyen gıda bileşenleridir (Gibson & Roberfroid, 1995). Kümes hayvanlarına verilen oligosakkaritler, S. Enteritidis kolonizasyonunu inhibe etme potansiyeli göstermiştir (Bailey, Blankenship, & Cox, 1991; Fernandez, Hinton, & Van Gils, 2002). *Salmonella* kolonizasyonu sınırlıdır, çünkü bağırsağın doğal florası fermentasyonda prebiyotik kullanır, uçucu yağ asitlerinin seviyelerini yükseltir, bu da pH'nın *Salmonella*'nın tutunamayacağı veya büyüemeyeceği seviyelere düşmesine yol açar (Cummings & Macfarlane, 2002; Flickinger, Van Loo, & Fahey, 2003). Yonca diyetine fruktooligosakkarit (FOS) eklenmesi, yumurtalık ve karaciğerin S. Enteritidis tarafından kolonizasyonunu azaltmış ve bazı çalışmalarda S. Enteritidis sekal sayılarında önemli azalma meydana gelmiştir (Donalson ve arkadaşları, 2008).

4.9. Aşılama

Bir diğer önemli *Salmonella* önleme aracı da aşılama. Şu anda iki tür *Salmonella* aşısı mevcuttur, canlı aşılar ve ölü aşılar. Canlı aşılar tüm sürüye su veya aerosol yoluyla verilebilir, ancak canlı bir organizma içerdiklerinden depolama ve uygulanabilirlik ile ilgili hususlar söz konusudur ve ayrıca, zayıflatılmış bir suşun daha öldürücü bir organizmaya dönüşme olasılığı da vardır. Ek olarak, ABD'de canlı S. Enteritidis aşılara izin verilmemektedir, S. Typhimurium aşıları kullanılmaktadır ve yetiştiriciler serotipler arasında çapraz korumaya bel bağlamaktadırlar (Hassan & Curtiss, 1997). Ölü aşılar, tavuklara bireysel olarak enjeksiyon yoluyla uygulanır ve güçlü bağlılık ve iyi koruma sağlar, ancak çok emek gerektirir. (Gast, Stone, Holt, & Beard, 1992). Birleşik Krallık, 1990'larda İngiliz Yumurta Endüstrisi Konseyi'ne ait yumurta tavuğu sürülerin aşılama zorunlu kılınmıştır ve bu, Birleşik Krallık'ta insan salmonellozunda görülen dikkat çeken düşüşün ana nedeni olarak kabul edilmektedir. (Cogan & Humphrey, 2003). 2006'da AB, %10 veya daha fazla *Salmonella* görülme sıklığı olan yumurta tavuğu sürülerinin aşılmasını zorunlu kılınmıştır. (Anonim, 2006).

Kafesli ve kafesiz sistemlerin karşılaştırılması

AB'de 2012'de yürürlüğe girecek olan geleneksel kafes sistemlerinin yasaklanması beklentisiyle, (Avrupa Birliği Konseyi, 1999) geleneksel kafes sistemleri ile tavukların S. Enteritidis tarafından enfeksiyonu arasındaki tüm bağlantıları keşfetmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir Alman araştırması, kümes sisteminden bağımsız olarak, yumurta tavuğu sürülerinin %32'sinin en az bir kez *Salmonella* için pozitif olduğunu keşfetmiştir. Yapılan ilave analizler, serbest dolaşimli organik çiftliklerde görülen %33 oranına kıyasla, serbest dolaşimli kapalı çiftlik sistemlerinde %22 oranında pozitiflik görüldüğünü ve dışarıya erişimi olmayan kapalı çiftlik sistemlerinde %23 oranına kıyasla, geleneksel kafes sistemlerinde sürülerinin %46'dan fazlasının pozitif olduğunu ortaya koymuştur (Methner, Diller, Reiche, & Boehland, 2006). Belçika'da yürütülen bir araştırma, S. Enteritidis enfeksiyonu için ana risk faktörlerinin, kapalı çiftliklere veya serbest dolaşimli sistemlere kıyasla sürüyü kafeslerde yetiştirmek olduğunu belirlemiştir. Sonuçlar ayrıca, yaş ve sürü büyüklüğü arttıkça *Salmonella* riskinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Namata ve arkadaşları, 2008).

4.10. Hasat sonrası müdahale yöntemleri

ABD'de, kabuklu yumurtaların sofralık yumurta olarak satılmadan önce yıkanması ve sterilize edilmesine yönelik özel gereksinimlerine dair hiçbir zorunlu düzenleme bulunmamaktadır, ancak Tarımsal Pazarlama Hizmeti, belirli yumurta yıkama ve sterilize etme gerekliliklerini içeren gönüllü bir kabuklu yumurta derecelendirme programına sahiptir. Genel olarak, yumurtalar, devridaim edilen su ve fırçalar kullanılarak bir yıkama döngüsünden geçen bir taşıma bandına yerleştirilir. Yumurta yüzeylerini temizlemek ve bakteri kontrolü için yüksek pH'ı korumak amacıyla yıkama suyu alkali deterjanlar eklenir, ancak organik madde devridaim edilen suda birikir ve deterjanın bakterileri öldürme kabiliyetini azaltır (Kinner & Moats, 1981). Deterjanla yıkamanın hemen ardından, derecelendirme programındaki işlemler, kabuklu yumurtaları 100 ila 200 ppm klor konsantrasyonuna sahip bir içme suyu durulamasıyla veya yıkama maddesiyle uyumlu dördümlü dezenfektanlarla sterilize edebilir. Devlet kurumları ve yumurta endüstrisi, daha etkili ve daha az maliyetli olabilecek alternatif dekontaminasyon teknikleriyle ilgilenmekte, böylece hem kamuya hem de sektöre fayda sağlamaktadır. Yıkama sonrası sanitasyon yöntemi olarak çok sayıda dezenfektan ve yöntem araştırılmıştır.

4.11. Dezenfektanlar

Kuo ve arkadaşları (1997b) Kabuklu yumurtaları sterilize etmek için peroksidad katalizli bir bileşiğin (PCC) kullanımını test ettiler. PCC bileşiğine daldırmanın S. Enteritidis'i sadece su için 1 log'dan daha azına kıyasla neredeyse 4 log azalttığını belirlediler, ancak PCC'nin sağladığı azalma 200 ppm klorndan çok da büyük değildi. Knap, Carey ve Ricke (2001) Damıtılmış deiyonize su, iyot bazlı bir deterjan ve klorun (200 ppm), kuru yumurta kontrollerine kıyasla yumurtalara aşılanan *Salmonella* popülasyonlarını azalttığını bulmuşlardır; ancak yumurta dezenfektanlarının etkinliği, yumurta yıkama suyundaki toplam çözünmüş katıların seviyesine bağlı gibi görünmektedir.

4.12. UV ışını

UV dalga boylarını kullanan radyasyon, yumurtanın kütükülünü sağlam bıraktığı için kabuklu yumurtaları sterilize etmenin bir yolu olarak araştırılmıştır. İlk araştırmalar UV ışınının kontakt lensler (Gritz, Lee, McDonnell, Shih, & Baron, 1990), kümes hayvanı karkasları (Wallner-Pendleton, Sumner, Froning, & Stetson, 1994), fiber veya plastik bantlar, metal veya yumurta kabukları (Gao, Stewart, Joseph, & Carr, 1997) gibi çeşitli yüzeylerdeki mikroorganizmaları öldürme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Kuo, Carey ve Ricke (1997a) UV ışınının kabuklu yumurtalara aşılanan aerobik bakteri, küf ve S. Typhimurium'u önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. Başlangıçta FDA (Federal Register, 1999) tarafından onaylanan atımlı UV ışığı olarak bilinen yeni bir teknoloji, gıda yüzeylerindeki patojenleri etkisiz hale getirme yeteneği açısından test edilmektedir. S. Enteritidis ile aşılanmış yumurtaların dekontaminasyonu için 1 ila 30 saniye

boyunca atımlı UV ışınının etkinliği değerlendirilmiştir; yumurtalar UV lambasından 9,5 ve 14,5 cm mesafeye yerleştirilmiştir. 9,5 cm'de 20 saniyelik bir işlem, yumurtada herhangi bir görsel hasar olmaksızın 5,3 CFU/cm²'lik bir log azalması sağlamıştır (Keklik, Demirci, Patterson, & Puri, 2010). Daha uzun maruz kalma süreleri, yumurta sıcaklığında bir artışa neden olmuştur.

4.13. Elektrolize su

Elektrolize oksitleyici (EO) su, zayıf bir tuzlu su çözeltisinden bir asidik ve bir alkali bileşen elde etmek için elektroliz ve zar ayırma bir araya getirilerek oluşturulur.

Çalışmalar, süspansiyon çözeltilerinde (Kim, Hung, & Brackett, 2000) ve gıdalarda (Bari, Sabina, Isobe, Uemura, & Isshiki, 2003; Russell, 2003) patojenlerin inaktivasyonu için EO suyunun etkinliğini göstermiştir. Bialka, Demirci, Knabel, Patterson ve Puri (2004) hem in vitro hem de pilot ölçekli bir yumurta yıkayıcı kullanarak, EO su artıma işlemini ticari bir deterjan dezenfektanı işlemiyle karşılaştırdılar. Ticari deterjan-dezenfektan işlemiyle elde edilen 2.0 CFU/g sonucu ile karşılaştırıldığında, EO ile işlemden geçirilmiş yumurtalar 2.3 CFU/g'lik bir S. Enteritidis log azalması sergilemiştir (Bialka ve arkadaşları, 2004). Her iki uygulama da albümin yüksekliğini veya yumurta kabuğu kuvvetini önemli ölçüde etkilememiştir, ancak her ikisinin de kütükül üzerinde önemli etkileri olmuştur.

4.14. Bütün yumurta pastörizasyonu

Kabuklu yumurtalarda S. Enteritidis'e ilişkin olarak yapılan risk değerlendirmesi, S. Enteritidis'in 3 log azalmasıyla sonuçlanan kabuklu yumurta pastörizasyonunun, bu organizmanın neden olduğu hastalıkları %70 oranında azaltacağını tahmin etmiştir (USDA/FSIS, 2005). Sağlam kabuklu yumurtalar ve S. Enteritidis üzerinde pastörizasyon ve kuru ısı işlemlerin etkilerini değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada, yumurtalar dahili olarak 5 suşlu S. Enteritidis kokteyli ile aşılanmış, daha sonra bir su banyosunda 57 °C'de 25 dakika, ardından sıcak fırında 55 °C'de 57 dakika işleme tabi tutulmuştur (Barbour, Jurdi, Issa, & Tannous, 2001). Bu işlem, yumurtaların genel işlevselliği üzerinde herhangi bir etki olmaksızın, S. Enteritidis'te 6 log azalma ile sonuçlanmıştır (Barbour et al., 2001). James, Lechevalier ve Ketteringham (2002) 100 °C'de 2 saniye boyunca buhara maruz bırakılan kabuklu yumurtaların, yumurta içeriğinin iç sıcaklığını arttırmadan kabuktaki bakteri sayılarında önemli azalmalar sağladığını ve bunun da yumurta protein işlevselliğinin azalmasına neden olabileceğini gösterdiler. Tek başına sıcak su, tek başına sıcak hava veya bunların bir kombinasyonu gibi diğer yöntemler bir miktar başarıya ulaşmıştır. (Jeng, Kaczmarek, Woodworth, & Balasky, 1987; Vanlith, Putrirulan, & Mulder, 1995).

4.15. İyonlaştırıcı radyasyon

2000 yılında FDA, taze yumurtalarda patojenlerin azaltılması için 3 kGy'ye kadar iyonlaştırıcı radyasyon uygulanmasını onaylamıştır (FDA, 2000). Ancak, Meszaros, Horti ve Farkas (2006) yumurtaları 0,5 ile 3,0 kGy aralığındaki dozlarda ışınladıklarında, yumurta akının akış davranışında, yumurta sarısının kırılabilirliğinde, yumurta akının çirpabilirlik ve köpük stabilitesinde ve de çiğ ve yumuşak haşlanmış yumurtalarda duyuşsal değişiklikler gözlenmiştir. Salmonella'nın radyasyonla inaktivasyonu için minimum 1.5 kGy doz gerekmektedir, bu da kabuklu yumurtaların kalitesini taze kabuklu yumurtalardan daha düşük hale getirmektedir fakat ışınlanmış yumurtalar, risk altındaki nüfuslar veya endüstriyel kullanım için hala kabul edilebilirdir.

5. Sonuçlar

Tavuk yumurtası, yumurta içeriğinde hem fiziksel engeller hem de birkaç mikrobisidal moleküle sahiptir. Doğal koşullar altında, yumurtanın içinde mikroorganizma bulmak nadir meydana gelir ve genellikle enfeksiyon o kadar çok hasara neden olur ki, yumurtanın enfekte olduğu barizdir. S. Enteritidis, gözle görülür değişikliklere neden olmadan yumurtanın içine göç etme ve çoğalma yeteneği bakımından benzersiz görünmektedir. S. Enteritidis, sıcaklık farkı,

nem, mevcut organizma sayısı ve saklama koşullarının yanı sıra bakteri türüne bağlı olarak yumurta kabuğuna nüfuz edebilir. Bazı araştırmacılar artık S. Enteritidis'in yumurtaya daha yaygın olarak vitellin zarı, yumurta akı veya kabuk zarları bünyesine dahil olarak üreme kanalı yoluyla girdiğine inanmaktadır. S. Enteritidis yumurtaya hangi yolla girerse girsin, orada nadiren ve çok az sayıda görünmektedir. Bununla birlikte, bu küçük sayılar göz ardı edilemez, çünkü buzdolabında depolama bile büyümeyi engellemez ve minimum sıcaklığın suistimali bile hızlı büyümeye yol açar. S. Enteritidis ile sürü kontaminasyonu için risk faktörleri arasında geleneksel kafes yetiştiriciliği, sürünün yaşı ve büyüklüğü yer almaktadır. Hasat sonrası müdahalelerin mevcut ve başarılı olmasına rağmen, sürü yönetimi uygulamaları, uygun yumurta depolama ve halkın uygun pişirme ve servis konusunda eğitilmesi konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür Bölümü

Bu incelemenin hazırlanması kısmen USDA Gıda Güvenliği Konsorsiyumu Hibesi ve USDA-NIFSI Hibesi #2008-51110-04339 tarafından desteklenmiştir.

Referanslar

- Anonymous (2006). *Reducing Salmonella: Commission sets EU targets for laying hens and adopts new control rules*. Accessed February 10, 2011. Available at: <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/06/1082&format=HTML&aged=1&language=EN&guiLanguage=en>.
- Arrington, L. R., Santa Cruz, R. A., Harms, R. H., & Wilson, H. R. (1967). Effects of excess dietary iodine upon pullets and laying hens. *The Journal of Nutrition*, 92, 325-330.
- Bailey, J. S., Blankenship, L. C., & Cox, N. A. (1991). Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*, 70, 2433-2438.
- Baker, R. C., & Bruce, C. (1994). Effects of processing on the microbiology of eggs. In R. G. Board, & R. Fuller (Eds.), *Microbiology of the avian egg*. London: Chapman and Hall.
- Ball, R. F., Logan, V., & Hill, J. F. (1975). Factors affecting the cuticle of the egg as measured by the intensity of staining. *Poultry Science*, 54, 1479-1484.
- Barbour, E. K., Jurdi, L. E., Issa, C., & Tannous, R. (2001). Preliminary attempts towards production of table eggs free from *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Cleaner Production*, 9, 69-73.
- Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., & Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 66, 542-548.
- Baron, F., Gautier, M., & Brule, G. (1997). Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg white. *Journal of Food Protection*, 60, 1318-1323.
- Bell, D. D. (2003). Historical and current molting practices in the U. S. table egg industry. *Poultry Science*, 82, 965-970.
- Benson, C. E., & Keller, L. H. (1999). Characterization of chicken ovarian infection with *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis. In A. M. Saeed (Ed.), *Salmonella enterica serotype Enteritidis in humans and animals*. Ames: Iowa State University Press.
- Berrang, M. E., Cox, N. A., Frank, J. F., & Buhr, R. J. (1999). Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 8, 499-504.
- Berry, W. D. (2003). The physiology of induced molting. *Poultry Science*, 82, 971-980.
- Bialka, K. L., Demirci, A., Knabel, S. J., Patterson, P. H., & Puri, V. M. (2004). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poultry Science*, 83, 2071-2078.
- Biehler, L. A., Nagaraja, K. V., & Halvorson, D. A. (1996). *Salmonella enteritidis* in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected White Leghorn chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 57, 489-495.
- Biggs, P. E., Persia, M. E., Koelkebeck, K. W., & Parsons, C. M. (2004). Further evaluation of nonfeed removal methods for molting programs. *Poultry Science*, 83, 745-752.
- Board, R. G. (1966). Review: The course of microbial infection of the hen's egg. *The Journal of Applied Bacteriology*, 29, 319-341.
- Braden, C. R. (2006). *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 512-517.
- Brake, J. (1993). Recent advances in induced molting. *Poultry Science*, 72, 929-931.
- Burley, R. W., & Vadehra, D. V. (1989). The vitelline membrane. *The avian egg: Chemistry and biology* (pp. 147-169). New York: John Wiley and Sons.
- Carrique-Mas, J. J., Breslin, M., Snow, L., McLaren, I., Sayers, A. R., & Davies, R. H. (2009). Persistence and clearance of infectious *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137, 837-846.
- CDC (2010a). *PHLIS surveillance data*. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm#1995> Accessed 17 January 2011
- CDC (2010b). *Investigation update: multistate outbreak of human Salmonella Enteritidis infections associated with shell eggs*. Available at: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/> Accessed 18 January 2011
- Coburn, B., Grassi, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85, 112-118.

- Cogan, T. A., & Humphrey, T. J. (2003). The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 114S–119S (Suppl.).
- Council of the European Union (1999). *Council directive 1999/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens*. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:203:0053:0057:EN:PDF>.
- Crippen, T. L., Sheffield, C. L., Esquivel, S. V., Droleskey, R. E., & Esquivel, J. F. (2009). The acquisition and internalization of *Salmonella* by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9, 65–72.
- Cuguennec, T., Nau, F., Molle, D., Le Graet, Y., & Brule, G. (2000). Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. *Food Chemistry*, 68, 29–35.
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *The British Journal of Nutrition*, 88(Suppl. 2), S145–S151.
- Davies, R., & Breslin, M. (2004). Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathology*, 33, 133–144.
- Davis, A. J., Lordelo, M. M., & Dale, N. (2002). Use of cottonseed meals in molting programs. *Journal of Applied Poultry Research*, 11, 175–178.
- Dawoud, T. M., Hererra, P., Hanning, I., Kwon, Y. M., & Rieke, S. C. (2011). *In vitro* invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. *Poultry Science*, 90, 1134–1137.
- Debruyne, I., & Stockx, J. (1978). Nucleoside triphosphatase from the hen's egg white and vitelline membrane. *Enzyme*, 23, 361–372.
- De Buck, J., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2004). Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poultry Science*, 83, 352–358.
- De Reu, K., Grijspeerd, K., Messens, W., Heyndrickx, A., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Herman, L. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 253–260.
- Donalson, L. M., McReynolds, J. L., Kim, W. K., Chalova, V. I., Woodward, C. L., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2008). The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection, and intestinal shedding in laying hens. *Poultry Science*, 87, 1253–1262.
- Dunkley, C. S., Friend, T. H., McReynolds, J. L., Kim, W. K., Dunkley, K. D., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2008a). Behavior of laying hens on alfalfa crumble molt diets. *Poultry Science*, 87, 815–822.
- Dunkley, C. S., Friend, T. H., McReynolds, J. L., Woodward, C. L., Kim, W. K., Dunkley, K. D., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2008b). Behavioral responses of laying hens to different alfalfa-layer ration combinations fed during molting. *Poultry Science*, 87, 1005–1011.
- Dunkley, C. S., McReynolds, J. L., Dunkley, K. D., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2007a). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. III. Blood plasma metabolite response. *Poultry Science*, 86, 2492–2501.
- Dunkley, C. S., McReynolds, J. L., Dunkley, K. D., Njongmeta, L. N., Berghman, L. R., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2007b). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. IV. Immune and stress protein response. *Poultry Science*, 86, 2502–2508.
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*, 15(Sp. Iss. S1), 26–35.
- Dunkley, K. D., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Callaway, T. R., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2007c). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. I. *Salmonella* Enteritidis colonization and virulence gene h1A response. *Poultry Science*, 86, 1633–1639.
- Dunkley, K. D., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Callaway, T. R., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2007d). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. II. Fermentation and microbial ecology response. *Poultry Science*, 86, 2101–2109.
- Durant, J. A., Corrier, D. E., Byrd, J. A., Stanker, L. H., & Rieke, S. C. (1999). Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enteritidis* colonization and invasion of leghorn hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1919–1923.
- Ebel, E., & Schlosser, W. (2000). Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 51–62.
- EFSA (2009). Community summary report, food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 2009(271), 1–128. doi:10.2903/j.efsa.2009.271r.
- EFSA (2010). Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *The EFSA Journal*, 8, 1546. doi:10.2903/j.efsa.2010.1546.
- Etches, R. J. (1990). The ovulatory cycle of the hen. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2, 293–318.
- Etches, R. J., Croze, F., & Duke, C. E. (1981). Plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, testosterone and estradiol in follicular and peripheral venous plasma during the ovulation cycle of the hen. *Advances in Physiological Science*, 33, 89–98.
- Etches, R. J., MacGregor, H. E., Morris, T. R., & Williams, J. B. (1983). Follicular growth and maturation in the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproductive Fertility*, 67, 351.
- Evans, T. (2009). Good news on global egg consumption. Available at <http://www.thepoultrysite.com/articles/1575/good-news-on-global-egg-consumption>. Accessed 18 January 2011.
- FDA (2000). Irradiation in the production, processing and handling of food. *Federal Register*, 65(141), 45280.
- Register, Federal (1999). Pulsed light treatment of food. *Federal Register*, 66, 338829–338830.
- Fernandez, F., Hinton, M., & Van Gils, B. (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathology*, 31, 49–58.
- Flickinger, E. A., Van Loo, J., & Fahey, G. C. (2003). Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 19–60.
- Fromm, D. (1963). Permeability of the hen's egg shell. *Poultry Science*, 42, 1271.
- Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2008). A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology*, 37, 399–406.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 718–738.
- Garibaldi, J. A. (1960). Factors in egg white which control growth of bacteria. *Food Research*, 25, 337–344.
- Gao, F., Stewart, L. E., Joseph, S. W., & Carr, L. E. (1997). Effectiveness of ultraviolet light irradiation in reducing the numbers of *Salmonella* on eggs and egg belt conveyor materials. *Applied Engineering for Agriculture*, 13, 355–359.
- Gast, R. K., & Beard, C. W. (1990). Production of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Diseases*, 34, 438–446.
- Gast, R. K., Guraya, R., Guard-Bouldin, J., Holt, P. S., & Moore, R. W. (2007). Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases*, 51, 40–44.
- Gast, R. K., & Holt, P. S. (2000). Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science*, 79, 559–563.
- Gast, R. K., & Holt, P. S. (2001). Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poultry Science*, 80, 997–1002.
- Gast, R. K., Stone, H. D., Holt, P. S., & Beard, C. W. (1992). Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases*, 36, 992–999.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota – Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- Gritz, D. C., Lee, T. Y., McDonnell, P. J., Shih, K., & Baron, N. (1990). Ultraviolet radiation for the sterilization of contact lenses. *Contact Lens Association of Ophthalmologists Journal*, 16, 294–298.
- Haines, R. B. (1939). *Microbiology in the preservation of hen's eggs*. Food investigation special reports. London: Bd. 47. H.M.S.O.
- Hammond, R. W., Burke, W. H., & Hertelendy, F. (1981). Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotrophins. *Biology of Reproduction*, 24, 1048–1055.
- Hassan, J. O., & Curtiss, R., III (1997). Efficacy of a live avirulent *Salmonella* Typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases*, 41, 783–791.
- Henzler, D. J., & Opitz, H. M. (1992). The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Diseases*, 36, 625–631.
- Holt, P. S. (1993). Effect of induced molting on the susceptibility of White Leghorn hens to a *Salmonella* Enteritidis infection. *Avian Diseases*, 37, 412–417.
- Holt, P. S. (1995). Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted and unmolted laying chickens. *Avian Diseases*, 39, 239–249.
- Holt, P. S., Davies, R. H., Dewulf, J., Gast, R. K., Huwe, J. K., Jones, D. R., Waltman, D., & Willian, K. R. (2011). The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poultry Science*, 90, 251–262.
- Holt, P. S., Macri, N. P., & Porter, R. E., Jr. (1995). Microbiological analysis of the early *Salmonella* Enteritidis infection in molted and unmolted hens. *Avian Diseases*, 39, 55–63.
- Holt, P. S., & Porter, R. E., Jr. (1992). Microbiological and histopathological effects of an induced-molt fasting procedure on a *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Diseases*, 36, 610–618.
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Kim, W. K., Birkhold, S. G., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2006). *In vitro* survival and growth of *Salmonella* Typhimurium inoculated on yolk membrane after long term refrigerated storage of shell eggs. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1, 30–34.
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Kim, W. K., Birkhold, S. G., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Rieke, S. C. (2007). Inoculation of a poultry isolate *Salmonella* Enteritidis on egg vitelline membrane: Survival and growth in egg components after different refrigeration storage times. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 2, 123–129.
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Landers, K. L., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., Birkhold, S. G., & Rieke, S. C. (2005). Ovarian laying hen follicular maturation and *in vitro* *Salmonella* internalization. *Veterinary Microbiology*, 108, 95–100.
- Humphrey, T. J. (1999). Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Salmonella enterica serotype Enteritidis in humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control*. Saeed A.M (pp. 183–191). Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Hussein, A. S., Cantor, A. H., & Johnson, T. H. (1989). Comparison of the use of dietary aluminum with the use of feed restriction for force-molting laying hens. *Poultry Science*, 68, 891–896.
- Imai, K., & Nalbandov, A. V. (1971). Changes in FSH activity of anterior pituitary glands and of blood plasma during the laying cycle of the hen. *Endocrinology*, 88, 1465.
- James, C., Lechevalier, V., & Ketteringham, L. (2002). Surface pasteurization of shell eggs. *Journal of Food Engineering*, 53, 193–197.

- Jeng, D. K. H., Kaczmarek, K. A., Woodworth, A. G., & Balasky, G. (1987). Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*, 2133–2137.
- Johnson, A. L. (2000). Reproduction in the female. In G. C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology* (5th edition): Academic Press.
- Jones, D. R., Anderson, K. E., Curtis, P. A., & Jones, F. T. (2002). Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*, *81*, 715–720.
- Jones, F. T., Rives, D. V., & Carey, J. B. (1995). *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. *Poultry Science*, *74*, 753–757.
- Keklik, N. M., Demirci, A., Patterson, P. H., & Puri, V. M. (2010). Pulsed UV light inactivation of *Salmonella* Enteritidis on eggshells and its effects on egg quality. *Journal of Food Protection*, *73*, 1408–1415.
- Keller, L. H., Benson, C. E., Krotec, K., & Eckroade, R. J. (1995). *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*, *63*, 2443–2449.
- Keshavarz, K., & Quimby, F. W. (2002). An investigation of different molting techniques with an emphasis on animal welfare. *Journal of Applied Poultry Research*, *11*, 54–67.
- Kim, C., Hung, Y. C., & Brackett, R. E. (2000). Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, *61*, 199–207.
- Kinner, J. A., & Moats, W. A. (1981). Effect of temperature, pH, and detergent on survival of bacteria associated with shell eggs. *Poultry Science*, *60*, 761–767.
- Knape, K. D., Carey, J. B., & Ricke, S. C. (2001). Response of foodborne *Salmonella* spp. marker strains inoculated on egg shell surfaces to disinfectants in a commercial egg washer. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, *36*, 219–227.
- Koch, T. (1973). *Anatomy of the chicken and domestic birds*. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Kuo, F. L., Carey, J. B., & Ricke, S. C. (1997a). UV irradiation of shell eggs: Effect on populations of aerobes, molds, and inoculated *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Protection*, *60*, 639–643.
- Kuo, F. L., Kwon, Y. M., Carey, J. B., Hargis, B. M., Krieg, D. P., & Ricke, S. C. (1997b). Reduction of *Salmonella* contamination on chicken egg shells by a peroxidase-catalyzed sanitizer. *Journal of Food Science*, *62*, 873–874.
- Landers, K. L., Moore, R. W., Dunkley, C. S., Herrera, P., Kim, W. K., Landers, D. A., Howard, Z. R., McReynolds, J. L., Bryd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008a). Immunological cell and serum metabolite response of 60-week-old commercial laying hens to an alfalfa meal molt diet. *Bioresource Technology*, *99*, 604–608.
- Landers, K. L., Moore, R. W., Herrera, P., Landers, D. A., Howard, Z. R., McReynolds, J. L., Bry, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008b). Organ weight and serum triglyceride responses of older (80 week) commercial laying hens fed an alfalfa meal molt diet. *Bioresource Technology*, *99*, 6692–6696.
- Landers, K. L., Woodward, C. L., Li, X., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2005). Alfalfa as a single dietary source for molt induction in laying hens. *Bioresource Technology*, *96*, 565–570.
- Lister, S. A. (1988). *Salmonella* Enteritidis infection in broilers and broiler breeders. *The Veterinary Record*, *123*, 350.
- Lock, J. L., & Board, R. G. (1992). Persistence of contamination of hens' egg albumen *in vitro* with *Salmonella* serotypes. *Epidemiology and Infection*, *108*, 389–396.
- Lucore, L. A., Jones, F. T., Anderson, K. E., & Curtis, P. A. (1997). Internal and external bacterial counts from shells of eggs washed in a commercial-type processor at various wash-water temperatures. *Journal of Food Protection*, *60*, 1324–1328.
- Mann, K. (2008). Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics*, *8*, 2322–2332.
- Martin, G. A., Morris, T. B., Gehle, M. H., & Harwood, D. G. (1973). Force molting by limiting calcium intake. *Poultry Science*, *52*, 2058 (Abstr.).
- Mayes, J. F., & Takeballi, M. A. (1983). Microbial contamination of the hen's egg: A review. *Journal of Food Protection*, *46*, 1092–1098.
- McCormick, C. C., & Cunningham, D. L. (1987). Performance and physiological profiles of high dietary zinc and fasting as methods of inducing a forced rest: A direct comparison. *Poultry Science*, *66*, 1007–1013.
- McReynolds, J. L., Genovese, K. J., He, H., Swagerty, C. L., Byrd, J. A., Ricke, S. C., Nisbet, D. J., & Kogut, M. H. (2009). Alfalfa as a nutritive modulator in maintaining the innate immune response during the molting process. *Journal of Applied Poultry Research*, *18*, 410–417.
- McReynolds, J. L., Moore, R. W., Kubena, L. F., Byrd, J. A., Woodward, C. L., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2006). Effect of various combinations of alfalfa and standard layer diet on susceptibility of laying hens to *Salmonella* Enteritidis during forced molt. *Poultry Science*, *85*, 1123–1128.
- Messens, W., Grijspeerd, K., De Reu, K., De Ketelaere, B., Mertens, K., Bamelis, F., Kemps, B., De Baerdemaeker, J., Decuyper, E., & Herman, L. (2007). Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Journal of Food Protection*, *70*, 623–628.
- Messens, W., Grijspeerd, K., & Herman, L. (2005). Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science*, *46*, 694–700.
- Messens, W., Grijspeerd, K., & Herman, L. (2006). Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science*, *47*, 554–560.
- Messens, W., Grijspeerd, K., Herman, L., & Billet, L. (2002). A survey on institutional users of shell eggs and egg products in Flanders. *Journal of Food Safety*, *22*, 273–290.
- Meszaros, L., Horti, K., & Farkas, J. (2006). Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments – I. Gamma irradiation of shell eggs. *Acta Alimentaria*, *35*, 229–236.
- Methner, U., Diller, R., Reiche, R., & Boehland, K. (2006). Occurrence of salmonellae in laying hens in different housing systems and conclusion for the control. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, *119*, 467–473.
- Mine, Y. (2000). Avidin. In C. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 253–261). Boca Raton, FL: CRS Press.
- Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T., & Arakawa, A. (1997). *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. *Avian Diseases*, *41*, 296–303.
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., & Arakawa, A. (1998). *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, *61*, 350–353.
- Mizumoto, N., Sasai, K., Tani, H., & Baba, E. (2005). Specific adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis in the vagina of laying hens. *Veterinary Microbiology*, *111*, 99–105.
- Moore, R. W., Park, S. Y., Kubena, L. F., Byrd, J. A., McReynolds, J. L., Burnham, M. R., Hume, M. E., Birkhold, S. G., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2004). Comparison of zinc acetate and propionate addition on gastrointestinal tract fermentation and susceptibility of laying hens to *Salmonella* Enteritidis during forced molt. *Poultry Science*, *83*, 1276–1286.
- Moran, T., & Hale, M. P. (1936). Physics of the hen's egg. *The Journal of Experimental Biology*, *13*, 35–40.
- Mrosovsky, N., & Sherry, D. F. (1980). Animal anorexias. *Science*, *207*, 837–842.
- Murase, T., Senju, K., Maeda, T., Tanaka, M., Sakae, H., Matsumoto, Y., Kaneda, Y., Ito, T., & Otsuki, K. (2001). Monitoring of chicken houses and an attached egg-processing facility in a laying farm for *Salmonella* contamination between 1994 and 1998. *Journal of Food Protection*, *64*, 1912–1916.
- Naber, E. C., Latschaw, J. D., & Marsh, G. A. (1984). Effectiveness of low sodium diets for recycling of egg production type hens. *Poultry Science*, *63*, 2419–2429.
- Namata, H., Meroc, E., Aerts, M., Faes, C., Abrahantes, J. C., Imberechts, H., & Mintiens, K. (2008). *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, *83*, 323–336.
- Nascimento, V. P., Cranstoun, S., & Solomon, S. E. (1992). Relationship between shell structure and movement of *Salmonella* Enteritidis across the eggshell wall. *British Poultry Science*, *33*, 37–48.
- NASS (2009). *Chickens and eggs*. Available at: http://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide-to-NASS-Surveys/Chickens_and_Eggs/index.asp Accessed 18 January 2011
- North, M. O. (1978). *Commercial chicken production manual*. Westport, Connecticut: AVI publishing Co. Inc..
- North, M. O., & Bell, D. D. (1990). *Commercial chicken production manual* (4th ed.). New York: Chapman Hall.
- Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., & Baba, E. (2001a). Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*, *45*, 61–69.
- Okamura, M., Miyamoto, T., Kamijima, Y., Tani, H., Sasai, K., & Baba, E. (2001b). Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and *in vitro* adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars. *Avian Diseases*, *45*, 962–971.
- Okubo, T., Akachi, S., & Hatta, H. (1997). Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, H. Hatta, & M. Kim (Eds.), *Hen eggs, their basic and applied science* (pp. 1–12). New York: CRC Press, Inc..
- O'Leary, J., & Busta, F. F. (1974). Effect of food components on growth of *Bacillus stercorophilus*. *Journal of Food Science*, *39*, 1157–1160.
- Olsen, A. R., & Hammack, T. S. (2000). Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aeneascens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. *Journal of Food Protection*, *63*, 958–960.
- Padron, M. (1990). *Salmonella* Typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases*, *34*, 463–465.
- Park, S. Y., Birkhold, S. G., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2004). Effects of high zinc diets using zinc propionate on molt induction, organs, and postmolt egg production and quality in laying hens. *Poultry Science*, *83*, 24–33.
- Patrick, M. E., Adcock, P. M., Gomez, T. M., Altekruze, S. F., Holland, B. H., & Tauxe, R. V. (2004). *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985–1999. *Emerging Infectious Diseases*, *10*, 1–7.
- Ricke, S. C. (2003). The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. *Poultry Science*, *82*, 1003–1007.
- Ricke, S. C., Birkhold, S. G., & Gast, R. K. (2001). Eggs and egg products. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 473–482). Washington, D.D.: American Public Health Association.
- Ricke, S. C., Dunkley, C. S., McReynolds, J. L., Dunkley, K. D., & Nisbet, D. J. (2010). Molting in laying hens and *Salmonella* infection. In P. J. van der Aar, & J. Doppenberg (Eds.), *Dynamics in animal nutrition* (pp. 135–146). Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Roberts, J. R., & Brackpool, C. E. (1994). The ultrastructure of the avian egg shells. *Poultry Science Reviews*, *5*, 245–272.
- Robinson, F. E., & Etches, R. J. (1986). Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction*, *35*, 1096–1105.
- Robinson, F. E., Etches, R. J., Anderson-Langmuir, W. H., Burke, K. W., Cheng, F. J., Cunningham, F. J., Ishii, S., Sharp, P. J., & Talbot, R. T. (1988). Steroidogenic relationships of gonadotrophin hormones in the ovary of the hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, *69*, 455–466.
- Russell, S. M. (2003). The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poultry Science*, *82*, 158–162.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffen, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*, 7–15.

- Schoeni, J. L., Glass, K. A., McDermott, J. L., & Wong, A. C. L. (1995). Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *International Journal of Food Microbiology*, *24*, 385-396.
- Seo, K. H., Holt, P. S., & Gast, R. K. (2001). Comparison of *Salmonella* Enteritidis infection in hens molted via long-term feed withdrawal versus full-fed wheat middling. *Journal of Food Protection*, *64*, 1917-1921.
- Shimmura, T., Eguchi, Y., Uetake, K., & Tanaka, T. (2008). Comparison of behavior, physical condition and performance of laying hens in four molting methods. *Animal Science Journal*, *79*, 129-138.
- Simkiss, K. (1968). The structure and formation of the shell and shell membranes. In T. C. Carter (Ed.), *Egg quality: A study of the hen's egg* (pp. 3-25). Edinburg: Oliver and Boyd.
- Taylor, L. W., & Martin, J. H. (1929). Factors influencing thickness of egg shell. *Poultry Science*, *8*, 39-44.
- Thiagarajan, D., Saeed, A. M., & Asem, E. K. (1994). Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. *Poultry Science*, *73*, 89-98.
- Thiagarajan, D., Saeed, M., Turek, J., & Asem, E. (1996). *In vitro* attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella* Enteritidis phage type 8. *Infection and Immunity*, *64*, 5015-5021.
- USDA (2009). *2007 census report*. Available at: http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2007/Full_Report/index.asp Accessed 18 January 2011
- USDA/AMS (2004). *Minimum facility and operating requirements for shell egg grading and packing plants*, 7 C.F.R. 56.76. Available at: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004690> Accessed 20 January 2011.
- USDA/FSIS (2005). *Risk assessment for Salmonella Enteritidis in shell eggs and Salmonella spp. in egg products, October 2005*. Available at: Washington, DC: USDA-FSIS http://www.fsis.usda.gov/Science/Risk_Assessments/index.asp#eggs Accessed 01 March 2011.
- USDA/NASS (2010). *Chickens and eggs 2009 summary, February 2010*. Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/ChickEgg/ChickEgg-02-25-2010.pdf> Accessed February 11, 2011
- Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Barco, L., Ricci, A., Theodoropoulos, G., Xylouri, E., De Vylder, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., de Kruif, A., & Dewulf, J. (2010). Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Preventive Veterinary Medicine*, *94*, 94-100.
- Vanlith, L. A. J. T., Putrirulan, F. F., & Mulder, R. W. A. W. (1995). Pasteurization of table eggs to eliminate salmonellae. *Archiv Gefuegelkunde*, *59*, 147-160.
- Vermaut, S., De Coninck, K., Onagbesan, O., Flo, G., Cokelaere, M., & Decuyper, E. (1998). A jobba-rich diet as a new forced molting method in poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, *7*, 239-246.
- Walden, C. C., Allen, I. V. F., & Trussell, P. C. (1956). The role of egg shell membranes in resisting the entry of microorganisms. *Poultry Science*, *35*, 1190-1196.
- Wallner-Pendleton, E. A., Sumner, S. S., Froning, G. W., & Stetson, L. E. (1994). The use of ultraviolet-radiation to reduce *Salmonella* and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. *Poultry Science*, *73*, 1327-1333.
- Webster, A. B. (2003). Physiology and behavior of the hen during induced molt. *Poultry Science*, *82*, 992-1002.
- Williams, J. B., & Sharp, P. J. (1978). Ovarian morphology and rates of ovarian follicular development in laying broiler breeders and commercial egg-producing hens. *Poultry Science*, *63*, 786.
- Wilson, S. C., & Sharp, P. J. (1973). Variations in plasma luteinizing hormone levels during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproductive Fertility*, *35*, 561-564.
- Woodward, C. L., Kwon, Y. M., Kubena, L. F., Byrd, J. A., Moore, R. W., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2005). Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and invasion by an alfalfa diet during molt in leghorn hens. *Poultry Science*, *84*, 185-193.

Kabuklu Yumurtalarda *Salmonella* Kontaminasyonunun Kontrolü—Hasat Öncesi ve Hasat Sonrası Yöntemler: Bir Derleme

Anca M. Galis, Christopher Marcq, Didier Marlier, Daniel Portetelle, Ilie Van, Yves Beckers ve Andr e Th ewis

 zet: *Salmonella* Enteritidis, en yaygın gıda kaynaklı patojenlerden biridir ve ana rezervuarı kabuklu yumurta olarak kabul edilmektedir. Artan insan salmonelloz vakalarıyla ilgili endişeler arttıkça, bu özel gıda ürününün tüketime bağlı gıda kaynaklı salgınların daha iyi kontrol edilmesi için ya çiftlik düzeyinde ya da işleme adımları sırasında önleyici yöntemlerin uygulanması ihtiya ı hayati önem taşımaktadır. Bu derleme, yumurta tavuklarının bu patojenle enfeksiyonunun daha iyi kontrol edilmesi yoluyla *Salmonella* ile özellikle de *S. Enteritidis* ile kabuklu yumurta kontaminasyonu riskini azaltmak için hasat öncesi aşamada çiftlik düzeyinde önleyici yöntemlerin uygulanmasına odaklanmaktadır. Hasat sonrası yöntemler olarak 1. yaklaşım, yumurta saklama koşulları ve *Salmonella* spp.'nin büyümesinin ve çoğalmasının önlenmesidir. Ek olarak, gıda kaynaklı salgın riskini azaltmak için kabuklu yumurtalar, yumurta kabuğu dekontaminasyonuna tabi tutulabilir. Bu son bahsedilen yöntemlerin bir  oğununun, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da olduğu gibi, farklı ülkelerde de uygulamaya konulmasına izin verilmiştir. Bu yöntemlerin etkinlikleri kanıtlanmıştır ve tüketiciler için kabuklu yumurta güvenliğini sağlamak amacıyla bazı ülkeler tarafından kullanımları zorunlu olarak kabul edilmiştir.

Giriş

Salmonella, Gram negatif çubuk şeklinde spor oluşturmayan bakterilerden oluşan Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesidir. Ana rezervuarı, insan ve hayvanların bağırsaklarıdır (Bhunia 2007).

Salmonella enterica'nın farklı serotipleri arasında olan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*, hem geli mi  hem de gelişmekte olan ülkelerde çoğu non-tifoidal *Salmonella* enfeksiyonlarının sorumlusudur (CDC 2010, 2012; EFSA 2010; Majowicz ve diğerleri 2010; Scallan ve diğerleri 2011; Wales ve Davies 2011; EFSA 2012). Bu serotipler kısıtsız olarak kabul edilir, hayvanlarda olduğu kadar insanlarda da enfeksiyonlara neden olabilir (Martelli ve Davies 2012). Yumurta ve yumurta bazlı  r nler, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ve ayrıca Avrupa Birliği'nde (AB) *S. Enteritidis*'in neden olduğu salmonelloz salgınlarıyla

sıklıkla ili kilendirilmi tir (Braden 2006; EFSA 2012). Bu, *S. Enteritidis*'in yumurta tavuklarının yumurtalıklarını kolonize ettiği yüksek frekansın potansiyel bir sonucudur (Gantois ve diğerleri 2008). Genellikle bu, herhangi bir lezyon olmadan gerçekleşir ve ayrıca, yumurta saklama koşulları mümkün kaldığı için kabuklu yumurtadan izole edilebilir (Gast ve diğerleri 2007; Gantois ve diğerleri 2009; Raspoet ve diğerleri 2011; Howard ve diğerleri 2012). Bu serotipin bulaşması dikey olarak (Gast ve Beard 1990; Gala'n 2001; Groisman 2001; Gast ve diğerleri 2002; Gast ve diğerleri 2004; Gyles ve diğerleri 2004; Gast ve diğerleri 2007; Ibarra ve Steele-Mortimer 2009; Li ve diğerleri 2009; Mastroeni ve diğerleri 2009; Dahoud ve diğerleri 2011; De Vylde ve diğerleri 2011; Desin ve diğerleri 2011; Linke ve Goldman 2011; Shah ve diğerleri 2011; Howard ve diğerleri 2012; Kumar 2012) veya yatay olarak gerçekleşebilir (Holt 1995; Holt ve diğerleri 1998; Jones ve diğerleri 2002; Davies ve Breslin 2003b; De Reu ve diğerleri 2006; Musgrove ve diğerleri 2012).

S. Enteritidis ile karşılaştırıldığında, kabuklu yumurta tüketime bağlı olarak insanda salmonelloz nedeni olarak *S. Typhimurium*'a daha az rastlanmaktadır. Bununla birlikte, yumurtlayan tavukların üreme yollarını kolonize etme ve oluşan yumurtaları kontamine etme yeteneği de belirlenmiştir (Okamura ve diğerleri 2005; Wales ve diğerleri 2007; Gantois ve diğerleri 2008; Okamura ve diğerleri 2010; Wales ve Davies 2011 Martelli ve Davies 2012).

S. Infantis, *S. Virchow*, *S. Heidelberg* gibi diğer *S. enterica* serotiplerinin kabuklu yumurtaları kontamine ettiği çok nadiren görülmektedir (CDC 2010).

MS 20121075 Sunu  8/6/2012, Kabul 11/30/2012. Yazarlar Galis ve Van, B kre  Tarm Bilimleri ve Veterinerlik Üniversitesi Hayvan Bilimleri B l m ndeler, Bd. M r  sti, no 59, sector 1, B kre , 011464, Romanya. Yazarlar Marcq, Beckers ve Th ewis Lieğe Üniversitesi, Gembloux Agro-Bio Tech, Hayvan Bilimleri B l m ndeler. Passage des D port s, 2, B-5030, Gembloux, Belėika. Yazar Marlier Lieğe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Bilimler Bölümü, Ku lar, Tan anlar ve Kemirgenler Kliniğindedir; Boulevard de Colonster 20, B42, Sart-Tilman, B4000, Lieğe, Belėika. Yazar Portetelle Lieğe Üniversitesi, Gembloux Agro-Bio Tech, Hayvan ve Mikrobiyal Biyoloji Birimindedir; Passage des D port s, 2, B-5030, Gembloux, Belėika. Yazar Galis'e doğrudan soru sormak için (E-posta: ancagalis@gmail.com).

Kabuklu yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonu riskini ve bunların tüketimlerinden kaynaklanan salmonelloz salgınlarını azaltmada başvurulacak önleyici yöntemler, hasat öncesi veya hasat sonrası prosedürler olarak uygulanabilir. Ayrıca, serotipe özgü veya serotipten bağımsız olabilirler, ikincisi daha karmaşık bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Gast 2007). Yumurta tavuklarının kümes ortamı, çiftliğe geldiğinde halihazırda kontamine olabilen yemle birlikte (Davies ve Hinton 2000; Shiota ve diğerleri 2000; Maciorowski ve diğerleri 2006; Gast 2007; Davies ve Wales 2010), *Salmonella* için bir rezervuar görevi görebilir (Henzler ve Optiz 1992; Davies ve Wray 1995, 1996; Eriksson de Rezende ve diğerleri 2001; Davies ve Breslin 2003b; Davis ve Morishita 2005; Holt ve diğerleri 2007; Umali ve diğerleri 2012). Yumurta tavukları için bu çeşitli enfeksiyon kaynakları nedeniyle, çiftlik düzeyinde önleyici yöntemler halihazırda uygulanmaktadır veya mevcuttur: sürü testi, sanitasyon ve biyogüvenlik (Gast ve Beard 1990; Davison ve diğerleri 1996; Hogue ve diğerleri 1997; Davies ve Breslin 2001; Gast 2007; Arnold ve diğerleri 2010; Gast ve Guard 2011; Holt ve diğerleri 2011); aşılama (Nakamura ve diğerleri 1994; Liu ve diğerleri 2001; Goldsby ve diğerleri 2003; Khan ve diğerleri 2003; De Buck ve diğerleri 2004a; Van Immerseel ve diğerleri 2005b, 2005c; Gantois ve diğerleri 2006; Toyota-Hanatani ve diğerleri 2009; Omwandho ve Kubota 2010); pasif immünizasyon (Gürtler ve diğerleri 2004; Chalghoumi ve diğerleri 2008, 2009a, 2009b); bakteriyofajlar (Joerger 2003; Toro ve diğerleri 2005; Borie ve diğerleri 2009; Monk ve diğerleri 2010; Waseh ve diğerleri 2010), protein ve lif kaynakları (Sugita-Konishi ve diğerleri 2002; Kassaify ve Mine 2004a, 2004b, 2005), rekabetçi dışlanım florası, probiyotikler, prebiyotikler ve organik asitler (Schneitz ve Mead 2000; Seo ve diğerleri 2000; Tellez ve diğerleri 2001; Van Immerseel ve diğerleri 2002; Schneitz 2005; Van Immerseel ve diğerleri 2005a; Doyle ve Erickson 2006; Lima ve diğerleri 2007; Sterzo ve diğerleri 2007; Van Coillie ve diğerleri 2007; Van Immerseel ve diğerleri 2007; Dondan ve diğerleri 2008b; Vandeplass ve diğerleri 2010; Tellez ve diğerleri 2012), uçucu yağlar (Chao ve diğerleri 2000; Lee ve diğerleri 2004; Johnny ve diğerleri 2008; O'Bryan ve diğerleri 2008; Brenes ve Roura 2010; Ouwehand ve diğerleri 2010) ve bakteriyosinler (Cleveland ve diğerleri 2001; Gordon ve diğerleri 2007; Heng ve diğerleri 2007; Dias Paiva ve diğerleri 2011) gibi doğal antimikrobiyal ürünlerin kullanımı. Kabuklu yumurtalarda hasat sonrası *Salmonella* kontrolü için 1. yaklaşım, depolama esnasında yeterli sıcaklığın korunmasıdır (Gast ve Holt 2000, 2001; Gast ve diğerleri 2006; Lublin ve Sela 2008; FDA 2009a, 2009b; Gantois ve diğerleri 2009). Bununla birlikte, ABD'de halihazırda farklı yüzey dekontaminasyon yöntemleri uygulanmaktadır ve yenileri sürekli araştırma konusu olmaktadır: yumurta yıkama (Hutchison ve diğerleri 2003; Jones ve diğerleri 2005; Caudill ve diğerleri 2010); elektrolize su (Huang ve diğerleri 2008; Howard ve diğerleri 2012; Mukhopadhyay ve Ramaswamy 2012); ozon (Davies ve Breslin 2003a; Rodriguez-Romo ve diğerleri 2007; Perry ve diğerleri 2008); ultrason (Cabeza ve diğerleri 2011); mikrodalgalar (Lakins ve diğerleri 2008); ışınlama (Serrano ve diğerleri 1997; Wong ve Kitts 2003; Cabo Verde ve diğerleri 2004); gaz plazması (Kayes ve diğerleri 2007; Ragni ve diğerleri 2010); ultraviyole ışık (Rodriguez-Romo ve Yousef 2005) ve atımlı ışık (Hierro ve diğerleri 2009). Bunların arasında ABD'de uygulanmasına izin verilenler kabuk yıkama ve ışınlamadır (USDA 2005; FDA 2009b).

Bu makalenin amacı, kabuklu yumurtaların *Salmonella* kontaminasyonunu ve ayrıca bu gıda ürününün neden olduğu insanda salmonelloz salgınları riskini azaltmak için hasat sonrası ve hasat öncesi yöntemlerin çoğunu gözden geçirmektir.

Kabuklu Yumurtaların *Salmonella* Kontaminasyonu Riskini Azaltmak İçin Hasat Öncesi Yöntemler

Kanatlılarda *Salmonella* taşıyıcılığı ve salmonelloza karşı direncin genetik kontrolü

Yumurta tavuklarında *Salmonella* 'ya karşı kullanılan farklı önleyici yöntemler arasında, yumurta tavuklarında salmonelloz oluşumunun azaltılmasına yönelik olarak genetik seleksiyon yöntemi umut vadeden bir yöntem olabilir. Dahası, yumurta tavuklarının genetik dizilimlerinin *Salmonella* spp.'ye karşı farklı direnç seviyeleri sergiledikleri ortaya konmuştur (Gantois ve diğerleri 2009).

Farklı dokulardaki *Salmonella* spp. kontaminasyon seviyesi arasında genetik bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Yumurta tavuklarında direnç özelliğinin kalıtsallığı ile ilgili bir araştırmada, Girard-Santosuosso ve diğerleri (2002), karaciğer ve genital organlardaki *S. Enteritidis* konsantrasyonu (log₁₀ CFU/g) arasındaki genetik korelasyonun (r) yüksek (0,56) olduğunu ortaya koymuşlardır. 0.79'luk bir korelasyonla dalak ve genital organlardaki *S. Enteritidis* konsantrasyonu için benzer bir sonuç bulunmuştur. Yazarlar, bu organların kontaminasyonunu kontrol eden genlerin aynı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Beaumont ve diğerleri (2009a) yetişkin yumurta tavuklarında küresel kontaminasyon ile yumurtalık kontaminasyonu arasındaki genetik korelasyonun 0.32 olduğunu, küresel kontaminasyon ve diğer organlar arasındaki korelasyonun ise yüksek olduğunu hesaplamışlardır: karaciğer için 0.75 ve %100 pozitif olma olasılığı ile dalak ve çekum için 0.85.

Genetik olarak düzenlenmiş direncin değerlendirilmesi, *Salmonella* spp. enfeksiyonuna karşı direncin genetik kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır. Bu konuyu araştıran çalışmaların tümü, yumurta tavuklarında hastalık oluşumunu ve ekonomik kayıpları azaltmanın yanı sıra özellikle *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'a odaklanarak iç organlarda *Salmonella* spp. kolonizasyonunu ve ürünlerinin kontaminasyonunu kontrol etmeyi amaçlamıştır (Wigley 2004). Sadeyen ve diğerleri (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı direnç özellikleri ile bilinen 2 aynı soydan yetiştirilmiş yumurta tavuğu dizisi, *S. Enteritidis* ile oral yoldan aşılanmıştır. Çekumda ve bağırsakla ilişkili lenfoid dokuda bakteriyel kolonizasyonu ve konakçı gen ekspresyonu ölçülmüştür. Kemokin, antienfeksiyöz sitokin, bakteriyel reseptör, antimikrobiyal mediatör ve özellikle defensin genlerinin ekspresyonu, çekumda daha düşük seviyede bakteri taşıyan tavuklarda artmıştır. Bu doğuştan gelen bağışıklık molekülleri, dirençli yetişkin tavuklarda yapısal veya endüktif olarak yüksek düzeyde eksprese edilmiştir; bu nedenle bu moleküller bir konağın *Salmonella* kolonizasyonuna karşı korunmasında rol oynayabilecek aday genler olarak kabul edilmiştir. Daha önceki bir çalışmada, Sadeyen ve diğerleri (2004) duyarlı dizilerin dirençli dizilerden daha düşük bir başlangıç IFN- γ seviyesi ifade ettiğini ortaya çıkarmıştır. *Salmonella* spp.'nin sindirim sisteminde kalıcılığının bir immün yetmezlik durumundan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.

Fu ve diğerleri (2009), enfeksiyonun sistemik evresini göz önünde bulundurarak, direncin kısmen genetik suşlar tarafından belirlendiğini ve dirençli dizilerde mikrobiyal yükün duyarlı dizilere kıyasla 1000 kata kadar daha düşük değerlere ulaşabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla, bu hastalığa karşı dirence katkıda bulunan genlerin tespit edilmesi, dirençli dizilerin genetik seçimini artırabilir. Ayrıca, Pre'vost ve diğerleri (2008), deneysel koşullarda, *Salmonella* spp. taşımaya yönelik daha düşük veya daha yüksek eğilim için farklı seçilmiş diziler arasındaki melezlemenin, kontamine hayvanların maksimum yüzdesinin yarısı kadar bir azalma ile sonuçlandığını ortaya koymuştur. Yine de, hastalığın yok oluşunu hızlandıramadılar.

Yukarıda belirtildiği gibi, direnç seviyesi bir diziden diğerine farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, belirli bir dizinin içerisinde yaşı, direncin genetik kontrolünü etkilediği gösterilmiştir. Bu, doğrudan direnç mekanizmalarıyla bağlantılı olabilir, tavuklar yalnızca doğuştan gelen bağışıklık tepkisi tarafından korunurken yetişkin tavuklar da adaptif bağışıklık sisteminden yararlanabilir. (Beaumont ve diğerleri 2009b). Tavuk antikor repertuarı, geç embriyonik

aşamada ve yumurtadan çıktıktan kısa bir süre sonra oluşturulmaktadır. Cıvcıv yaşlandıkça, B hücreleri ek somatik gen dönüşümü turlarına tabi tutulur ve antikor repertuarı 5 ila 7 hafta civarında olgun bir duruma ulaşır. Bu, kesenin tamamen olgunlaştığı yaşa karşılık gelmektedir (Davidson ve diğerleri 2008).

Kanatlı hayvanlarda sistemik salmonelloza direnç, birçoğu genetik olan bir dizi faktör tarafından kodlanmaktadır. *Slc11a1* geni, ilk olarak farelerde tespit edilmiştir (Roy ve Malo 2002). Fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri, yabancı mikroorganizmaların fagozomlarda hücre içi replikasyonunu kontrol etmedeki rolünü desteklemektedir. *Slc11a1* alellerinin hem erken hem de geç dirençte yer aldığı gösterilmiştir. *Slc11a1* lokusunun etkisi ayrıca, farklı tavuk dizilerindeki taşıyıcı-durum direnci varyasyonları ile ilişkilendirilmiştir. (Wigley 2004; Calenge ve diğerleri 2010). Toll benzeri reseptör 4 olarak adlandırılan dirençle ilgili başka bir faktör de, Gram-negatif bakterilerden lipopolisakkaritlerin (LPS) saptanmasında rol oynayan doğuştan gelen bağışıklık sistemi reseptörleri ailesine aittir. (Calenge ve diğerleri 2010; Chaussé ve diğerleri 2011). Yakın zamanda yapılan haritalama, hatlar arasındaki duyarlılık farklılıklarının büyük bir kısmını oluşturan tavuk kromozomu 5 üzerinde yeni bir lokus ortaya çıkarmıştır (Fife ve diğerleri 2009). Bu yeni gen, *Salmonella* spp.'ye karşı makrofaj aktivitesinin artmasında rol oynuyor gibi görüldüğü için SAL1 olarak adlandırılmıştır. Dirençli ve duyarlı çizgiler arasındaki enfeksiyon patolojisindeki farklılıklar, direncin anahtarının mononükleer/fagositik hücre fonksiyonunda yattığını göstermektedir. *SAL1* lokusu, dirençli ve duyarlı dizilerin geri çaprazlanması ile kombinasyon halinde yüksek yoğunluklu tek nükleotid polimorfizmi (SNP) panelleri ile değerlendirilmiş ve rafine edildikten sonra, 2 çarpıcı fonksiyonel aday da dahil olmak üzere bu bölgenin 14 geni kapsadığı gösterilmiştir: CD-27 bağlayıcı protein (Siva-1) ve RAC-alfa serin/treonin protein kinaz homologu AKT1. Siva-1, indüklenmiş hücre ölümü sürecini aktive etme ve bağışıklık tepkisini aşağı yönlü regüle etme yeteneğine sahip olan apoptozu indükleyen bir faktördür. AKT-1, IκB kinazın regülasyonu yoluyla NF-κB'yi aktive eder ve *Salmonella*'nın neden olduğu apoptoza doğrudan dahil olan prosurvival genlerin transkripsiyonuna yol açar (Fife ve diğerleri 2009).

Seleksiyonun yanı sıra, genetik mühendisliği de geleneksel hayvan melezlemeye alternatif bir strateji olarak araştırılmıştır. Amaç, bir hayvanın patojene karşı uygun bir bağışıklık tepkisi geliştirme yeteneğinin artırılmasıdır. Bununla birlikte, bir popülasyonda direnç için arzu edilen alel mevcut olduğunda bile, birçok ilişkiz ve bilinmeyen özelliğin eşzamanlı olarak eklenmesi nedeniyle, bu aleli belirli bir genotipe dahil etmek zor olabilir. Genetiği değiştirilmiş hayvanlar, *Salmonella* spp.'ye direnç özelliği sergilediklerinde, üreme stoğuna dahil edilebilirler. Bununla birlikte, bunların besin zincirine girişleri hala tartışmalıdır (Whitelaw ve Sang 2005).

Günümüze kadar, yumurta tavuklarının *Salmonella* spp.'ye karşı direnci ile ilgili tüm tespit edilmiş genler ve lokuslar, bu spesifik özellik için seleksiyon olasılığı hakkında daha fazla araştırma için potansiyel konuları temsil etmektedir. Yumurta tavuklarının *Salmonella* spp taşıyıcı durumuna karşı genetik direncinin geliştirilmesi, *Salmonella* spp yayılmasını azaltmak için tamamlayıcı bir yol olabilir, böylece, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* gibi yüksek riskli *Salmonella* serotipleri ile kontaminasyon oranını düşürmede başarılı olabilecek diğer önleyici yöntemlerin olasılığını arttırmaktadır.

Yumurta tavuklarında *Salmonella* 'ya karşı direncin iyileştirilmesini odağına alan genetik çalışmaların sonucunu kullanma olasılığını hesabı katmadan önce, araştırılan farklı

genlerin ve direnç faktörlerinin rollerini doğrulamak gerekmektedir.

Beaumont ve diğerleri (2010), aday genlere göre bir yaklaşım seçerken bile, niceliksel özellik lokus bölgesi ile kodlanan karakter arasında gözlenen ilişkinin, başka bir genin dahil olma olasılığını hariç tutmaya imkan vermediğini ileri sürmektedir. En detaylı çalışma SAL1'i araştıran çalışmadır; bu, nicel özellik lokuslarının mevcudiyet bölgesini sadece 14 gen içeren bir bölgeye indirgemeye olanak sağlamaktadır (Fife ve diğerleri 2009). Devam edilirse, sarf edilen çabalar SNP yöntemleri alanında daha büyük bir ölçekte belirgin bir gelişmeye yol açacak ve farklı hızlı uygulamalarda ilerleme kaydedilmesine olanak sağlayacaktır.

Sürü yönetimi

Kontamine kabuklu yumurtaların veya bu tür kontamine kabuklu yumurtalardan elde edilen yumurta ürünlerinin tüketilmesi yoluyla Özellikle *S. Enteritidis*'in neden olduğu yüksek insan salmonellozis insidansı, yakın zamanda çok sayıda *Salmonella* programlarının geliştirilmesi ve uygulanması açısından belirleyici olmuştur. Bunlar, kümes çevresinde *Salmonella* mevcudiyeti riskini azaltmada çok etkili olduğu düşünülen çeşitli prosedürlerin (temizlik ve dezenfeksiyon, zararlıların kontrolü dahil) yanı sıra bir dizi test ve izleme yöntemini içermektedir.

Gast (2007), kabuklu yumurtaların *Salmonella* ile kontaminasyon riskini azaltmak için daha serotipten bağımsız bir yaklaşımın, ortaya çıkan sorunları, etkileri daha şiddetli hale gelmeden önce tespit etme ve bunlara tepki verme avantajına sahip olduğunu düşünmektedir. Aynı yazar, kanatlı sürülerinde hasat öncesi *Salmonella* kontrol programlarıyla ilgili olarak, tek bir tepki türünün (serotipe özgü veya serotipten bağımsız olan) bu gıda kaynaklı patojenle ilgili karmaşık halk sağlığı ve ekonomik sorunlara tek taraflı bir çözüm sağlayamayacağı sonucuna varmıştır.

Bir dizi çevresel faktör, kümes hayvanlarında *Salmonella* enfeksiyonlarının olasılığını ve sonucunu etkileyebilir. Bu faktörler şunlardır: çöp, toz, fareler, sinekler ve tavuk kümeslerinde veya çiftlikte yumurtlayan tavukların temas edebileceği farklı yüzeyler. Davies ve Breslin (2003b), 26 aylık popülasyon azalması periyodu esnasında, serbest dolaşım bir üreme çiftliğinin ortamından periyodik olarak numune olarak *S. Enteritidis* Faj Tip 4'ün (PT4) toprakta, gübrede, kuluçka kutularında, yem oluklarında ve fare pisliklerinde devamlı olarak var olduğunu göstermişlerdir.

Gübredeki *Salmonella* seviyelerinin, su aktivitesi seviyeleri ve nem içeriğinin artmasıyla, çoğunlukla kazara su sızıntısı nedeniyle arttığı bildirilmiştir (Eriksson de Rezende ve diğerleri 2001). Bunun için, gübre yüzeyi üzerinde makul ve eşit olarak dağıtılmış bir havalandırma oranı (100 ila 150 ft/dak) aracılığıyla gübre kurutma ortamının devamlılığının sağlanması gibi önleyici yöntemler uygulanmaktadır. Turnbull ve Snoeyenbos (1973) gübrenin mevcut neminde çözünen amonyakın neden olduğu yüksek gübre pH değerinin *Salmonella* büyümesi için elverişsiz olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Bennett ve diğerleri (2003) gübreye hidratlı kireç ilavesinin, %20 kireç ilavesiyle pH'ın 12.57'ye kadar artması nedeniyle, nispeten kısa bir sürede (< 24 saat) *Salmonella* Enteritidis'in sağ kalmasını önemli ölçüde azaltabildiğini gözlemlemişlerdir.

Toz, kümeslerde *Salmonella* 'nın uzun süre kalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Davies ve Wray (1996) *S. Enteritidis*'in çoğu zaman kümes temizliği ve dezenfeksiyonundan sonra bırakılan küçük fan tozu ceplerinde hayatta kaldığını gözlemlemiştir. Bu sonuç, 2 yıllık bir süre boyunca kanatlı ünitelerinde *S. Enteritidis*'in hayatta kalması üzerine yapılan bir çalışmadan elde edilmiştir. Ayrıca, *S. Enteritidis*'in, yapay olarak kontamine kanatlı yemlerinde

zeminden ve yemliklerden süpürülen toz partikülleri ilişkili olduğunda *S. Enteritidis*'in en az 26 ay hayatta kalarak tercihli olarak direnç gösterdiği görülmektedir. Davis ve Morishita (2005), *Salmonella* spp'nin yumurta tavuğu kümesinin içinde ve ayrıca kümes dışında 40 ft mesafeye (yaklaşık 13 m) kadar hava yoluyla bulaşan bir patojen olarak izole edilebileceğini bulmuşlardır. Toz, muhtemelen hava yoluyla bulaşma yoluyla, enfekte tavuklardan sağlıklı olanlara yayılan *S. Enteritidis* için bir vektör görevi görebilir. Gast ve diğerleri (1998), kontrollü çevre hastalık bulaşma kabinlerinde barındırılan civiv grupları arasında *S. Enteritidis*'in yayılma mekanizmasını incelemişlerdir. Hava akışı bir gruptan ("yukarı akış") diğerine ("aşağı akış") yönlendirilmiştir. 25 adet 1 günlük civivden oluşan gruplar, yukarı akış uçlarına yerleştirilmiş ve oral olarak *S. Enteritidis* ile aşılanmıştır. Aşılamadan sonraki 3. ve 7. günlerde, aşağı akıştaki civivlerin %77'sinin tüylerinde *S. Enteritidis* bulunmuştur ve bunların %33'ü çoktan *S. Enteritidis* ile enfekte olmuştur. Yazarlar, enfeksiyonun, muhtemelen patojenin havadaki hareketiyle kontamine olmuş çevresel yüzeylerden, ağızdan alım yoluyla bulaştığını ileri sürmüşlerdir. Bu, *S. Enteritidis*'in havadaki hareketinin azaltılmasının, sürüler içinde enfeksiyonun yayılmasını sınırlayacağı ve ayrıca potansiyel olarak kontamine yumurtaların insidansını azaltacağı sonucuna yol açmıştır.

Salmonella spp'nin geniş konukçu yelpazesi nedeniyle, farklı biyolojik vektörler ortaya çıkabilir ve patojenin yayılması yoluyla kümes hayvanlarında enfeksiyon riski oluşturabilir. Fareler biyolojik vektörler arasında ana rezervuar olarak kabul edilmektedir, Henzler ve Opitz (1992), bir farenin dışkıdaki bakteri sayımının 2.3×10^5 *S. Enteritidis* bakteri/dışkı peleti üretebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, bu serotip, enfekte olmuş bir fare popülasyonunda 10 aya kadar devam edebilir. Kümes hayvanları ünitelerinde kalıcı *S. Enteritidis* enfeksiyonu, genellikle yüksek bir oranla bu patojeni taşıdığı tespit edilen farelerin bir sonucudur. Davies ve Wray (1995), *S. Enteritidis*'in farelerde sistemik bir enfeksiyona yol açtığını göstermişlerdir. Çiftlik düzeyinde, 3 haftalık tavuklar, 5 ay önce deneysel olarak enfekte edilmiş farelerin dışkılarıyla doğrudan temas yoluyla *S. Enteritidis* ile enfekte olmuştur. Ek olarak, yapay veya doğal olarak enfekte edilen yabancı fareler, *S. Enteritidis*'i aralıklı olarak 10^4 CFU/bireysel dışkılama ile dışkılama yapmıştır.

Fareler gibi sıçanlar, kümes hayvanı enfeksiyonları açısından yüksek risk taşıyan bir *Salmonella* rezervuarı olarak kabul edilmektedir. Umali ve diğerleri (2012), günlük gözlemler ve örnekleme yoluyla, doğal olarak enfekte olmuş yabancı sıçanlarda *Salmonella* 'nın bulaşma ve yayılma modellerini incelemiştir. *S. Enteritidis*, dışkıdan alınan pozitif kültür sayısına kıyasla, çalışmanın sonunda dalak ve karaciğerden daha sık izole edilmiştir. Ayrıca yazarlar, daha olası bir enterik enfeksiyon tipi ortaya koyan başka bir serotip olan *S. Infantis*'i izole etmişlerdir. Bunun nedeni, organlarda bulunmazken dışkıdan izole edilmesinin çok daha yüksek bir sıklıkta meydana gelmesiydi.

Böcekler de *Salmonella* vektörü olarak düşünülebilir; en sık rastlanan muskoit sineklerden biri de karasinek olarak da adlandırılan *Musca domestica*'dır. Mian ve diğerleri (2002) *Salmonella* Enteritidis varlığı için testlere tabi tutulan ticari çiftliklerde misk benzeri sinekler arasında 5 türe rastlandığını ve bunlar arasında, *S. Enteritidis* için pozitif olduğu tespit edilen tek türün karasinek olduğunu bulmuşlardır. Dahası, Holt ve diğerleri (2007), *S. Enteritidis* içeren bir ortama maruz kalan sineklerin mikroorganizma ile kolonize olabileceğini ve bir sürü durumunda *S. Enteritidis*'in bulaşması için bir kaynak olarak hizmet edebileceğini göstermişlerdir. Kafesli yumurta tesislerinde toplanan sinekler, kontamine kabuklu yumurtalar nedeniyle 2 *S. Enteritidis* enfeksiyonu salgısına dahil olmuştur. Mevcut sinekler arasında karasinekler *S. Heidelberg* ve *S. Enteritidis* taşıyıcılarıydı (ikinci

serotip için birleştirilmiş 15 numuneden 2'si) ve çöp sinekleri (*Hydrotaea aenescens*) *S. Infantis*'in taşıyıcılarıydı (Olsen ve Hammack 2000).

Sürü yönetimi ile ilgili olarak Holt ve diğerleri (2011), tesislerde *Salmonella* 'nın yaygınlığını etkileyebilecek faktörlerden birinin sürü büyüklüğü olduğunu belirtmektedir. Geleneksel kafeslerdeki yumurta tavuklarının yüksek stok yoğunluğu ile büyük hacimli dışkı ve toz arasındaki potansiyel bağlantı, bu özel kümes sisteminde *Salmonella* enfeksiyonlarının görülme sıklığında artışa yol açabilir. (Davies ve Breslin 2004). Ek olarak, yüksek stoklama yoğunlukları, neden olduğu stres nedeniyle *Salmonella* enfeksiyonları ile dolaylı olarak etkileşime girebilir (Van Hoorebeke ve diğerleri 2011).

Yem yönetimi uygulamaları ve kümes hayvanı yemlerinin gıda kaynaklı *Salmonella* spp. kontaminasyonu

Tüy dökümü amacıyla yem kesme. Yumurta verimini arttırmaya ve tavuk ölümlerini azaltmaya yönelik yaygın bir uygulama olan yem kesmeyle başlatılan tüy dökümü (Alodan ve Mashaly 1999), *Salmonella* spp'nin dikey bulaşma riskini arttırdığı gösterilmiştir (Holt 1999; Golden ve diğerleri 2008). Berry (2003), başlatılan tüy dökme esnasında, strese bağlı olarak, spesifik lenfosit sınıflarının sayısında geçici azalmaların meydana geldiğini ve bunun enfeksiyona karşı duyarlılığın artmasına neden olabileceğini belirtmektedir. Aynı yazar, başlatılmış tüy dökümü esnasında ve sonrasında ölüm oranının azalmasını, bu uygulamanın kanatlı patojenlerine ilişkin olarak bağışıklık fonksiyonunu bozduğunu, ancak bunun sadece sınırlı bir dereceye kadar söz konusu olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca tüy dökümü dönemlerinde *S. Enteritidis*, enfekte olanlardan enfekte olmamış yumurta tavuklarına bulaşabilir (Holt 1995; Holt ve diğerleri 1998).

Durant ve diğerleri (1999) yemin kesilmesi yoluyla tüy dökme yöntemi olarak uygulanan *S. Enteritidis* (10^6 organizma) ile yapılan sınaama esnasında, mahsullerdeki laktobasil sayıları ve laktat, asetat, propiyonat ve bitirat konsantrasyonlarının yanı sıra mahsullerdeki toplam uçucu yağ asitlerinin (VFA) azaldığını, mahsul pH'ının arttığını ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, tüy döken tavuklarda kontrollere kıyasla *S. Enteritidis*'in mahsul ve çekum kolonizasyonu önemli ölçüde artmıştır. Bu, mahsul ortamındaki yemin kesilmesinden kaynaklanan değişikliklerin *S. Enteritidis*'in hayatta kalmasının regülasyonu açısından önemli olduğunu göstermektedir.

Bu nedenle, yapılan araştırma tüy dökmeyle yönelik yeni yöntemler ve yemin kesilmesini önleyecek, ancak aynı zamanda ekonomik faydaları da koruyacak yeni prosedürler geliştirmeyi amaçlamaktadır (Maciorowski ve diğerleri 2006). Tüy dökme amaçlarına yönelik olarak, Woodward ve diğerleri (2005) alternatif olarak yoncanın kullanılabilirliğini ve deneysel olarak sınanmış yumurta tavuklarında *S. Enteritidis* kolonizasyonunun azalmasına neden olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca yumurta tavuklarının tüy dökümü sırasında çekumlarında *Salmonella* spp popülasyonunu azaltmak için, Willis ve diğerleri (2008), yonca ve Shiitake mantarı olarak da bilinen *Lentinus edodes* ekstraktının bir kombinasyonunu değerlendirmiştir (Leatham 1982). Sonuçlar, ilk *Salmonella* spp sayılarından $2.72 \log$ CFU/g'a kadar yüksek bir düşüş göstermiştir ve bu kombinasyonun, tüy dökümü dönemlerinde yem kesmeye bir alternatif olarak başarılı bir şekilde kullanılabilirliğini ileri sürmektedir.

Yumurta tavuklarının kaba buğday kepeği ile beslenmesi, yumurta üretiminin 3 ila 7 gün içinde durmasına neden olmuştur. Tüy dökme, yemden kesme ile tüy döken grup ile kaba buğday kepeği ile beslenen grup arasındaki *S. Enteritidis* düzeyi karşılaştırılması, yemden kesilen grupta 3 ila 5 log daha fazla *S. Enteritidis* farkıyla sonuçlanmıştır (Seove diğerleri 2001).

Tüy dökümünü tetiklerken bütün pamuk tohumu küspesi (diyetin %50'si) de kullanılabilir, tavuklar gönüllü olarak yem alımlarını azaltır. Bu tür tüy dökümünün, etkililik açısından yemin tamamen kesilmesiyle elde edilene eşdeğer olduğuna ve *S. Enteritidis* kontaminasyonu riskini artırarak yumurta güvenliği üzerinde aynı sonuçlara sahip olduğuna inanılmaktadır (Davis ve diğerleri 2002). Üzüm posasının 10, 14 veya 18 gün süreyle serbestçe kullanılmasıyla tüy dökümünün başlatılması, 10 günlük yem kesme işlemine maruz kalan tavuklarınkiyle karşılaştırılabilir bir tüy dökme sonrası performans ile sonuçlanmıştır.

Keshavarz ve Quimby (2002), tiroksin eklenmiş üzüm posasının ve sürekli yem kesme uygulanan yumurta tavuklarının tüy dökümünün başlamasından 3 ila 4 gün sonra üretimden çıktığını gözlemlemiştir. Dahası, 70 ila 98 haftalık veya 66 ila 98 haftalık tavukların yumurta kütlesi ve yem dönüşümünün yanı sıra yumurta üretimi, yem kesme ve üzüm posası artı tiroksin uygulamaları için benzer sonuçlar vermiştir.

Kümes hayvanı yemlerinde gıda kaynaklı *Salmonella* spp kontaminasyonu. Kümes hayvanı hayvan yemi hasat, yem fabrikasında işleme veya depolama sırasında gıda kaynaklı *Salmonella* ile kontamine olabilir (Maciorowski ve diğerleri 2006). Kümes hayvanı yemleri, hayvansal proteinlerden ve diğer bileşenlerden ve hatta yem fabrikalarında bulunan tozdan bile *Salmonella* ile kontamine olabilir (Gast 2007).

ABD'de ve ayrıca birkaç Avrupa ülkesinde yapılan araştırmalarda, tam hayvan yeminde (bitmiş yem) *Salmonella* kontaminasyonu oranlarının %1,1 ila %41,7 arasında değiştiği rapor edildiği için, tam hayvan yeminde *Salmonella* kontaminasyonu yaygın olarak görünmektedir (Li ve diğerleri 2012).

Japonya'da, Shirota ve diğerleri (2000), analize tabi tutulan 4418 yem numunesinin 143'ünden 148 *Salmonella* spp izole etmiştir. İzole edilen suşlar, 20 *S. Enteritidis* suşu dahil olmak üzere 32 serotipten oluşuyordu ve bunlar esas olarak yem fabrikalarından toplanan numunelerden kaynaklanmaktaydı. Davies ve Wales (2010) 4 ticari yem fabrikasını ve 4 çiftlikte kümes hayvanı yemi karıştırıcısını *Salmonella* spp. varlığı açısından incelediler. Çiftliklerdeki ham yem bileşenlerinde bulunan serotiplerin (bunlar arasında hiçbiri *S. Enteritidis* ile ilgili değildir) yaban hayatı ve/veya çiftlik hayvanları ile ilişkili olduğunu, ticari değirmen bileşenlerinde bulunanların ise evde üretilen tahıllar ve ithal bitkisel protein kaynakları ile ilişkili olduğunu ortaya çıkardılar. Özellikle tahıllardaki içerik kontaminasyonu, mahsullerin içinde veya depolama tesislerinde dışarı çıkan porsuk ve kemirgenler gibi yaban hayatına atfedilebilir (Davies ve Hinton 2000).

Farklı protein kaynakları ve tahılların *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu tespit edilmiştir: fıstık küspesi, ayçiçeği küspesi, soya küspesi, kepek küspesi, arpa, mısır, sorgum ve buğday (Maciorowski ve diğerleri 2006). *Salmonella* spp varlığı bakımından en yüksek sayıda pozitif numune veren Ayçiçeğidir (MacKenzie ve Bains 1976).

Hayvan yemi için protein küspeleri elde etmeye yönelik hayvansal protein ve yan ürünler, her zaman *Salmonella* spp'nin ana kaynağı olarak kabul edilmiştir, bunun bir nedeni, işleme sırasında bu bileşenlerin eksik dekontaminasyonudur (Davies ve diğerleri 2004).

Bu hayvansal protein kaynakları arasında, et yemleri (Mackenzie ve Bains 1975; Hacking ve diğerleri 1978; Nabbut 1978) ve kuş tüyü yemleri (Hacking ve diğerleri 1978) *Salmonella* kaynakları olarak hâlihazırda tespit edilmiştir. Ayrıca, kemik unu ve balık unu da görünüşe göre *Salmonella* ile kontaminasyon kaynaklarıdır (Nabbut 1978). Hollanda yem endüstrisi üzerinde yürütülen bir çalışmada, yumurta tavukları için kullanılan püre yemlerinin peletlenmiş olanlardan daha sık kontamine olduğu görülmüştür ve bu da, gıda kaynaklı patojenlerin uygun bir şekilde azaltılması bakımından peletleme sırasında artan sıcaklığın rolünü ortaya koymaktadır.

Doğaları dikkate alındığında, 83 et ve kemik unu numunesinden %4'ü ile karşılaştırıldığında, 130 balık unu numunesinden %31'i kontamine olmuştur. Bu nedenle balık unları, diğer hayvansal protein kaynaklarına göre *Salmonella* spp ile daha sık kontamine olma eğilimine sahip olabilir (Veldman ve diğerleri 1995).

Yem işleme sırasında, bileşenlerin maruz kaldığı farklı işlemler (öğütme, karıştırma ve peletleme) nedeniyle, işleme bittiğinde yeniden kontaminasyonun yanı sıra *Salmonella* spp kontaminasyonu meydana gelebilir.

Whyte ve diğerlerine (2003) göre *Salmonella*, kümes hayvanı yem fabrikalarının ön ısıtma işleminde olduğu kadar son ısıtma işleminde de mevcut olabilir. Patojeni, sırasıyla %18.8 ve %22.6'lık toplam yüzdelerle yem ve toz numunelerinden elde edilir. Bir ön ısıtma alanından toplanan yem numunelerinin %11,8'i *Salmonella* varlığı ile ilişkilendirilirken, aynı alandan alınan toz numunelerinin %33,3'ü de *Salmonella* pozitif. Son ısıtma alanlarından alınan toz örneklerinin %24,2'si *Salmonella* pozitif. Ek olarak, yem dağıtım alanı *Salmonella* 'nın yeniden kontaminasyon alanı olarak kabul edilmiş, bu nedenle bu sahadan da numuneler toplanmıştır. Buradan alınan numunelerin %57,1'inin *Salmonella* pozitif olduğu ortaya çıkmıştır.

Birincil yem üretimi düzeyinde, farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen bileşenler, gübrelere doğrudan temastan sonra *Salmonella* ile kontamine olabilir. Yem maddelerinin mikrobiyolojik risk değerlendirmesine ilişkin EFSA raporunda belirtildiği gibi, bu, farklı önlemlerle azaltılabilir: gübrenin herhangi bir yeni giriş olmadan 2 aydan fazla depolanması; kompostlama; gübreyi yaydıktan sonra sürme; gübrenin yayılması ile hayvan otlama veya mahsul hasadı arasında izin verilen sürenin arttırılması, gübrelere kullanımdan önce ısıtma işlem görmesi ve gübrelere kireç ilavesi ile işlenmesi. Bileşenlerin nakliye ve depolama koşullarının yüksek önem taşıdığı ve kötü hijyen ve iyi uygulamalara uyulmaması nedeniyle riskin arttığı kabul edilmektedir (EFSA 2008).

Salmonella kontrol ilkeleri kontaminasyonun tesise girmesini önlemeyi, bitki içinde çoğalmasını azaltmayı ve patojeni öldürmeyi içermektedir. *Salmonella* yem kontaminasyonu için uygulanacak önleyici tedbirler arasında en önemlileri *Salmonella* içermeyen yem katkı maddelerinin elde edilmesi (Jones 2006), tozun kontrol altına alınması (Whyte ve diğerleri 2003; Jones ve Richardson 2004), personel akışının kısıtlanması (EFSA 2008), yağ birikiminin azaltılması, kemirgenlerin ve yabani kuşların kontrol edilmesi ve ulaşım araçlarının temizliğinin sağlanmasıdır (Fedorka-Cray ve diğerleri 1997).

Maciorowski ve diğerleri (2007), yemdeki *Salmonella* kontaminasyonunu kontrol altına almak için farklı yöntemler önermiştir. Yemin bozulmasına yönelik olarak diğer önleme yöntemleri uygulanmadan önce, yemin kararmasını ve topaklanmasını önlemek için depolama süresinin kısaltılması ve yağ kaybını önlemek için soya fasulyesi yağı ilavesi en önemli önlemdir. Ek olarak, ham yem bileşenlerini korumak için hızlı kurutma yaygın olarak kullanılmaktadır (ICMSF 2005). Farklı antimikrobiyal ajanların eklenmesi göz önüne alındığında, asitler (mineral asitler, kısa zincirli yağ asitleri), izopropil alkol, aldehitler ve trisodyum fosfat gibi dezenfektanlar, yemin depolanması sırasında bu patojeni etkisiz hale getirerek *Salmonella* ile kontaminasyon riskini azaltabilir (Maciorowski ve diğerleri 2007). Bununla birlikte, aynı yazarlar, yemdeki yüksek organik madde konsantrasyonu nedeniyle bu katkı maddelerinin etkinliğinin azaltılabileceği sonucuna varmıştır. Ayrıca, birçoğu aşındırıcı olarak hareket edebilir ve/veya yüksek konsantrasyonlarda verildiğinde zehirleyici olabilir. Bu nedenle işlenmiş yemlerde kullanımları sınırlı olmalıdır.

Yemlerde *Salmonella*'nın etkisiz hale getirilmesi, peletlemeyi (ısıl işlem içerir) ve/veya kimyasal ilaveyi içerebilir. Peletleme işlemi 3 ana adımdan oluşur: buharın püre yemle karıştırılması (ayrıca tavlama olarak da adlandırılır), tavlama yem metal kalıplar aracılığıyla preslenmesi (peletleme) ve büyük hacimli hava yoluyla ısı ve nemin uzaklaştırılması (soğutma). Tavlama sırasında, yaklaşık 71 °C'de başlayan yıkımla birlikte 103 CFU/100 g'lık bir miktarın yok edildiği kabul edilmektedir (Jones 2011).

Jones ve Richardson (2004) tarafından sunulan veriler, 178 püre rasyon numunesinden 16'sının (%8,79) *Salmonella* için pozitif olduğunu, 451 pelet yem numunesinden 19'unun (%4,21) kontamine olduğunu göstermektedir. Bu, peletleme işleminin yemden izole edilen *Salmonella* hücrelerinin sayısını %50 oranında azalttığını göstermektedir.

Fancher ve diğerleri (1996), tavlama aşaması için bir ekspanderin kullanılmasının, diğerlerinin yanı sıra, daha düşük yem nemi sağlama ve dolayısıyla daha yüksek bir yem hijyenine sahip olma avantajına sahip olduğunu bildirmiştir. Ekspander, yemi sabit bir kalıptan geçmeye zorlamak yerine halka şeklindeki bir boşluk üzerinden boşaltan, tek vidalı bir ekstrüdere benzeyen bir cihazdır. Bu ekspander, bakteri yüklerini 10^5 ila 10^6 CFU/g oranında azaltarak, yemin hijyenik kalitesini iyileştirebilir. Bu, 115 ila 125 °C sıcaklık değerleri ve 10 ila 20 saniye boyunca sürdürülen 1200 psi'ye kadar basınç değerleri ile gerçekleştirilir (Fancher ve diğerleri 1996).

Peletleme işlemi sırasında buharlamanın bakterileri yok ettiği gösterilmiştir (Stott ve diğerleri 1975; Furuta ve diğerleri 1980a,b). Stott ve diğerleri (1975), bu işleme aşamasının öncesinde ve sonrasında numune olarak, peletleme işleminin kümes hayvanı yemlerindeki Enterobacteriaceae sayısını 1000 kata kadar azalttığını göstermiştir. Ayrıca sadece et yemi ve kemik unu örneklerinden *Salmonella* izole etmişlerdir. Furuta ve diğerleri (1980a), pelet ve kırıntı elde etmek için 70 ila 80 °C'de 5 saniye muamele edilen püre rasyonların bakteri kolonisi sayısı bakımından 1.9×10^3 'den 3.0×10^3 CFU/g'ye varan bir azalmaya maruz kaldığını gözlemlemişlerdir.

Yemdeki *Salmonella* kolonisi oluşturan birimlerin azaltılması başarısı, Thomas ve van der Poel (1996) ve Thomas ve diğerleri (1997, 1998) tarafından tartışıldığı gibi, peletlerin fiziksel kalitesiyle ilgili farklı faktörlerden etkilenebilir. Görünüşe göre, bileşenlerin farklı özellikleri doğrudan bağlanma sürecini etkilemektedir ve sertlik ve dayanıklılık yoluyla değerlendirilen pelet kalitesi üzerinde daha fazla etkiye sahiptir. Ek olarak, ekipmanlar, yemin nihai hijyenik özelliklerini doğrudan etkileyerek nihai kalite üzerinde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Tavlama ve ısıl işlemden sonra, soğutma aşaması 2 şekilde *Salmonella* ile büyük bir yeniden kontaminasyon riski taşımaktadır. Soğutma sırasında, peletlenmiş yem ile ortam arasındaki sıcaklık farkı 5 °C'den fazla ise yoğunlaşma meydana gelebilir. Bu nedenle, sıcak peletler, yem üretim tesisinin "temiz tarafındaki" yoğunlaşmaya ve serbest suya yol açacaktır. Uygun koşullarda yoğunlaşma damlacıkları, konveyörün üstünde veya siloda *Salmonella* büyümesine neden olabilir. Bu sorunun oluşturabileceği mikrobiyolojik riski azaltmak için soğutucunun üst kısmının yalıtılması yoğunlaşma riskini azaltabilir (EFSA 2008). Ayrıca, pelet soğutucular büyük hacimlerde havayı çektiği için, soğutucudan elde edilen toz, diğer alanlarda toplanan toza göre daha fazla kontaminasyon olasılığına sahip görünmektedir. Ek olarak, pelet değişimi etrafındaki mekanik titreşimler ve hava akımları, toz parçacıklarının yerinden çıkmasına ve peletlenmiş yemin içine düşmesine neden olabilir (Jones ve Richardson 2004). EFSA (2008), yem üretim tesislerinde yeterli toz toplayıcı sistemlerinin tozu kontrol altına almak ve çevreyi temiz tutmak için önemli olduğunu belirtmektedir.

Sürü testi, sanitasyon ve biyo-güvenlik

Test, *Salmonella* kontrol programlarının çok önemli bir parçasıdır. Bununla birlikte, çevresel kaynaklardan kümeslerde ve sürülerde birçok *Salmonella* serotipinin (S. Enteritidis dahil) sürekli olarak yeniden ortaya çıkması nedeniyle etkinliği bazen düşük olabileceğinden, test tartışmalı bir konudur. Başlangıç noktasını bulma testi, 1990 ve 1995 yılları arasında ABD'de USDA düzenlemesi yoluyla genellikle etkili bir kontrol stratejisi olmamıştır (Hogue ve diğerleri 1997; Gast ve Guard 2011). *Salmonella* içeren dışkı dökülmesinin aralıklı olması nedeniyle, bu tür numunelerin test edilmesi güvenilir sonuçlar vermemektedir (Gast 2007). Bununla birlikte, uygun yöntem seçildiğinde (Arnold ve diğerleri 2010), çevresel numune almanın uygulanmasının nispeten kolay olduğu ve test duyarlılığının yüksek olduğu kanıtlanmıştır (Arnold ve diğerleri 2010), ancak bu, yumurta kontaminasyonunun gerçek olasılığını yalnızca dolaylı olarak yansıtır (Gast ve Guard 2011). Zemin, yuva kutuları, yumurta bantları, damlatma bantları, kazma aletleri, fan kanatları ve toz gibi farklı konumlardan numune alırken, sürüntü çubuğu numuneleri kullanılarak S. Enteritidis için yoğun izleme çok verimli bir yaklaşım olarak kabul edilir ve *Salmonella*'nın yüksek hassasiyetle saptanmasını sağlayabilir (Davies ve Breslin 2001; Kinde ve diğerleri 2005; Gast 2007). *Salmonella* serotiplerinin çoğu invaziv olduğundan, genellikle farklı dokular toplanır ve enfekte tavukları tespit etmek için daha fazla test edilir (karaciğer, dalak, yumurtalık, yumurta kanalı, testis, yolk kesesi, kalp, kalp kanı, böbrek, safra kesesi, pankreas, sinovya ve göz) (Gast ve Beard 1990; Gast 2007). *Salmonella* enfeksiyonları genellikle patojenin bağırsak yolunda kolonizasyonunun bir sonucudur, bu nedenle bağırsak dokuları ve içerikleri (çekum ve içerikleri) genellikle değerlendirme için toplanır ve bazı durumlarda, S. Enteritidis'in düşük sıklıkta yeniden toplanmasını uzun süreler için mümkün olabilir (Gast ve Beard 1990). Sonuç olarak, yumurta kültürü, birçok test planında doğrulayıcı bir adım olarak ortaya çıkmaktadır, fakat iç kontaminasyonun meydana geldiği düşük insidans ve genellikle taze yumurtalarda bulunan çok düşük ilk *Salmonella* hücre yoğunlukları nedeniyle yumurtaların içinde *Salmonella* tespiti çok zordur (Gast 2007). Bununla birlikte, ABD'de, S. Enteritidis için çevresel bir test pozitif olduğunda, FDA Yumurta Kuralı (FDA 2009a), yumurta testinin devam etmesini veya yumurtaların S. Enteritidis'te en az 5 log azalma ile sonuçlanacak bir işleme yönlendirilmesini gerektirmektedir. Yumurta testine devam etme alternatifi altında, 4 parti 1000 yumurta numunesi 2 haftalık aralıklarla test edilmelidir ve 4 testin tümü negatifse, başka test gerekmez. AB'nin yumurta tavuğu sürülerine ilişkin düzenlemeleri dikkate alındığında, halk sağlığı açısından önemli olan tüm *Salmonella* serotipleri için, yetiştirme döneminde 1 günlük civcivler ve piliçler yumurtlama ünitesine taşınmadan 2 hafta önce *Salmonella* için test edilmelidir; yumurtlama döneminde ise her 15 haftada bir test yapılmalıdır (EC 2003). Ayrıca, ulusal bir *Salmonella* kontrol programına tabi olan ticari bir yumurta tavuğu sürüsünden elde edilmedikçe, yumurtalar doğrudan insan tüketimi için (sofralık yumurta olarak) kullanılmamalıdır.

Bir sürünün ortamda ve yumurtalarda S. Enteritidis varlığı için pozitif olarak test edilmesi durumunda, FDA'nın yumurta kuralı (FDA 2009a), bu sürünün yaşadığı kümeslerin 3 adımda temizlenmesini ve dezenfekte edilmesini gerektirir: görünür gübrenin çıkarılması, toz, tüy ve eski yemlerin ortadan kaldırılması için kuru temizleme ve spray, aerosoller, fümigasyon veya başka bir uygun dezenfeksiyon yöntemi ile dezenfeksiyon (FDA 2009a). Temizlik ve dezenfeksiyon sırasında, tüm alanı iyice temizlemek için tüm hareketli ekipmanın yeri değiştirilmelidir. Ayrıca, kemirgen tuzak yemleri yerleştirilip temizlikten hemen önce çıkarılmalı ve ayrıca kemirgen giriş yerleri tamamen onarılmalıdır. Su hatlarının sanitasyonu, yeni yumurta tavuklarının yerleştirilmesinden 2 ila 3 gün önce, su hatları 1870 ppm asit

placement of new layers, with water lines filled with an 1870-ppm solüsyonu ile doldurularak ve hatlar 2 saat sonra tamamen yıkanarak gerçekleştirilmelidir. 2. adımda, su hatları 20 ppm klor solüsyonu ile doldurulur ve 2 saat sonra klor kokusu kalmayacak şekilde iyice yıkanır (FDA 2009a). Dezenfeksiyon prosedürü, dezenfeksiyon solüsyonunun kümes dışında 10 fitlik (3 metre) bir çevre üzerinde uygulanmasını da içermelidir.

Kümes hayvanları tesisleri, atık maddelerin uzaklaştırılması ve yüksek basınçlı püskürtme ile temizlenmesinin ardından sıklıkla kimyasal bileşikler (özellikle fenolik ve kuaterner amonyum olanlar) kullanılarak dezenfeksiyona tabi tutulur (Gast 2007). *Salmonella* 'ya karşı etkinlikleri açısından sadece kimyasal bileşikler farklı değildir. Davison ve diğerleri (1996), *S. Enteritidis*'e karşı kuyu, dere veya havuz suyu kullanımı ile 5 sınıf dezenfektan arasındaki farkları değerlendirdiler. Elde ettikleri sonuçlar, *S. Enteritidis*'in yumurta tavuğu kümeslerinden uzaklaştırılmamasının kısmen su kaynağıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Biyo-güvenlik "*S. Enteritidis*'in bir çiftliğe veya kümeslere girmemesini veya bunlar arasında birbirine transfer olmamasını sağlamaya yönelik, çiftlikte ve kümeslerde ziyaretçilerin sınırlandırılmasını, bir kümeden diğerine çapraz kontaminasyona karşı koruma sağlayacak personel ve ekipman uygulamalarının sürdürülmesini, sokaktaki kümes hayvanlarının, yabani kuşların, kedilerin ve diğer hayvanların kümeslere girmesini önlemeyi ve çalışanların tavukları evde tutmasına izin vermemeyi içeren bir program" olarak tanımlanmaktadır (FDA 2009a).

Yumurta tavuğu çiftliklerinde uygulanan mevcut kontrol programları aşağıdaki önerileri içermektedir: (1) yumurtaları ve civcivleri sadece *Salmonella* içermediği kanıtlanmış damızlık sürülerden elde etmek; (2) kuluçkalık yumurtaların uygun şekilde dezenfekte edilmesi ve kuluçkanın sıkı sanitasyon koşulları altında gerçekleştirilmesi; (3) önerilen prosedürleri kullanarak kümesleri sürüler arasında iyice temizlemek ve dezenfekte etmek; (4) kemirgen ve böcek kontrol önlemlerini kümes tasarımı ve yönetimine dahil etmek ve bunların uygulanmasını periyodik izleme yoluyla belgelemek; (5) Kanatlı barnak tesislerinde ve kümesler arasında personel hareketinin ve ekipmanın kontrolünün kısıtlanması yoluyla katı bir şekilde uygulanan biyo-güvenlik uygulamalarını uygulamak; (6) yemin pelet halinde olduğundan ve hayvansal proteinler içermediğinden emin olmak ve (7) antılmış kaynaklar aracılığıyla suyun mikrobiyolojik kalitesini sağlamak (Gast 2007; FDA 2009a).

Diğer patojenlerin yanı sıra *Salmonella* 'nın çiftliğe girmesini önlemek için insan ve ekipmanın kontrolünün kritik öneme sahip olduğu düşünülmektedir. İnsan trafiğini kontrol etmenin en etkili yollarından biri işaretler, çitler ve kapıların kullanılmasıdır ve planlara uyulmasını sağlamak için binaların mümkün olduğunca kilitli kalması gerekir. Tarım dışı çalışanlara, merkezi bir yere rapor verdikten ve çiftliğe gelmeden önce bir kayıt defteri imzalandıktan sonra, tek kullanımlık veya yeniden kullanılabilir özel giysiler veya tulumlar verilecektir (FDA 2009a).

Ekipmanın paylaşılması önerilmez, ancak bu gerçekleşirse, çiftlikten başka bir çiftliğe geçişte temiz ve dezenfekte edilmiş olduğundan emin olunmalıdır (FDA 2009a). Knape ve diğerleri (2002) hat içi ve hat dışı olmak üzere 2 genel ticari yumurta işleme tesisi sınıfından bahsetmektedir. Hat içi tip, ortak bir yumurta bandıyla birbirine bağlanan birden fazla kümes anlamına gelirken, hat dışı tip ise, işleme tesisine bağlı olmayan kümeslerden gelen yumurtaları ifade eder. Genel olarak, yazarlar hat içi tesisten elde edilen yumurtaların aerobik plaka sayılarının (APC) çevrim dışı tesisten elde edilenlere kıyasla daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Musgrove ve diğerleri (2012), hat dışı bir tesis ile karma işletim (hat içi işlenmiş yumurtalar ve hat dışı olanlarla takviye şeklinde) arasında karşılaştırmalar yaparak, kümeste kullanılan yumurta arabalarının *Salmonella* rezervuarı olarak hareket etme olasılığını belirlemiştir. Hat dışı tesisteki *Salmonella* prevalansının

(%12) karma operasyonlardan (%36) önemli ölçüde farklı olduğu ($P < 0,001$) görülmektedir.

Sürülere *Salmonella* bulaşma riskini azaltmak için yumurta tavuklarının fareler, böcekler ve yabani kuşlar gibi bu patojenin farklı vektörlerine maruz kalmasını sınırlamak da gereklidir (Henzler ve Opitz 1992; Davies ve Wray 1995; Olsen ve Hammack 2000; Mian ve diğerleri 2002). FDA Yumurta Kuralı (FDA 2009a), haşerelerin kontrol programında izlemenin çok önemli olduğunu belirtmektedir. Tatmin edici bir kemirgen kontrolü elde etmenin yöntemi, mekanik tuzaklar veya yapışkan levhalarla görsel inceleme ve izlemedir. Sineklerle gelindiğinde ise, spot kartların, scudder ızgaralarının veya yapışkan tuzakların kullanılması, sinek aktivitesinin seviyesini değerlendirmeye yardımcı olacak ve bunlar üzerinde tatmin edici bir kontrol sağlayacaktır. Ayrıca, kümes içindeki ve dışındaki kalıntıların ortadan kaldırılması yoluyla haşerelerin barınması önlenmelidir (FDA 2009a).

Holt ve diğerleri (2011), farklı kümes sistemlerinin biyo-güvenlik önlemlerinin göreceli etkinliğini ve potansiyel *Salmonella* vektörlerinin çiftlikteki seviyelerini etkileyebileceğini, dolayısıyla iyileştirme ve önleme yöntemlerinin başarısını etkileyebileceğini düşünmektedir. Yumurta tavuklarının yaban hayatı ile etkileşimi, kümes veya kafes sistemlerine kıyasla serbest dolaşım kümes sistemlerinde artar. Ek olarak, dezenfekte edilmesi çok zor olduğundan, halihazırda kontamine olmuş olan toprak kalıcı bir *Salmonella* kaynağı olarak işlev görebilir.

Aşılama

Tavuk yumurtalarında *Salmonella* spp enfeksiyonunun kontrolü, en sık kullanılanlar arasında aşılama olmak üzere çeşitli önleyici tedbirleri içermektedir (Van Immerseel ve diğerleri 2005b).

Bağışıklığı harekete geçiren ancak hastalığa neden olmayan mikrobiyal patojenlerle veya patojenlerden ekstrakte edilen antijenik bileşenlerle aşılama yoluyla aktif bağışıklık elde edilir. Başarılı olduğunda, patojenik ajana daha sonra maruz kalınması, patojeni ortadan kaldıracak veya ürünlerinin aracılık ettiği hastalığı önleyecek yoğun bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarır (Goldsby ve diğerleri 2003). Şu anda kümes hayvanlarında ticari düzeyde kullanılan yaygın aşılama çoğu, inaktive edilmiş (öldürülmüş) veya canlı, ancak zayıflatılmış *Salmonella* spp suşlarından oluşmaktadır. Canlı aşılama genellikle, hem hücre aracılı hem de humoral bağışıklıklı uyaran, inaktive edilmiş aşılardan daha iyi koruma sağlar (Van Immerseel ve diğerleri 2005b). Canlı aşılama AB'de başarılı bir şekilde kullanılmış olup, üreme sistemi kolonizasyonunu azaltma kapasitelerini ve ayrıca yumurta tavuklarında dahili yumurta kontaminasyon riskini ortaya koymaktadır. Aşılı gruptan 1575 yumurtada aşı suşları tespit edilmemiş ve bu nedenle yaklaşımın güvenilirliğini ortaya konmuştur (Gantois ve diğerleri 2006).

Yapılan eprüvasyonlar sonrasında *S. Enteritidis* aşılama yumurta kontaminasyonunu ve *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* kolonizasyonunu azaltmada etkili olduğu kanıtlanmıştır (Nakamura ve diğerleri 1994; Cerquetti ve Gherardi 2000a, 2000b; Liu ve diğerleri 2001; Woodward ve diğerleri 2002; Khan ve diğerleri 2003; Van Immerseel ve diğerleri 2005c). Yumurta tavuklarında *Salmonella* eprüvasyonunu ve ardından aşı uygulamasını içeren farklı çalışmalar, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ile enfeksiyon riskinin bu yaklaşımla azaltılabileceğini kanıtlamıştır (Tablo 1). Toyota-Hanatanı ve diğerleri (2009) aşılama (inaktive aşı) ve aşılama sürüler tarafından üretilen yumurtaların *S. Enteritidis* kontaminasyonunu değerlendirdiler. 1600'den fazla *S. Enteritidis* hücre/100 mL (en olası sayı — MPN) sıvı yumurta numunesi aşılama sürülerden izole edilmiştir. Aşılama sürüler için maksimum MPN değeri 8/100 mL olup, gıda kaynaklı *S. Enteritidis* salgını riski önemli ölçüde azaltılmıştır.

Tablo 1– Kümes hayvanlarında S. Enteritidis aşılannın etkilerine ilişkin farklı in vivo çalışmalar.

İmmünizasyon yöntemi ve aşı türü	<i>Salmonella</i> epruvasyon koşulları	Gözlemlenen etkiler	Referans
Biyolojik olarak parçalanabilen mikro küreler içinde kapsüllenmiş formalin ile inaktive edilmiş S. Enteritidis ile tek oral veya intramüsküler immünizasyon S. Enteritidis PT4 bakterin (Salenvac) ile intramüsküler immünizasyon	6 haftalıkken 10^9 CFU S. Enteritidis	Fekal saçılma ve organ kolonizasyonunun azalması	Liu ve diğerleri (2001)
	8, 17, 23, 30 ve 59. haftalarda $5-7.5 \times 10^7$ CFU S. Enteritidis	Kültür pozitif olan doku ve dışkı numunelerinin sayısında azalma Aşılannmış yumurta tavuklarından daha az pozitif yumurta	Woodward ve diğerleri (2002)
	8×10^8 CFU S. Enteritidis virulan şuşu	Çekum kolonizasyonda yaklaşık 1000 kat azalma	Khan ve diğerleri (2003)
9 haftalık tavuğun 2 S. Enteritidis dış zar proteini ile deri altından immünizasyonu, ardından 2 haftalık zaman aralıklarıyla 2 destekleyici immünizasyon 1, 2, 3 ve 7 günde S. Enteritidis'in sıcaklığa duyarlı mutantının 10^9 CFU'su ile oral immünizasyon	Son immünizasyondan 14 gün sonra virulan bir S. Enteritidis şuşunun 10^9 CFU'su	Saçılmanın ve iç organların kolonizasyonunun azalması	Cerquetti ve Gherardi (2000a) Cerquetti ve Gherardi (2000b)
	Son aşılammadan 7 ve 14 gün sonra 10^8 CFU S. Enteritidis ve S. Typhimurium	Epruvasyondan 14 gün sonra çekum içeriği, karaciğer ve dalaktan daha az bakteri elde edilmesi	Nakamura ve diğerleri (1994)
S. Enteritidis'in sıcaklığa duyarlı bir mutanı ile oral ve intraperitoneal yolları birleştiren iki set immünizasyon 14 ve 18 haftalıkken S. Enteritidis PT4 şuşunun yağ emülsiyonu aşısı ile immünizasyon	Homolog S. Enteritidis şuşunun 10^6 ve 10^3 hücreleri	S. Daha az sayıda aşılannmış tavuğun çekum dışısından Enteritidis'in izole edilmesi	

Atterbury ve diğerleri (2009), bir *Salmonella* Enteritidis PT4 epruvasyonunun ardından piliçlerin çekum kolonizasyonunu önlemede öldürülmüş bir *Salmonella* aşısının ve 3 canlı aşının etkinliğini belirlemeyi amaçlamıştır. Bir *Salmonella* epruvasyonunun ardından farklı aşilar verilen gruplar arasında toplam pozitif tavuk sayısında anlamlı bir farklılık meydana gelmedi. Buna rağmen, öldürülen aşı ile aşılannan grup, aşılannmamış grupla karşılaştırıldığında çekumlarında doğrudan sayılabilen *Salmonella* seviyelerine ($\geq 10^2$ CFU/g) sahip en az sayıda tavuk içeriyordu ve bunu canlı aşı grupları takip ediyordu. Canlı aşının yeni yumurtadan çıkmış tavuklara oral yoldan verilmesi, geniş bağırsak kolonizasyonu ve güçlü adaptif bağışıklık ile sonuçlanmaktadır. Ek olarak, bağırsakta canlı bir *Salmonella* aşısından kaynaklanan büyük bir bakteri varlığı, polimorfonükleer hücrelerin bağırsak duvarlarına infiltrasyonunu indükleyebilir, bu da virulan *Salmonella* şuşlarının istilasına ve sistemik yayılmasına karşı direnç sağlar (Omwandho ve Kubota 2010).

Saflaştırılmış tip1 S. Enteritidis fimbriae bir aşıda antijen olarak kullanılmış ve aşılannmış tavukların yumurtalarında ve serumlarında IgG ve IgA varlığını tetiklemiştir (De Buck ve diğerleri 2004b). S. Enteritidis'in bir fimD mutanı ile tavukların damardan aşılannması, yumurtaların daha az kontamine olmasına yol açmıştır (De Buck ve diğerleri 2004a). S. Enteritidis'in dış zar proteinlerini (OMP) içeren aşilarla immünizasyon, yumurta tavuklarında bağırsak mukozasında kolonizasyonun azalmasına da yol açmıştır (Khan ve diğerleri 2003).

AB mevzuatı, S. Enteritidis tarafından yumurta kontaminasyonu riskini azaltmak için gıda endüstrisi paydaşlarının başvurusu için farklı gereksinimler temin etmektedir. Bu amaçla, her AB ülkesi kendi onaylı ulusal kontrol programını uygulamıştır ve aşılama, alman önlemlerden biridir. Ulusal kontrol programları, gıda kaynaklı *Salmonella* serotiplerinin yaygınlığını azaltmayı amaçlamaktadır. Halk sağlığı açısından önemi olan tüm *Salmonella* serotipleri için üreme ve üretim aşamalarında belirli anlarda numune alma işlemi yapılmalıdır. Hayvanlar aşılannmışsa, immünolojik testler yapılmaz. Ayrıca, "[...] Sağlık durumu bilinmeyen, enfekte olduklarından şüphelenilen sürülerden elde edilen yumurtalar, yalnızca halk sağlığı açısından önemi olan *Salmonella* serotiplerinin ortadan kaldırılmasını garanti edecek şekilde tedavi edilirse insan tüketimi için kullanılabilir" (EC 2003). EC 2160/2003 Yönetmeliği'ni değiştiren bir değişiklikle,

"sağlık durumu bilinmeyen ve bir azalma noktası olan veya gıda kaynaklı bir salgına neden olduğu önceden belirlenmiş bir *Salmonella* serotipi ile enfekte olduğundan şüphelenilen veya enfekte olan sürülerden elde edilen yumurtalar", otomatik olarak B sınıfına dahil edilen yumurtalar olarak kabul edilmektedir (EC 2007b). EC no 557/2007 Komisyon Tüzüğü tarafından tanımlandığı gibi, A sınıfı yumurtalar, aşağıdaki özellikleri karşılayan yumurtalardır: (a) kabuk ve kütükül: normal şekil, temiz ve hasarsız; (b) hava boşluğu: yüksekliği 6 mm'yi geçmeyen, sabit ve "ekstra" olarak pazarlanan yumurtalar için 4 mm; (c) yumurta sarısı: ışığa tutarak incelemede sadece gölge olarak görünür, net bir şekilde ayırt edilebilir dış hatı yoktur, yumurtayı döndürüp merkezi bir konuma geri döndürüldüğünde hafifçe hareket eder; (d) yumurta akı: şeffaf yan saydam; (e) mikrop: gelişme algılanamaz; (f) yabancı madde ve (g) yabancı koku: izin verilmez. Artık belirtilen özelliklere sahip olmayan A Sınıfı yumurtalar, B sınıfına düşürülebilir (EC 2007a).

Bu şekilde işaretlenirler ve paketlenme merkezlerine girişleri, sağlıklı sürülerden gelen yumurtaların olası çapraz bulaşmasını önlemek için uygulanan yöntemlerin etkinliğine bağlıdır.

Aşı, Avusturya, Belçika (S. Enteritidis için), Çek Cumhuriyeti, Almanya ve Macaristan'da *Salmonella* 'ya karşı savaşmak için kullanılan zorunlu bir önlemdir; Bulgaristan, Belçika (S. Typhimurium için) Kıbrıs, Estonya, Fransa, Yunanistan, İtalya, Letonya, Litvanya, Hollanda, Polonya, Portekiz, Romanya, Slovakya, Slovenya, İspanya ve Birleşik Krallık'ta ise izin verilir ve önerilmektedir (EFSA 2004; EFSA 2011). Danimarka, Finlandiya, İsveç ve İrlanda aşılammayı yasaklamış ve *Salmonella* spp. için etkin kontrol programları geliştirmiştir. Serolojik testlerin sonuçlarıyla potansiyel etkileşimleri nedeniyle aşılannın kullanımını reddetmişlerdir (Murchie ve diğerleri 2007; Kornschober ve diğerleri 2009). Örnek olarak, İsveç'te, ulusal *Salmonella* spp kontrol programı, ithal edilen tüm kümes hayvanlarının karantinaya alınması ve herhangi bir *Salmonella* spp için pozitif olduğu tespit edilen ithal tüm tavukların imha edilmesi gibi farklı önlemler uygulayarak bakterinin yayılmasını azaltmayı amaçlamaktadır. İsveç ayrıca AB mevzuatı gerekliliklerine göre numune alma prosedürlerini kullanmaktadır ve pozitif olması durumunda sürülerin nüfusu hızla ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca, piyasada izi sürülen tüm ürünler derhal geri çekilmektedir. Ayrıca yem üretiminde *Salmonella* spp için özel bir kontrol programı bulunmaktadır (Keery 2010).

Avustralya'da Salmonelloz'a S. Enteritidis veya S. Typhimurium neden olmaz, bu serotiplerin yumurta tavuğu sürülerinde bulunmadığı rapor edilmektedir. Bu nedenle *Salmonella* 'ya karşı ulusal bir kontrol programının uygulanması gerekli görülmemektedir.

ABD'de (FDA 2009a) ve Kanada'da (Keery 2010), tavukların *Salmonella* spp'ye karşı direncini artırmak için aşuların kullanılması teşvik edilmektedir. Kanada'da, eski sürü S. Enteritidis-pozitif olarak test edildiğinde, yeni bir kümese yerleştirilen yumurta tavuğu sürülerinin aşılama siddetle tavsiye edilir (Health Canada 2011).

Pasif immünizasyon

Seçilen mikroorganizmalardan (örneğin, S. Enteritidis ve S. Typhimurium) antijenlerle immüne edilmiş yumurta tavukları, kandan yumurta sarısına taşınan yüksek miktarlarda spesifik antikorlar (IgY) üreterek reaksiyona girer. Hiperimmün yumurtalar olarak adlandırılan yüksek düzeyde antijene özgü IgY içeren bu yumurtalar, diğer türlere pasif bağışıklık kazandırmak için yem katkı maddesi (genellikle tam yumurta sarısı tozu şeklinde) olarak uygulanabilir (Chalghoumi ve diğerleri 2009a). Chalghoumi ve diğerleri (2008), 429 ± 20 mg/g konsantrasyonlarda aynı yumurtada S. Enteritidis ve S. Typhimurium OMP'ye karşı IgY üretiminin mümkün olduğunu göstermiştir. Ayrıca, (Chalghoumi ve diğerleri 2009b) bu spesifik antikorların, konsantrasyona bağlı bir şekilde *Salmonella* spp. üzerinde büyümeyi inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu gösterdiler. Ayrıca insan epitelyal Caco-2 hücre dizilerini kullanarak *Salmonella* spp'nin bağırsak hücrelerine yapışmasını önleme yeteneğini de değerlendirdiler. Sonuçlar, spesifik IgY'nin, enfekte Caco-2 hücre tek katmanlarının transepitelyal elektrik direncindeki düşüşü azaltabildiğini ve konsantrasyona bağlı bir şekilde *Salmonella* spp yapışmasını engellediğini göstermiştir. Başka bir çalışma, oral yoldan uygulanan yumurta sarısı antikorlarının, yumurta sarısı tozu almayan gruptaki *Salmonella* pozitif yumurtalara kıyasla (deneysel olarak enfekte olmuş bir grupta) %13,3'lük bir *Salmonella* -pozitif yumurta azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Antikorlar, yem katkı maddesi olarak (3 g/tavuk/gün), bütün yumurta tozu şeklinde uygulanmıştır (Gürtler ve diğerleri 2004).

Bu antikorlara karşı direnç olgusunun gelişme riski oldukça sınırlıdır (Xu ve diğerleri 2011). Aslında bunlar, çoklu epitoplara hedefleyen poliklonal antikorlardır. Bununla birlikte, aşılarda direnç olgusunun ortaya çıkabileceği belirtilmiştir (Sirsat ve diğerleri 2009) ve bu, bize göre zayıf da olsa pasif immünizasyon için bir olasılıktır. Sirsat ve diğerleri (2009) ayrıca, çok çeşitli immünojenik serotipler göz önüne alındığında *Salmonella* spp için özellikle sorunlu olabilecek antikor terapisi veya aşılama ile aşırı spesifik araçlar geliştirme riskinden de bahsetmiştir. Bununla birlikte, Chalghoumi ve diğerleri (2008), anti-S Enteritidis IgY'nin S Typhimurium (ST)-antijeni ile yüksek çapraz reaktivitesini ve bunun tersini gözlemlemiştir. Bu deneyde aşı antijenleri olarak gerçekten de OMP'yi kullandılar; ve her iki *Salmonella* spp, OMP'de ortak epitoplara paylaşmaktadır. Bu nedenle, birkaç serotip arasında paylaşılan antijenlerin kullanılması, geliştirilen antikorların aşırı spesifikliği riskiyle başa çıkmaya imkân sağlamaktadır. Ayrıca, aynı yumurta sarısında 2 *Salmonella* serotipine karşı IgY geliştirerek, Chalghoumi ve diğerleri (2008), çeşitli patojenleri hedef alan hiperimmün yumurtaların daha da geliştirilmesi için kapıyı açık bırakmıştır.

Doğal antimikrobiyal ürünler

Bakteriyofajlar. Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini çoğalmak için kullanma yeteneğine sahip bakteriyel virüslerdir. Enfeksiyöz döngünün

mekanizması, 2 ana bakteriyofaj tipini ayırt etmek için kullanılır: virülan olanlar (hücrenin çok kısa sürede parçalanmasını ve ölümüne neden olanlar) ve ılıman olanlar (gizli, enfeksiyon döngüsünde lizojeni kullananlar). Virülan bakteriyofajlar, gıdalardaki gıda kaynaklı patojenleri azaltmak amacıyla farklı ürünlerde kullanılmaktadır (Monk ve diğerleri 2010). Bakteriyofajlar oldukça ayrıncıdır ve çoğu, spesifik bağlanma bölgeleri ifade eden belirli bir bakteri grubu ile etkileşime girerler (Joerger 2003).

Yumurta tavuklarının çekumlarında S. Enteritidis kolonizasyonunu azaltmak için 3 farklı *Salmonella* 'ya özgü bakteriyofajın bir kombinasyonunun kullanılması, insidanda %80'e varan önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır. 3 bakteriyofajın kokteyli, 10^{10} plak oluşturuca ünitelerden oluşan çok sayıda enfeksiyon kullanılarak 6 günlükken sprey yoluyla uygulanmıştır. Tavuklar 7 günlükken 2.95×10^5 CFU/mL S. Enteritidis ile oral aşılama yoluyla deneysel olarak enfekte edilmiştir. 14. günde, kontrol grubu tavuklarının çekumundaki S. Enteritidis sayısı 1.56×10^5 CFU/g'a ulaşırken, bakteriyofaj uygulanan grup için sadece 9.48×10^3 CFU/g olarak gerçekleşmiştir (Borie ve diğerleri 2009) (Tablo 2). Ek olarak, aynı çalışma, bir bakteriyofaj ve rekabetçi dışlanım ürünü arasındaki bir kombinasyonun, S. Enteritidis'in çekumu kolonizasyonunu azaltma yeteneğini değerlendirmiştir. Sonuçlar, bu kombinasyon uygulamasının, tek başına bakteriyofaj kullanımına kıyasla daha da verimli olduğunu (1.6×10^2 CFU/g) ortaya koymuştur.

Toro ve diğerleri (2005) ayrıca, 7. günde S. Typhimurium ile eprüve edilen White Leghorn tavuklarında 5.4×10^6 PFU/0.5 mL/tavuk dozunda bakteriyofajların bir "kokteylinin" kullanılmasının bu patojenle ileum kolonizasyonunda bir azalmaya yol açtığını gösterdiler.

Bakteriyofaj uygulanan tavuklardan toplanan ileum numuneleri, eprüve edilmiş ve işleme tabi tutulmuş olanlardan (81.8 CFU/mL) önemli ölçüde daha düşük S. Typhimurium sayıları (1.1 CFU/mL) göstermiştir (Tablo 2).

Bakteriyofajların kuyruk proteini, yüzey yapılarına bağlanarak bakteri konağının spesifik olarak tanınmasına aracılık etme rolüne sahip kuyruk aparatının bir bileşenidir. 1 günlük Leghorn tavuklarına oral uygulamadan sonra, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, *Salmonella* spp büyüme ve kolonizasyonunda önemli bir gecikme ve çekum, karaciğer ve dalak düzeyinde *Salmonella* spp sayılarında önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır (Waseh ve diğerleri 2010). Bu yazarlara göre, etkinlikleri gastrointestinal proteazlara karşı direnç derecelerine bağlıdır.

Genel olarak güvenli kabul edilen bakteriyofajlar, gıda ürünlerindeki patojenlerin biyolojik kontrolü için oldukça verimli bir araç olarak kabul edilmektedir (Garcia ve diğerleri 2008). Faj terapisi, kesimden sonra kanatlı karkaslarında S. Enteritidis düzeyini azaltmak için başarıyla uygulanabilir (Higgins ve diğerleri 2005a, 1997). Yüksek özgüllüklerine rağmen, bakteri direnci ile karşılaşmıştır. Bakteriyofajlara direnç, genellikle reseptör olarak kullanılan bakteri hücre yüzeyi moleküllerinin (LPS, pili veya flagella gibi) kayıpları veya modifikasyonları gerçekleştiğinde meydana gelir (Levin ve Bull 2004). Bununla birlikte, bakteriyofajlar, bakteriyel dirençli mutantların ortaya çıkmasına tepki olarak hızla değişme yeteneğine sahiptir (Sulakvelidze ve diğerleri 2001; Carvalho ve diğerleri 2012). Bu nedenle, "kokteyl" denilen şeyde farklı bakteriyofajların kullanılması, tek bir bakteri suşuna karşı savaşmak için bile gerekli bulunmuştur (Joerger 2003).

Protein ve lif kaynakları. Kassaiy ve Mine (2004a), aşılama yapılmamış yumurta sarısı tozunun yumurta tavuklarında S. Typhimurium kolonizasyonunu baskılayabildiğini göstermiştir (Tablo 2). İmmünize edilmemiş yumurta sarısı tozu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır: yumurtalar, dış kabuk yüzeyinin dezenfeksiyonundan sonra kırılmış ve yumurta sarıları, aseptik olarak albümininden ayrılmıştır; toplanan sarılar dondurularak kurutulmuş ve ince bir toz halinde ezilmiştir.

Tablo 2– Farklı organ ve dokularda *S. Enteritidis* veya *S. Typhimurium* kolonizasyonunu azaltmak için yumurta tavukları ve piliçler üzerinde doğal antimikrobiyallerle ilgili farklı in vivo ve in vitro çalışmaları.

Kullanılan doğal antimikrobiyal türü	<i>Salmonella</i> eprüvasyon koşulları	Gözlemlenen etkiler	Referans
6 günlükten 10^5 plak oluşturuca birim dozunda sprey yoluyla uygulanan 3 bakteriyofajdan oluşan bir kokteyl 1 günlükten %10 BSAa ^a bakteriyofajların 3 doz kuyruk proteinlerinin 2 protokolde oral yoldan verilmesi: 1 saat, 18 saat ve 42 saatte (Protokol 1) ve 18 saatte, 42 saatte ve 66 saatte (Protokol 2) 1 günlükten 5.4×10^5 CFU/mL/tavuk dozunda bakteriyofaj kokteyli	7 günlükten 2.95×10^5 CFU/mL <i>S. Enteritidis</i> ile oral aşılama 2 günlük yaşta 10^4-10^7 <i>Salmonella</i> / 300 µL PBSb ile oral gavaj 7. günde 2.4×10^5 CFU/mL <i>S. Typhimurium</i> içeren bir süspansiyonun oral yoldan verilmesi 4 haftalık dönem sonunda 2 kez $1,0 \times 10^9$ CFU/mL <i>S. Typhimurium</i> oral uygulaması	Kontrol grubu için 1.56×10^5 CFU/g'a kıyasla çekum sayımları 9.48×10^3 CFU/g'a düştü Her iki protokolde de çekum, karaciğer ve dalakta <i>Salmonella</i> 'da önemli azalma ileumda <i>S. Typhimurium</i> sayılarında azalma Yumurta sarısı tozu ile muamele edilen gruptan herhangi bir organda <i>S. Typhimurium</i> saptanmadı; pozitif kontrol grubunun numune alınan organlarında (bağırsak, yumurtalık ve yumurta kanalı) 3,1 ila 4,0 log ₁₀ cfu. FOS içeren rasyonlar için <i>S. Enteritidis</i> ile yumurtalık ve dalak kolonizasyonunun yemden kesilmeye kıyasla azaltılması Aşılama sonrası 3 haftada, işleme tabi tutulan kanatlıların %38'i <i>S. Enteritidis</i> için pozitif (kontrol grubunda %63) <i>S. Typhimurium</i> kolonizasyon sıklığının kontrol grubunda %70'ten 1. deneme ve 2. denemede sırasıyla %20 ve %5'e düşürülmesi Kontrol grubunda 5,06 log CFU/g <i>S. Enteritidis</i> ile karşılaştırıldığında, B dozu için çekal içerikte ve A dozu için 4,59 log CFU/g <i>S. Enteritidis</i> , dışkıda aşılama sonrası 2 hafta ve yumurtalarda aşılama sonrası 3 hafta sonra <i>S. Enteritidis</i> izolasyonu; aşılamadan 15 gün sonra karaciğer, dalak ve yumurtalıkta pozitif sonuçlar, ancak aşılamadan 29 gün sonra negatif. Her iki grup için karaciğer ve dalakta <i>S. Enteritidis</i> kolonizasyonunun azaltılması (A - %56.67; B - %43.33); kontrol grubu (kapsaisinsiz yem) - %76.67.	Borie ve diğerleri (2009) Waseh ve diğerleri (2010) Toro ve diğerleri (2005) Kassaify ve Mine (2004a) Donalson ve diğerleri (2008a) Vilâ ve diğerleri (2009) Line ve diğerleri (1998) Sterzove diğerleri (2007) Ordoñez ve diğerleri (2008) Vicente ve diğerleri (2007)
1 günlükten itibaren 4 hafta süreyle %10 konsantrasyonda (wt/wt) aşılanmamış yumurta sarısı tozu ile takviye edilmiş yem 1 günlükten %90 yonca ve %10 bazal rasyon (1), %0.375 FOS ile %90 yonca + %10 bazal rasyon (2) ve %0.75 FOS ile %90 yonca + %10 bazal rasyon (3) 1 günlükten 0, 20 veya 100 mg/kg yemde bulunan 10^{10} canlı <i>B. cereus</i> var toyo (toz yem katkı maddesi) sporu içeren ürün 1 g <i>Saccharomyces boulardii</i> /kg yem (deneme 1) ve 1 günlük etlik piliçlere uygulanan 100 g aynı ürün/kg yem (deneme 2) 1 günlük tavukta 1,5 kg/t yem (A) veya 3,0 kg/t yem (B) dozunda asitleştirici yem katkı maddesi olarak 15 haftalıkken, 3 haftalık bir süre boyunca uygulanan, şekilsiz bir SiO ₂ atıl taşıyıcı içinde öjenolden (250 ppm) oluşan aromatik ürün, 1 günlük yaştan başlayarak, 28 gün boyunca yemde uygulanan 18 ppm (A) ve 36 ppm (B) dozlarında besinsel kapsaisin	4. günde 105 CFU <i>S. Enteritidis</i> faj tipi 13a içeren 1 mL inokulum ile mahsul gavajı 7. günde uygulanan 2×10^8 CFU <i>S. Enteritidis</i> /mL içeren oral süspansiyon 4. günde 3.3×10^8 <i>S. Typhimurium</i> ile oral gavaj 1,3 - 3.3×10^9 CFU/mL içeren 0,1 mL <i>S. Enteritidis</i> süspansiyonu ile 3 günlük yaşta mahsul aşılama. 18 haftalıkken 3.2×10^7 CFU <i>S. Enteritidis</i> içeren 1 mL (tek doz) ürüne aşılama 27. günde 10^8 CFU/mL <i>S. Enteritidis</i> ile eprüvasyon		

^aSığır serum albumini
^bFosfat tampon çözeltisi.
p.i. = aşılama sonrası.

Tavuk başına 10^9 CFU *S. Typhimurium* ile enfeksiyonun ardından, yemlere %5,0, 7,5 ve %10,0 (wt/wt) aşılanmamış yumurta sarısı tozunun eklenmesi, dışkı numunelerinde *S. Typhimurium* sayısını hızla azaltmıştır. Hatta sadece bir hafta sonra, pozitif kontrol grubu (ilave edilmemiş yem) ile karşılaştırıldığında önemli bir farkla, sayımlar ilk değerlerin %10'una ulaştı. Ayrıca 2 hafta boyunca yumurta sarısı tozunun %10,0 dozunda verilmesinden sonra *Salmonella* hiç tespit edilmemiştir.

Başka bir araştırma çalışmasında Kassaify ve Mine (2004b), yemde %5 (wt/wt) kadar düşük bir konsantrasyonda, immünize edilmemiş yumurta sarısı tozu, test edilen dışkı numuneleri için elde edilen negatif sonuçlarla gösterildiği gibi, 1. haftadan sonra bağırsak seviyesinde *S. Enteritidis*'i ortadan kaldırmıştır.

Bu, yüksek yoğunluklu lipoproteinler (Kassaify ve diğerleri 2005) veya sialiloligosakkaritler ve bunların türevleri (Sugita-Konishi ve diğerleri 2002) gibi bileşenlerin varlığı ile açıklanabilir.

Rekabetçi dışlanım florası, probiyotikler, prebiyotikler ve organik asitler. Rekabetçi dışlama florasının, probiyotiklerin, prebiyotiklerin yanı sıra asit bazlı ürünlerin kullanımı, kümes hayvanlarında *Salmonella* spp kolonizasyonu için önleyici yöntemler olarak

dünya çapında geniş çapta araştırılmıştır (Seo ve diğerleri 2000; Van Immerseel ve diğerleri 2002; Wagner ve Cerniglia 2005; Donalson ve diğerleri 2008b; Dunkley ve diğerleri 2009).

Rekabetçi dışlanım ürünleri, olgun sağlıklı kümes hayvanlarından yeni yumurtadan çıkmış tavuklara bağırsak bakterilerinin yerleştirilmesini içerir, kavram "enteropatojenler tarafından müteakip kolonizasyonu önlemek için yetişkin bir bağırsak mikrobiyotasının erken oluşumu" olarak tanımlanmaktadır. Diğer bakterilerin çoğalmasını engellemek için rekabetçi dışlanım ürünlerinin bakteri türleri tarafından kullanılan mekanizma, kısıtlayıcı bir fizyolojik ortamın yaratılmasından oluşmaktadır (örneğin, VFA'nın ceca'daki bakteriyostatik etkisi). Buna aşağıdakiler eklenmiştir: bakteriyel reseptör bölgeleri için rekabet, antibiyotik benzeri maddelerin (bakteriosinler gibi) geliştirilmesi ve temel substratların tükenmesi veya rekabeti (Schneitz ve Mead 2000; van der Wielen ve diğerleri 2000; Joerger 2003; Callaway ve diğerleri 2008).

Rakip dışlanım ürünleri, genellikle çekum içeriklerinden ve/veya sağlıklı evcil kümes hayvanlarının duvarlarından elde edilen farklı bakteri türlerinin bir karışımını temsil etmektedir. Çeşitli ürünler rekabetçi dışlanım kültürleri olarak

değerlendirilmiştir. Schneitz (2005) ve Schneitz ve Mead (2002) bu tür çok mayanın patojene bağlı bir mikroflora olarak hareket etme olasılığı çeşitli ürünlerden bahsetmektedir. Bunların birçoğu, yetişkin tavuklardan olabilir ve yumurta üretim sektöründe potansiyel olarak başarılı bir elde edilen bütün çekum içeriğinin rafine edilmemiş karışık kültürlerinden kullanımı olabilir. Pontier-Bres ve diğerleri (2012) tarafından oluşturulan, diğerleri, çekumda *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* *Saccharomyces boulardii*'nin *S. Typhimurium* hareketliliğini ve kolonizasyonuna karşı etkili, tanımlanmış bakteri türleri de dahil olmak üzere yörüngesini değiştirebildiğini ve istila özelliklerinde bir azalma kaydettiğini üzere, çekum duvarı kazımlarının eklenmesiyle seçilmiş karışık kültürler ortaya koyan başka bir mekanizma önerilmiştir.

Çoğu, tavuk bağırsağından izole edilmiş tam olarak Öleyici yöntem olarak bir diğer seçenek ise prebiyotik kullanımıdır. belirlenmemiş bakterilerin bir karışımını içerdiğinden ve kanıtlanmış Bunlar, sağlıklı bir bağırsak ekosisteminin korunmasından başlayarak gıda etkinliklerine rağmen bileşimleriyle ilgili belirsizlik, yumurta ve piliç eti güvenliğinin iyileştirilmesine yönelik entegre bir yaklaşım olarak kabul üretim sektöründe kullanım oranlarını azaltmaktadır. (Van Immerseel edilebilir (Gaggia ve diğerleri 2011). Prebiyotiklerin faydalı etkileri arasında sunlar sayılabilir: bağırsaklık sisteminin uyarılması, inflamatuvar reaksiyonların

Probiyotik, "bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek konakçı hayvanı azaltılması, toksin inaktivasyonu, bağırsak mikrobiyotasının modifikasyonu, faydalı yönde etkileyen canlı bir mikrobiyal yem takviyesi" olarak VFA üretiminin artması ve patojen kolonizasyonunun önlenmesi. (Patterson ve tanımlanmaktadır (Fuller 1989). *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, Burkholder2003; Revolvedo ve diğerleri 2006; Salminen ve diğerleri 2010).

Lactobacillus, *Streptococcus* türlerinin yanı sıra çeşitli mayalar da dahil Prebiyotikler gastrointestinal sistemin (GIT) üst kısmından geçişleri olmak üzere çeşitli mikrobiyal türler probiyotik olarak kullanılmıştır sırasında sindirilmeyen veya metabolize edilmezler ya da çok az metabolize (Patterson ve Burkholder 2003). Aralarında *S. Enteritidis*'in de bulunduğu olurlar. Bu nedenle, yapısında herhangi bir değişiklik olmadan, kolonik flora patojeni türlerin probiyotikler tarafından dışlanmasına imkân sağlayan fermente edilerek çekuma girerler. *Bifidobacterium* türleri kullanılması potansiyel mekanizmalar, yapılaşma bölgeleri ve besinler için rekabeti veya yoluyla *Salmonella* spp. gibi patojenik bakterilerin inhibe etme kabiliyetine bakteriyosinler, VFA veya hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal bileşiklerin sahip olabilirler (Grizard ve Barthelemy 1999; Doyle ve Erickson 2006; üretimini içerir (Erwing 2009; Vandeplass ve diğerleri 2010). Patojenler Vandeplass ve diğerleri 2010). Laktoz (Ziprin ve diğerleri 1993), tarafından çekal kolonizasyonun inhibisyonunun yanı sıra, probiyotik fruktooligosakkaritler (FOS) (Fukata ve diğerleri 1999), mannanoligosakkaritler bakterilerin, probiyotik uygulamadan 24 saat sonra civcivlerden izole (MOS) (Fernandez ve diğerleri 2002) ve izomaltooligosakkaritler (Chung ve edilen heterofillerin oksidatif patlama kapasitesinde bir artış ve Day 2004) *Salmonella* spp çekal kolonizasyonun inhibisyonu için etlik piliç degranülasyon ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Bu, doğuştan gelen bağırsaklık endüstrisinde halihazırda uygulanmakta olan oldukça etkili prebiyotiklerdir. sisteminin olası bir aktivasyonunu göstermektedir (Farnell ve diğerleri 2006). FOS'un, potansiyel patojen popülasyonlarını nispeten düşük seviyelerde Kümeler hayvanlarında (yumurta tavukları ve piliçler), *Lactobacillus* tutarken, sağlığı destekleyen 2 cinsin (*Bifidobacterium* spp ve cinsinin bakterileri, *Salmonella* çekum kolonizasyonunu azaltma veya *Lactobacillus* spp) birkaç bakteri üzerinde tercihli bir uyancı etki inhibe etme üzerindeki etkileri nedeniyle sıklıkla incelenmiştir (Gusils ve uygulayarak, *Salmonella* spp tarafından tavuk bağırsağının diğerleri 1999; Pascual ve diğerleri 1999; Jin ve diğerleri 2000; Tellez ve kolonizasyonunu azaltmada oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Xu ve diğerleri 2001; Ammorve diğerleri 2007; Lima ve diğerleri 2007). Yumurtlayan diğerleri 2003). Bir in vitro fermentasyon testi sırasında, yumurta tavukların kloaka veya vajinasından izole edilen laktobasillerin, kloakadan tavuklarından toplanan çekal içerikli bir anaerobik seyreltme çözeltisi izole edilenlerle vajinadan izole edilenler arasında hiçbir fark tespit ile 1:3000 konsantrasyon seyreltildi ve öğütülmüş yonca veya FOS'lu edilmeksizin, *S. Enteritidis*'e karşı in vitro inhibitör aktivite gösterdiği öne veya FOS'suz bir yumurta tavuğu rasyonuyla doldurulmuş serum sürülmüştür (Miyamoto ve diğerleri 2000). Van Coillie ve diğerleri (2007), tüplerine ilave edildi; ikincisi bir prebiyotik olarak ilave edildi. VFA ve yumurta tavuklarının kloaka ve vajinalarından izole edilen laktobasillerin in vitro laktik asit konsantrasyonları, 6 ve 24 saatlik substrat fermentasyonunda *Salmonella* büyümesini inhibe ettiğini ve in vivo *S. Enteritidis* kolonizasyonunu ölçülmüştür. Sonuçlar, yumurta tavuğu rasyonu ile karşılaştırıldığında azaltıldığını da göstermiştir. *Salmonella* inhibisyonunun, her birinin laktik asit üretimi daha büyük bir VFA ve laktik asit üretimi göstermiştir. Hem yonca hem de yumurta tavuğu rasyonunda FOS'un değiştirilmesinin, 24 saatlik fermentasyondan sonra daha belirgin bir etkiyle, fermentasyonu daha da arttırdığı görülmüştür (Donalson ve diğerleri 2008a).

Kaplan ve Hutkins (2000) ayrıca, farklı *Lactobacillus* türlerinin (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*) yanı sıra *Bifidobacterium*'un (*B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*) bir FOS-MRS besiyerinde FOS kullanabileceğini gösterdiler. Fernandez ve diğerleri (2002), MOS ile takviye edilmiş yumurta tavuğu rasyonlarının, *Bifidobacterium* spp ve *Lactobacillus* spp düzeylerini artırarak zamanla tavukların çekum içeriklerinde *S. Enteritidis*'in azalmasına yol açtığını göstermiştir.

Ancak, bu uygulamanın yumurta tavuklarının *Salmonella* enfeksiyonlarına duyarlılığını bir dereceye kadar arttırdığı kanıtlandığı için, daha yakın tarihli çalışmalar, tüy dökümü döneminde prebiyotiklerin etkinliğini araştırmaya odaklanmıştır (Donalson ve diğerleri 2008b) (Tablo 2). %90 yonca ve %10 yumurta tavuğu kombinasyonuna 2 seviyede (%0.750 ve %0.375) FOS eklenmesi, *S. Enteritidis* tarafından yumurtalık ve karaciğer kolonizasyonunun azalmasına neden olmuş ve sayımlar önemli ölçüde azalmıştır. Yazarlar, FOS uygulaması için kullanılan 2 doz arasında, düşük olanı yeterli olarak görmektedir.

Yumurta tavuklarında srasıyla 1. deneme için 2×10^6 CFU/mL ve 2. deneme için 2×10^8 CFU/mL içeren bir *S. Enteritidis* süspansiyonu ile eprüve ettiler. 10^{10} canlı spor içeren ürün, 20 mg/kg (deneme 1) ve 100 mg/kg (deneme 2) konsantrasyonlarında yem katkı maddesi olarak uygulandı. Sonuçlar, probiyotik uygulanan gruplarda *S. Enteritidis*'in tespit edilmediğini, kontrol grubunda ise kanatlıların %42'sinin pozitif olduğunu gösterdi. Bu yazarlar, ürünün *Lactobacillus* spp'nin çoğalmasını teşvik ettiğini ve bağırsak mikroflorasının dengesini iyileştirdiğini ileri sürdüler.

Mayalar ayrıca kümes hayvanlarında *Salmonella* spp. gibi patojenlere karşı probiyotik olarak hareket etme potansiyelleri açısından da incelenmiştir. Line ve diğerleri (1998), *Saccharomyces boulardii*'nin dahil edilmesinin, pozitif kontrol piliçlerinde çekal kolonizasyon sıklığını %70'ten srasıyla %20 ve %5'e düşürdüğünü göstermiştir (2 deneme) (Tablo 2). Bu tür patojenlerin çekum kolonizasyonunu azaltmaya yönelik olası mekanizma, *Saccharomyces boulardii*'nin hücre duvarındaki mannoz içeriği nedeniyle

Prebiyotiklerin bifidobakteriler gibi bazı yararlı mikroflora değişkenlik göstermiştir. Kümes hayvanlarının üretiminde EO'ların popülasyonlarını uyarma yeteneklerinden dolayı (Suskovic ve diğerleri 2001; Vandeplas ve diğerleri 2010) başka bir yaklaşım geliştirildi. Sinbiyotikler, prebiyotik suşların ve prebiyotik substratların kombinasyonlarıdır ve kullanımları, prebiyotik etkinin stabilizasyonu ve/veya iyileştirilmesi için bir yol olarak kabul edilir. Kombinasyonun, prebiyotik mikroorganizmanın hayatta kalmasını iyileştirebileceği düşünülmektedir, çünkü spesifik substratı, fermantasyonu için kolaylıkla temin edilebilir (Collins ve Gibson 1999). Nisbet ve diğerleri (1993), karışık çekal mikroflora sürekli akış kültürünün bir kombinasyonunu kullanarak, tavukta $1.75 \log_{10}$ S Typhimurium kolonizasyonunun azaldığını göstermiştir; %5 besinsel laktoz prebiyotik olarak kullanıldığında azalma $2.98 \log_{10}$ olmuştur. 2'sinin bir kombinasyonu, çekal kolonizasyonu $4.27 \log_{10}$ azaltmayı başarmış ve bu kombine yaklaşımların başarılı olduğunu göstermiştir.

Yeme veya içme suyuna uygun zamanda organik asitler eklenerek de yumurta kontaminasyonu riskini azaltmak mümkündür Van Immerseel ve diğerleri (2007), organik asitlerin aktivitesinde yer alan mekanizmaları kapsamlı bir şekilde tanımladılar. 3 kg/ton yem miktarında ilave organik asitli (ticari karışım) ile yemin etkisi, yumurta tavukları ile yapılan bir eprüvasyon deneyinde S. Enteritidis tarafından çekumun kolonizasyonu açısından etkili ve ucuz bir önleme yöntemini temsil ettiğini göstermiştir (Sterzo ve diğerleri 2007) (Tablo 2).

Butirik asit, yem veya içme suyu katkı maddesi olarak en sık kullanılan organik asittir. Toz halindeki butiratın ve mikrokapsüllü (kaplanmış) formdaki n-butirik asidin sodyum tuzunun (%30) etkinliği, genç yumurta tavukları ve etlik piliçleri içeren 2 deneme sırasında S. Enteritidis ile aşılardan 3 gün sonra değerlendirilmiştir. İncelenen parametreler çekum ve iç organ kolonizasyonlarıydı. Sonuçlar, kaplanmış butirik asidin, her iki denemede de S. Enteritidis kolonizasyonunu azaltmada kaplanmamış butirik asitten daha üstün olduğunu göstermiştir (Van Immerseel ve diğerleri 2005a, 2007). Foster (2001), in vitro olarak organik asitlerin, karmaşık bir pH homeostaz induksiyonu süreci yoluyla *Salmonella* spp'deki asit direncini belirlediğini göstermiştir. Gerçekten de, S. Typhimurium için kısa zincirli yağ asitlerine (SCFA) maruz kalmanın asit direncini artırarak bu patojenin virülansını bir dereceye kadar artırdığı daha önce gösterilmişti (Kwon ve Ricke 1998; Sirsat ve diğerleri 2009). Bir asit toleransı yanıtının uyarılması, orta derecede düşük pH'lı bir ortamda aside duyarlı mikroorganizmaların büyümesini içerir. Bu, daha sonra türler, normalde ölümcül olarak kabul edilen asidik koşullara aniden maruz kaldığında hayatta kalmaya yol açar ve böylece *Salmonella* spp'yi organik asitlerin etkilerine karşı korur (Ricke 2003). Ayrıca, Van Immerseel ve diğerleri (2006) SCFA'nın *Salmonella* spp'nin istilacı fenotipini düzenleyebileceğini ve *Salmonella* 'nın SCFA ile ön inkübasyonunun asit direncini ve makrofajlarda hayatta kalma oranını artırdığını gösterdiler. Aynı yazarlar, orta zincirli yağ asitlerinin *Salmonella* spp'ye karşı SCFA'dan daha fazla bakteriyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Sonucunu göz önünde bulundurarak Durant ve diğerleri (2000), konakçı doku istilaları için gerekli olan SPI-1, hilA ve invF'nin 2 transkripsiyonel düzenleyicisinin ekspresyonunu değerlendirdiler. pH 6'da SCFA konsantrasyonları artırılarak *Salmonella* spp'nin büyüme hızları azaldı, ancak pH 7'de aynı şey olmadı. pH'a bağlı induksiyon yöntemi, SCFA'nın konakçı hücrelere girişinin gerekli olduğunu ileri sürmüştür; bu yağ asitleri muhtemelen kümes hayvanlarının GIT'inde istila genlerinin ifadesini tetikleyen çevresel bir sinyal olarak hizmet etmektedir.

Uçucu yağlar. Uçucu yağların (EO) in vivo veya in vitro olarak hayvan yemlerinde aktif antimikrobiyal bileşen olarak kullanılması olasılığı üzerine şimdiye kadar yapılan birçok çalışma, elde edilen sonuçlarda yüksek

potansiyeline ve aralarında antimikrobiyal aktivitenin de bulunduğu olası etki biçimlerine ilişkin bir genel bakış, yakın zamanda Brenes ve Roura (2010) tarafından yayınlanmıştır.

EO, "izole edilecekleri bitki materyallerinin aromatik özelliklerine göre adlandırılan kokulu, uçucu bileşiklerin bir karışımıdır" (Lee ve diğerleri 2004). EO'ların Gram-pozitif bakterilere karşı Gram-negatif bakterilere nazaran daha aktif olduğu hâlihazırda bilindiğinden, sinmaldehitin (tarçıdan elde edilir) L. acidophilus ve B. longum'u orta derecede inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (Lee ve Ahn 1998). Bu, gastrointestinal mikroflora üzerinde istenmeyen bir etkinin varlığını düşündürülebilir. Bununla birlikte, Lee ve diğerleri (2004), sinmaldehitin patojenik bağırsak bakterileri üzerinde gösterdiği seçici inhibisyonun, bağırsak mikroflorasını dengelemede farmakolojik bir rolü olabileceğini ileri sürmüştür. Ek olarak, Ouwehand ve diğerleri (2010), potansiyel olarak faydalı bakterilerin (Bifidobacterium spp gibi) in vitro test edilen EO'ların çoğuna dirençli veya sadece bir miktar duyarlı olduğunu göstermiştir. Aksine, bu yazarlar L. fermentum veya B. breve'nin büyümelerinin birkaç EO tarafından uyarıldığını kanıtladılar (Ouwehand ve diğerleri 2010).

Helander ve diğerleri (1998), ardından Cosentino ve diğerleri (1999), in vitro çalışmalar sırasında S. Typhimurium'a karşı 3 farklı EO için minimum inhibitör konsantrasyonlarını (ppm) değerlendirdiler. Carvacrol (keklikotundan ve kekikten elde edilmiştir) sırasıyla 150 ve 225 ppm değerlerini gösterdi, sinmaldehit 396 ppm seviyesini gösterdi (Cosentino ve diğerleri 1999 tarafından herhangi bir değer verilmedi) ve timol (yaygın kekikten elde edilmiştir) sırasıyla 150 ve 56 ppm değerlerini gösterdi. O'Bryan ve diğerleri (2008), disk difüzyon testini kullanarak portakal EO'larının *Salmonella* spp'ye (S. Enteritidis ve S. Typhimurium dahil) karşı antimikrobiyal aktivitesini bildirmiştir. En etkili portakal EO'lar temel olarak d-limonen (%94) ve mirsen (yaklaşık %3)'den oluşuyordu. Ayrıca, Johny ve diğerleri (2008), tarçıdan elde edilen ve muhtemelen tavuk içme suyuna eklenebilecek güvenli bir bileşen olan trans-sinmaldehitin S. Enteritidis'e karşı in vitro etkinliğini göstermiştir. Chao ve diğerleri (2000), tarçıdan ekstrakte edilen uçucu yağların hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir. Ouwehand ve diğerleri de (2010) aynımsı gösterdi. Aralarında S. Infantis, S. Enteritidis ve S. Typhimurium'un da bulunduğu çeşitli bakteri türlerinin büyümesini in vitro olarak inhibe etme yeteneği açısından 13 farklı uçucu yağı değerlendirdiler. Maksimum EO seviyesi (500 mg/L) kullanıldığında 3 serotipin tümü önemli ölçüde inhibe edildi. Bunlara karşı en etkili EO'lar karvakrol, sinmaldehit, sitral ve timol idi.

Ordenez ve diğerleri (2008), ticari üretim katmanlarında öjenolün (karanfilden elde edilir) bağırsak ve sistemik enfeksiyonların temizlenmesine yardımcı olduğu ve böylece sofralık yumurtaların S. Enteritidis çapraz kontaminasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığı sonucuna varmıştır. Son olarak, Vicente ve diğerleri (2007), deneysel bir S. Enteritidis enfeksiyonunda kapsaisin (acı biberden elde edilir) profilaktik etkisini yumurta tavuklarında gözlemlemiştir (Tablo 2).

EO'ların gıda kaynaklı patojenlere karşı etkinliği, aktif moleküle, hedeflenen patojene bağlıdır, ancak EO'ların kimyasal bileşiminin belirli bir bitki türü için büyük ölçüde değişebileceği belirtilmelidir. Bu, bitki açısından coğrafi kökene ve bir yıl veya hatta bir gün içindeki hasat süresine bağlıdır. Bu, bir deneyden diğerine elde edilen sonuçların değişkenliğinin muhtemel bir açıklaması olabilir. Ayrıca, bütün EO'lar, ana izole bileşenlerinden daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olabilir. Örnek olarak, sarımsak yağının alil kükürt bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesinin her ilave kükürt atomu ile arttığı gösterilmiş,

bu da etkinin farklı bileşimler arasındaki sinerjinin bir sonucu olduğunu düşündürmüştür. Bu nedenle sarımsak yağının antimikrobiyal aktivitesi, ana bileşimlerinin bireysel aktivitesinden daha güçlü olabilir (Calsamiglia ve diğerleri 2007). Gıda kaynaklı bir patojenin EO'lara karşı direnç geliştirme olasılığı mevcuttur. Ultee ve diğerleri (2000), *B. cereus*'un carvacrol'e karşı duyarlılığında bir azalma gözlemledi. Bu azalmanın nedeninin, öldürücü olmayan karvakrol konsantrasyonlarının varlığında bu patojenin büyümesi olduğuna inanılıyordu. Bununla birlikte, EO'lara karşı direnç geliştirme riski halen oldukça nadirdir (Sirsat ve diğerleri 2009). EO ilaveli rasyonların koku ve lezzetinde bir değişiklik meydana gelmesi olasılığını göz önünde bulunduran Windisch ve diğerleri (2008), hâlihazırda EO'lar içeren bir dizi botanik olan fitojenik yem katkı maddelerinin kullanımının, yem aromasını iyileştirdiğini ve tavuk üretim performansını artırdığını ileri sürdüler. Bu, EO'ların yemin organoleptik özelliklerini olumlu bir şekilde değiştirebileceğine dair potansiyel bir sonuca yol açmaktadır; bu nedenle yeme bakımından herhangi bir azalma meydana gelmemelidir.

Bakteriyosinler. Bakteriyosinler, bazı bakteriler tarafından üretilen ve diğer yakından ilişkili bakterilere karşı etki eden proteinlerdir. Bakteriyosin ailesi, boyut, mikrobiyal hedef ve etki şekli bakımından farklılık gösteren çok çeşitli proteinleri içerir. Bunlar iki ana gruba ayrılabilir: Gram pozitif bakteriler tarafından üretilenler ve Gram negatif bakteriler tarafından üretilenler (Gordon ve diğerleri 2007; Heng ve diğerleri 2007).

Bakteriyosinlerin çoğu, ribozomal kökenleri ve büyük özgüllükleri ile klasik antibiyotiklerden farklıdır (Riley ve Wertz 2002a, 2002b). Bakteriyosinler, doza ve saflaştırma derecesine, patojenin fizyolojik durumuna (büyüme fazı) ve deneysel koşullara bağlı olarak hassas patojenler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik bir etki moduna sahip olabilir. Bakteriyosinlerin çoğu zar geçirgenliğini kullanır veya hücre ölümüne neden olmak için gerekli enzimlere müdahale eder (Peschel ve Sahl 2006; Pithva ve diğerleri 2011). Örneğin nisin, peptidoglikan monomerlerinin hidrofobik bir taşıyıcısı olan nihai hücre duvarı öncüsü lipid II ile bir kompleks oluşturur (Dias Paiva ve diğerleri 2011). Ayrıca, bu bileşiği, bakteri hücre duvarı biyosentezinin inhibisyonuna yol açan gözenek oluşturma aktivitesi için bir kenetlenme molekülü olarak kullanır. Ek olarak, nisin, amino asitler ve nükleotidler gibi iyonların veya sitoplazmik çözünen maddelerin hızlı bir şekilde dışarı akışını indükleyebilir. Sitoplazmik zarın eş zamanlı depolarizasyonu, tüm biyosentetik süreçlerin anında sonlandırılmasını ortaya koymaktadır (Wiedemann ve diğerleri 2001).

Antimikrobiyaller olarak bakteriyosinler, gıda koruyucuları veya yem katkı maddeleri olarak kullanılabilir. Bundan sonra sadece yem katkı maddeleri üzerine odaklanacağız.

Bakteriyosinler, antik çağlardan beri yenen yiyeceklerin çoğunda mevcut oldukları düşünüldüğünden, antibiyotiklerin aksine genellikle daha doğal kabul edilir (Cleveland ve diğerleri 2001). Ayrıca bakteriyosinler laktik asit bakterileri tarafından üretilmekte olup, insan sağlığına faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Joergers 2003). Bu nedenle, gıda üreten hayvanlarda risksiz olarak kullanılabilirler, uygulamaları tüketicinin doğal gıda ürünlerine yönelik talebi ile tutarlıdır.

Gram-negatif bakteriler, bakteriyosinlere Gram-pozitiflerden daha az duyarlıdır. Bununla birlikte, kolisinden daha küçük olan mikrosinler - *Escherichia coli* suşları tarafından üretilen bakteriyosinler - Gram negatif bakterileri inhibe etme kapasitesine sahiptir (Diez-Gonzalez 2007). Örneğin Microcin J25, *S. Enteritidis* de dahil olmak üzere *Salmonella* spp.'ye karşı aktiftir (Portrait ve diğerleri 1999). Microcin J25, sindirim proteazlarına karşı oldukça dirençlidir ve yemle yutulduğunda gastrointestinal mikrobiyotayı etkileyebilir (Galvez ve diğerleri 2010). Öte yandan, kimotripsine duyarlı bir mikrosin J25 varyantı, diğer engellerle birlikte bir gıda koruyucusu olarak kullanılabilir (Pomares ve diğerleri 2009). Line ve diğerleri (2008) in vitro (nokta testi) enterokoklar (bir enterosin) tarafından üretilen bir bakteriyosinin (E-760) güçlü antibakteriyel özelliklerini, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* dahil olmak üzere geniş bir gıda kaynaklı Gram-negatif veya Gram-pozitif patojenlere karşı

göstermiştir. Svetoch ve diğerleri (2008) laktik asit bakterilerinin sayımının hem tedavi edilen hem de tedavi edilmeyen grupların çekumunda önemli ölçüde farklı olmadığı halde, tavuk yeminde bakteriyosin E 50-52'nin oral yoldan uygulanmasının, çekum seviyesinde ve ayrıca karaciğerde ve dalakta önemli bir *S. Enteritidis* azalması ile sonuçlandığını gözlemlediler. Bu nedenle, tavuklar için elde edilen sonuçların yumurta tavuklarına da uygulanabilmesi beklenmektedir.

Bakteriyosinlerin etki biçimleri karmaşıktır ve tam olarak anlaşılmamıştır. Çoğu, hassas bakterileri inhibe etmek veya öldürmek için farklı şekillerde hareket eder (Rossi ve diğerleri 2008). Antimikrobiyal peptitlere direnç gösteren patojen suşlarının geliştirilmesinin imkânsız olmasa da zor olarak görülmesinin nedeni budur (Hancock ve Chapple 1999; van't Hof ve diğerleri 2001). Bununla birlikte, Lin (2009) ve Sirsat ve diğerleri (2009), hedef bakteri hücre yüzeyi reseptörlerinin değiştirilmesi yoluyla bakteriyosinlere (nisin) karşı gerçek dirençten bahsetmiştir.

Bakteriyosinlerin maliyetini herhangi bir üreticinin karşılayabileceği bir fiyata düşürmek için Lin (2009), üretim sürecinde bir iyileştirmenin gerekli olduğunu düşünmektedir. Ek olarak, Gaggia ve diğerleri (2011), bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin kullanımının, maliyeti de göz önüne alındığında, saflaştırılmış bakteriyosinlerin tek başına kullanılmasından daha fazla avantaja sahip olacağını öne sürmüşlerdir. Saf bakteriyosinlerin gıdalara uygulanması, gıda bileşenlerine bağlanabildikleri için düşük etkinlik gösterebilir.

Bakteriyosinlerin kullanımıyla elde edilen umut verici sonuçlara rağmen, bakteriyosin kombinasyonları veya bakteriyosinler ile diğer uygulamalar arasındaki ilişkiler hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Kontamine Kabuklu Yumurta Tüketimi Nedeniyle Salmonelloz Riskini Azaltmaya Yönelik Hasat Sonrası Yöntemler

Kabuklu yumurtaların depolanması ve *Salmonella* 'nın büyümesinin ve çoğalmasının önlenmesi

Mikrobiyal büyümeyi sınırlandırabilecek sıcaklıklara hızlı soğutma, kontamine yumurtaların *S. Enteritidis*'i insanlara bulaştırma olasılığını azaltmak için bir yaklaşım olarak önerilmiştir (Gast ve Holt 2000).

2000 yılında, FDA Federal Kayıt'ta, önerilen maksimum 7,2 °C (45 °F) ortam sıcaklığının yumurtanın *S. Enteritidis*'e karşı doğal savunmasının etkinliğini artıracak ve bu gıda kaynaklı patojenin büyüme hızını yavaşlatacağını belirten nihai bir kural yayınladı (65 FR 76092) (FDA 2000). Nihai Yumurta Kuralında (FDA 2009a), bu maksimum değer sadece depolama sırasında değil, aynı zamanda yumurtlama zamanından 36 saat sonra başlayarak nakliye sırasında da uygulanması gerektiği belirtildiği için bu öneri sürdürülmüştür. İstisna olarak, kabuklu yumurtalar, sonraki bir işleme aşamasına yönlendirilirse, ancak 36 saatten fazla olmamak kaydıyla, ortam sıcaklığı değerlerinde (7.2° C'nin üzerinde) saklanabilir. Bununla birlikte, bu prosedür pastörizasyon kullanımı kadar verimli kabul edilmediği için (*S. Enteritidis*'in 5 log azalmasını sağlar) iyonlaştırıcı radyasyon kullanılırken bile (*S. Enteritidis*'in sadece 2 ila 3 log azalmasına neden olur) soğutma yapılmalıdır (FDA 2009b).

Kanada'da, kabuklu yumurtalar ve bir işleme istasyonuna gönderilenler, buzdolabında saklanmalı veya 20 °C veya daha düşük depolama sıcaklıklarında en fazla 6 gün veya 20 °C ile 30 °C arasındaki sıcaklıklarda maksimum 2 gün saklanmalıdır (Health Canada 2011).

589/2008 sayılı AT Komisyonu Tüzüğü, “[...] yumurtaların sabit bir sıcaklıkta saklanması ve nakledilmesi gerektiğini ve genel olarak nihai tüketiciye satılmadan önce soğutulmaması gerektiğini [...]” belirtmektedir (EC 2008). Bununla birlikte, yumurta içindeki *Salmonella* spp büyümesinin depolama sıcaklığından etkilendiği gösterilmiştir.

Bu alanda yapılan araştırmalar, özellikle *S. Enteritidis*'in yatay bulaşma riskinin artması ve daha sonra kabuklu yumurtaların içinde büyüme ve çoğalma kapasitesi nedeniyle ortam sıcaklıklarının kabuklu yumurtaların depolanması için uygun olmadığını kanıtlamıştır. Martelli ve Davies (2012), kabuklu yumurtaların depolanması için sıcaklık değerlerinin 20 °C'yi geçmemesi gerektiğini öne sürmüşlerdir. Yumurta akında *Salmonella* spp 20 °C'de gelişebilirken 10 °C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişemez, bu nedenle yumurtaların optimal depolanması için sıcaklık değerinin bu son değeri aşmaması gerekmektedir. *S. Enteritidis* gibi gıda kaynaklı patojenler, oda sıcaklığında (20 °C) doğal olarak kontamine olmuş yumurtaların içeriğinde gelişebilir ve yumurta içeriğinin renginde, kokusunda ve kıvamında değişikliğe yol açmaz. Bununla birlikte, saklanan yumurtalarda *S. Enteritidis*'in çoğalması, bakterinin yumurta sarısına istila etmesine veya ondan besin elde etmesine olanak sağlayan yumurta sarısı zarının değişmesiyle ilişkili görünmektedir (Humphrey ve Whitehead 1993). Cogan ve diğerleri (2001) 2 CFU kadar az bir miktarla kabuğa yakın yumurta akı içinden aşılana bütün yumurtaların %7'sinde 20 °C'de 8 gün sonra *S. Enteritidis* büyümesini bildirmiştir. Akabinde yumurtalar 20 °C'de depolandığında inokulumun 25 CFU/yumurtaya eşit olması veya bunu aşması halinde ya da yumurtalar 30 °C'de depolandığında inokulumun 250 CFU/yumurtaya eşit olması veya bunu aşması halinde, yumurtada yüksek düzeyde *Salmonella* büyümesi, aşı dozunun daha küçük olduğu duruma kıyasla önemli ölçüde daha sık meydana gelmiştir (Cogan ve diğerleri 2001).

Chen ve diğerleri (2005) sofralık yumurtaların 4 °C, 10 °C ve 22 °C'de saklanmasını karşılaştırmışlardır. Yumurta akı 102, 104 ve 106 *S. Enteritidis* hücreleri ile aşılanaştır. 22 °C'de, incelenen tüm inokulum konsantrasyonları için, *S. Enteritidis* büyüebilmiş, 4 °C ve 10 °C'de ise, kullanılan ilk konsantrasyonlardan bağımsız olarak büyümesi engellenmiştir. Yazarlar, 4 °C ve 10 °C'de saklamanın yumurtaların yaşlanma sürecini ertelediğine, albüminin antimikrobiyal ajanlarını koruduğuna ve vitellin zarının bütünlüğünü koruduğuna inanmaktadır.

Gast ve Holt (2000), 3 güne kadar bir süre boyunca farklı sıcaklıklarda az sayıda *S. Enteritidis*'in ne kadar daha tehlikeli seviyelere gelebileceğini belirlemişlerdir. Amaçları, yumurtlamayı takiben ve yumurtalarda daha fazla mikrobiyal büyümeyi önleyebilen iç sıcaklıklara ulaşılmadan önce *S. Enteritidis* çoğalması için potansiyel fırsatları teşvik etmekte. Elde ettikleri sonuçlar, *S. Enteritidis*'in yaygın çoğalmasının daha düşük inokulum dozunda (15 CFU *S. Enteritidis* içeren 0.1 mL), daha kısa saklama süresinde (1 gün) ve daha düşük sıcaklıklarda (10 °C ve 17.5 °C) daha az sıklıkla gözlemlendiğini göstermiştir. 25 °C'de, daha yüksek aşı dozu (150 CFU *S. Enteritidis* içeren 0.1 mL) ve daha uzun saklama süresi (2 ve 3 gün) ile gıda kaynaklı patojende hızlı ve önemli bir çoğalma meydana gelmiştir. 4 tip numune kullandıkları için aşılama bölgesi *S. Enteritidis* çoğalmasını büyük ölçüde etkilemiştir: yumurta sarısı (içten aşılanaştır), yumurta akı, yumurta akının kenarında aşılanaştır tam yumurta ve sarı yüzeyinde aşılanaştır

tam yumurta. Yumurta sarısında, *S. Enteritidis* sayıları 25 °C'de 8,7 log₁₀/mL'ye ulaşarak, sadece 2 günlük depolamadan sonra hızla çoğalma gerçekleşmiştir. Aksine, albüminin bakteriler için iyi bir büyüme ortamı olmadığı doğrulanmıştır, çünkü *S. Enteritidis* seviyeleri depolama sırasında sadece küçük bir değişiklik geçirmiştir. Yumurta sarısı yüzeyine aşılanaştır bütün yumurtalar, depolama sırasında (doz ve saklama süresi ve sıcaklığı ne olursa olsun) artan seviyelerde *S. Enteritidis* sergilemiştir, diğer bütün yumurta kategorisi ise (yumurta akı kenarına aşılanaştır) bu seviyelerde sadece hafif bir değişiklik ortaya koymuştur (Gast ve Holt 2000). Albüminde biriken *Salmonella* hücrelerinin yumurta sarısına ulaşmak ve böylece hayatta kalmak ve büyümek için gerekli olan bir besin havuzuna erişmek amacıyla yumurtada, yumurtlama sonrası vitellin zara göç edebildiğine ve içinden geçebildiğine inanılmaktadır (Baron ve diğerleri 1997; Gantois ve diğerleri 2009). Braun ve Fehlhaber (1995), *S. Enteritidis*'in yumurta akından yumurta sarısına göçünü incelediler. Yumurta akı (10 ila 200 bakteri hücresi/yumurta akı) üzerine farklı dozlarda *S. Enteritidis* PT 4 aşılanaştır. Depolama 7, 12, 20 ve 30 °C'de 4 hafta süreyle yapıldı. Sonuçlar, *S. Enteritidis*'in depolama sırasında yumurta akından yumurta sarısına geçebildiğini gösterdi. Yumurta sarısına nüfuz etme riski 7 ve 12 °C'de nispeten düşüktü. Ancak 14 gün sonra 7 °C'de ilk pozitif yumurta sarısı bulundu. 20 ve 30 °C'de, ilk pozitif yumurta sarısı 1 veya 2 gün sonra çoktan mevcuttu. Schoeni ve diğerleri (1995) ayrıca, < 10 °C sıcaklık değerlerinin, aşı boyutu ne olursa olsun, aşılanaştır yumurtalarda *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* ve *S. Typhimurium*'un sporadik büyümesine izin vermeyeceğini gözlemlemiştir.

Daha önce, Hammack ve diğerleri (1993), yapay olarak aşılanaştır kabuklu yumurtalarda *S. Enteritidis*'in büyümesinin, 16 güne kadar soğutulanaştır yumurtalarda göz ardı edilebilir düzeyde olduğunu göstermişti. Aksine, aynı süre boyunca saklanan soğutulanaştır yumurtalarda bu gıda kaynaklı patojenin popülasyon seviyesi 8 log₁₀ birimden fazla artmıştır. Lock ve Board (1992), aralarında *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Infantis*'in de bulunduğu farklı *Salmonella* serotiplerini yumurta akına aşılarken, in vitro kalıcılıklarının 3 farklı sıcaklıkta depolama sırasında farklı olduğunu gözlemlediler: 4, 20 ve 30 °C. Serotiplerin çoğu canlı kaldı ancak 42 gün boyunca 20 ve 30 °C'de sayıları artmadı. 4 °C'de serotiplerin çoğu öldü. 20 °C'de, 39 CFU/mL-1 albümin ile aşılama üzerine, hem *S. Enteritidis* hem de *S. Enteritidis* olmayan suşlar, 3 haftalık bir depolama süresi boyunca > 106 CFU/mL-1'e kadar ayrı taze yumurta akı numunelerinde büyüebildi (Messens ve diğerleri 2004; Clavijo ve diğerleri 2006). Yumurta akında *S. Enteritidis*'in hayatta kalmasının, nükleik asit ve amino asit metabolizması tarafından düzenlendiği ve ayrıca hücre duvarı yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünde yer alan genlerle ilgili olduğu görülmektedir (Clavijo ve diğerleri 2006). İnkübasyon süresinin uzatılması ve saklama sıcaklığının artırılmasıyla, belirgin büyüme gösteren numunelerin sayısı daha da artmaktadır. Ayrıca, oda sıcaklığına yakın (yaklaşık 20 °C), depolanması bütün bir yumurtadan ziyade taze bir yumurtanın akının *Salmonella* ile kontamine olması durumunda, aşırı büyümenin meydana gelme olasılığı çok daha yüksektir. Yumurta içeriğinde az sayıda *S. Enteritidis* hücresi mevcut olsa bile, yumurtalarda *Salmonella* üremesini önlemek için yumurtlamadan kısa bir süre sonra soğutma uygulamaları yapılmalıdır (Messens ve diğerleri 2004).

Yumurta sarısı yüksek kaliteli besinlerin çok önemli bir kaynağıdır, bu nedenle sıcaklık izin verdiğinde bu bölgede *Salmonella* 'nın hızlı büyümesinin gerçekleşmesi beklenir. Deneysel olarak enfekte yumurta tavukları genellikle vitellin zar üzerinde *S. Enteritidis* biriktirir (Gast ve Holt 2001; Gast ve diğerleri 2007). *S. Enteritidis*'in hızlı büyümesi belirli

bir gecikmeden sonra meydana gelir, bu süre içinde vitellin zarın yapısı bozulur ve sonunda besinlerin yumurta akına sızmasına neden olur. Bu, yumurta sarısına *S. Enteritidis*'in daha fazla göçünü ve burada çoğalmasını artırır (Humphrey ve Whitehead 1993). İlk büyüme aşaması potansiyel olarak demir rezervlerinin kullanımını içerir. Bu, 4 nesli desteklemek için yeterli görünüyor, ancak bu rezervler tükendiğinde, *Salmonella* hücreleri bir gecikme aşamasına girecek ve daha sonra bakteri hücrelerinin sayısına bir durgunluk olarak yansıyacaktır (Gantois ve diğerleri 2009). Kabuklu yumurtada *S. Enteritidis*'in birikme bölgesi, bu patojenin, soğutmanın büyüme engelleyen iç sıcaklık değerlerine ulaşmasından önce çoğalma derecesini etkileyebilir (Gast ve Holt 2001). 102 CFU *S. Enteritidis*, bozulmamış yumurta sarısının dış yüzeyine aşılandığında (vitellin zar), 6 saat inkübasyondan sonra numunelerin %10'unda, 25 °C'de 24 saat sonra numunelerin %75'inde ve 15 °C'de 72 saat inkübe edilen (104 CFU/mL ortalama seviyelerine ulaşan) numunelerin sadece %20'sinde yumurta sarısı içeriğinde çoğalma meydana gelmiştir. Daha sonra, Gast ve diğerleri (2006), in vitro *S. Enteritidis*'in yumurta sarısı zarına nüfuz etme sıklığı üzerinde soğutmanın etkisini test ettiler. Yaklaşık 100 CFU içeren 0.1 mL'lik bir süspansiyon ile yumurta sarısının sağlam dış yüzeyini inoküle ettikten sonra, vitellin zara bakteri tutunmasını kolaylaştırmak için numuneler 5 dakika oda sıcaklığında (24 °C) tutuldu. Daha sonra, bu numuneler farklı sürelerde (2 saat, 6 saat ve 24 saat) 30 °C'de tutuldu, ardından 18 ila 22 saat 7 °C'de soğutuldu. *S. Enteritidis*, 30 °C'de 2 saat sonra soğutulan kontamine yumurta numunelerinin %4'ünde, 30 °C'de 6 saat saklandıktan sonra soğutulan numunelerin %15'inde ve 30 °C'de 24 saat saklanan örneklerin %40'ında yumurta sarısı içeriğine nüfuz etti. Lublin ve Sela (2008), yumurta sarısına aşılardan *S. Enteritidis*'in 3,65 log CFU'luk bir ilk konsantrasyonundan, konsantrasyon, 6 °C'de aşılama sonrası ilk 2 hafta boyunca 1 log arttığını, ardından 8 haftaya kadar yaklaşık 4 logda sabit kaldığını gösterdiler. 25 °C'de, bakteri konsantrasyonları aşılama sonrası 4. haftaya kadar haftada 5 log'a yükseldi ve sonuna kadar 8 ila 9 log'da kaldı.

Avrupa'nın farklı ülkelerinde, pazar yerinde yumurtaların soğukta saklanması yasaklanmıştır. Sebebi ise soğuk hava deposunda saklanan yumurtaların artık "taze" sayılmayacağı düşüncesiyle ilgilidir. Öte yandan tüketicilere satın aldıkları sofralık yumurtaları tüketilene kadar buzdolabında saklamaları tavsiye edilmektedir (FDA 2009b). Bu durumun pratik yönleri bir ülkeden diğerine farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, bilimsel veriler, soğutmanın, gıda kaynaklı insan salmonellozunun dünya çapında ana nedeni olan *S. Enteritidis* için kontamine sofralık yumurtalarının bir araç haline gelme riskini büyük ölçüde azalttığını açıkça kanıtlamaktadır.

Yumurta kabuğundan *Salmonella* spp. nüfuzu ve yumurta içeriğinin daha fazla kontaminasyonu riskini azaltmak için dekontaminasyon yöntemleri

Son yıllarda, *Salmonella* 'ya odaklanarak, kabuklu yumurtaların mikrobiyal dekontaminasyonu için farklı yöntemler incelenmiştir. Kabuk dekontaminasyonu için test edilen prosedürleri, daha sınırlı, ayrıca kabuk içinde aktif olanlardan ayırt edebiliriz. Ayrıca, birinci kategori ile ilgili olarak, prosedürler 3 sınıfa ayrılabilir: kimyasal, fiziksel ve biyolojik prosedürler (Tablo 3).

Şu anda ABD'de FDA veya USDA tarafından birkaç prosedür onaylanmıştır ve ayrıca kabuklu yumurta işleme tesisleri için ticari olarak kullanılabilir durumdadır. Hiçbiri mükemmel olmadığından, yeni prosedürler de ortaya çıkabileceği için bunlar sürekli olarak geliştirilmektedir. Bununla birlikte, iyileştirme ihtiyacı sürekli ve araştırmalar, yumurtaların duyuşal, reolojik ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkilerine ve dekontaminasyon yapıldıktan sonra tüketiciler tarafından kabul edilebilirliğine daha fazla odaklanmalıdır. Ayrıca, yeni bir yöntem ortaya çıktığında, tam ölçekli bir üretim üzerinde verimli bir

Tablo 3 - *Salmonella* ile kontamine yumurtalardan kaynaklanan salmonelloz riskini azaltmak için hasat sonrası kontrol prosedürleri olarak kabuklu yumurta yüzey dekontaminasyonu yöntemleri.

Kimyasal yöntemler
Yıkama (dezenfektan kullanımı)
Hidrojen peroksit
Elektrolize su
Ozon
Fiziksel yöntemler
Işınlama
Mikrodalga teknolojisi
Ultraviyole ışık teknolojisi
Atımlı ışık teknolojisi
Gaz plazma teknolojisi
Ultrason
Biyolojik yöntemler
Bitki özleri

uygulama yapılmadan önce araştırma yine bir zorunluluk olacaktır.

Yumurta yıkama. AB'de yumurta yıkama şu anda yasaklanmıştır (aynı istisnalar dışında - daha fazla araştırınız) ama bu konu her zaman sıkı bir tartışmaya konu olmaktadır (Nys ve Van Immerseel 2009). Bu bölümde, asıl amacı *Salmonella* spp.'yi azaltmak veya ortadan kaldırmak olan farklı prosedürleri gözden geçireceğiz. Etkili olarak kabul edilebilmesi için, bir dekontaminasyon prosedürünün en az 5 log CFU/yumurta kabuğu-1 azalmasına yol açması gerekir, aksi takdirde ortaya çıkan kabuklu yumurtalar, yumurta güvenliği açısından uygun görülmez (FDA 2009b). Yumurta yıkama şu anda ABD, Kanada, Avustralya ve Japonya'da bakteri kontaminasyonunu azaltmak ve bakterilerin yumurta içeriğine nüfuz etmesini önlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca ABD'de yumurta yıkamayı soğuk depolama takip etmektedir.

A sınıfı sofralık yumurtaların yıkanması AB'de yasaklanmıştır, ancak kafes dışı yumurta üretimindeki artışın ardından halen tartışılmaktadır. Ayrıca, Haziran 2003'te yumurtaları yıkamak için paketleme merkezlerine yetki veren Üye Devletler, bu paketleme merkezlerine yumurta yıkama yetkisi vermeye devam edebilir, ancak yumurtalar yalnızca böyle bir izin verildiği Üye Devletlerde pazarlanabilir (EC 2007). Örneğin, İsveç'te, yıkama uygulaması son 40 yıldır kullanıldığından ve tüketiciler yıkanmış yumurtaları tercih ettiğinden, çok sayıda sağlayıcının bunu yapmasına izin verilmektedir (Hutchison ve diğerleri 2003). ABD'de, belirli yumurta yıkama işlemine ilişkin FDA tarafından sağlanan belirli yönergeler yoktur. Ancak FDA, Gıda Hizmeti ve Denetim Hizmetinin (FSIS) şirketlere ve yerel üreticilere, kabuklu yumurtaların temizlenmesi ve lekedden arındırılması sırasında ne tür kimyasalların kullanılmasına izin verildiğine ilişkin genel bilgiler sunmaktadır. Genellikle, Genel Olarak Güvenli (GRAS) olarak kabul edilenler listesinde yer alan bileşikler, kabuklu yumurtaları temizlerken herhangi bir sınırlama olmaksızın kullanılabilir. Bunlar, Federal Düzenlemeler Kanunu (CFR), Başlık 21, bölüm 178 ila 186'da "gıda katkı maddeleri" genel terimi altında belirtilmiş ve açıklanmıştır. Bununla birlikte, bu "gıda katkı maddelerinin" birçoğu için sınırlardan bahsedilmiştir ve özellikle GRAS olarak onaylanan dolaylı gıda maddeleri için gıda katkı maddesi düzenlemelerinin izin verdiği şekilde izin verilen maksimum konsantrasyonlar açıklanmış ve bunlara uyulması tavsiye edilmiştir (CFR 2012a).

CFR Başlık 7, bölüm 56.76'da, kabuklu yumurta sınıflandırma ve paketleme tesisleri için minimum tesis ve işletme gereksinimleri açıklanmaktadır, (f) maddesinde kabuklu yumurta temizleme işlemleri açıkça belirtilmiştir. Yıkama suyunun sıcaklığının 90 °F (32,2 °C) veya üzerinde tutulması ve yıkanacak yumurtaların iç sıcaklığından en az 20 °F (6,7 °C) daha sıcak olması gerektiği belirtilmektedir. Bu değerler tüm temizleme döngüsü boyunca korunacaktır. Güvenlik nedeniyle, sıhhi koşulları korumak için yıkama suyunun yaklaşık 4 saatte bir veya gerekirse daha sık değiştirilmesi gerekir ve her vardiya sonunda

zorunludur. Ayrıca yumurta yıkama işlemi sırasında köpürmeyi önlemek için özel önlemler alınmalıdır. Temizleme döngüsü sırasında yedek su ilavesi zorunludur ve sürekli olarak yapılmalıdır. Yedek su, yıkama için kullanılan bileşikle uyumlu olmaları koşuluyla, klor veya kuaterner bileşiklerin kalıntıları içerebilir. Durulama için iyotlu sterilizasyon suyunun kullanılması yasaktır (CFR 2012b). Ayrıca güvenlik amacıyla, kabuklu yumurta temizleme döngüsü sırasında sadece içme suyu kullanılabilir ve su kaynağının demir konsantrasyonunun analizi zorunludur. Demir içeriği 2 ppm'yi aştığında, izin verilen maksimum seviyeye düşürülmeli ve su kaynağı her değiştirildiğinde yeni testler yapılmalıdır. Atık su, boruları vasıtasıyla direkt olarak kanalizasyona atılır. Yıkama işleminin türü ve kullanılan ekipman dikkate alınarak yumurtaların suda bekletilmemesi veya ıslatılmaması gerektiği belirtilmektedir, bu nedenle daldırma tipi yıkayıcıların kullanılması yasaktır. Yıkanan yumurtalar, yıkama suyunun sıcaklığına eşit veya ondan daha sıcak bir sıcaklığa sahip su ile püskürtme yoluyla durulabilir. Durulama suyunun ulusal denetçi tarafından onaylanmış bir dezenfektan içermesi gerektiği belirtilmiştir. Yumurta yıkama prosedürünün başlıca avantajları şunlardır:

- kabuk yüzeyindeki mikrobiyal yükün azaltılması, özellikle *Salmonella* spp olmak üzere gıda kaynaklı patojenlerin varlığı ile ilişkili riski en aza indirmeye.
- yıkama adımından sonra antibakteriyel etkilerini göstermeye devam eden farklı kimyasallar hala mevcut olabileceği için yıkamadan sonra daha fazla azalmanın meydana gelmesi;
- diğer gıdaların çapraz bulaşma riskinin azalması;
- kabuğun kendisinin zarar görmemesi koşuluyla, yumurta içeriğinin kontaminasyon riskinin azalması.

Ana dezavantaj, bu uygulamanın yumurtanın fiziksel bariyerinde, özellikle de kütükülde neden olabileceği potansiyel hasardan kaynaklanmaktadır (EFSA 2005). Kütükülün bakteriyel kontaminasyona karşı ilk savunma olduğu herkes tarafından bilinmektedir (Board ve Halls 1973).

Yumurta yıkama işleminde, etkili bir dekontaminasyon belirlemek için su veya kimyasallar (dezenfektanlar) içeren solüsyonlar kullanılır. Yumurta kabuğunu dekontamine etmek için kullanılan farklı kimyasalların, fiziksel bariyer bileşenleri ile etkileşime girebileceğine inanılmaktadır. Yıkama suyunda kullanılan kimyasalların türüne bağlı olarak yumurta kabuğu yüzeylerinde farklı mikroyapısal değişiklikler oluşabilmekte ve yumurta kabuğu yüzeyleri ne kadar hasarlıysa bakteri nüfuzuna o kadar fazla izin verebilmektedir (Kim ve Slavik 1996). Farklı çözeltilerin kabiliyetlerini araştırmak için yapılan bir çalışmada, 7,5 bir kuaterner amonyum bileşiği (pH 7.5) ve NaOCl (aynı pH değeri), yumurta kabuğunda herhangi bir değişiklik olmaksızın bakteri nüfuzunu azaltmayı başarırken, Na₂CO₃ (pH 12) yumurta kabuğu yüzeyini değiştirerek bakteriyel yeniden kontaminasyona olanak vermiştir (Wang ve Slavik 1998). Bununla birlikte, yıkama suyunda dezenfektan kullanılmadan, yumurtaların 15.5 °C suda spreyle yıkanmasının, iç kabuk bakteri sayısını artırmadığı kanıtlanmıştır (Lucore ve diğerleri 1997).

Yumurta yıkama sırasında yüksek sıcaklık kullanılmasının yumurta kalitesinde değişikliklere yol açabileceği endişesi nedeniyle, mikrobiyal yükün azaltılmasının yanı sıra, bu noktaya yönelik çeşitli çalışmalar da hedeflenmiştir. Caudill ve diğerleri (2010), yıkama suyu sıcaklığının kabuk matrisindeki ortalama Haugh Birimi değerlerini, albümin

yüksekliğini, vitellin zar gücünü veya aerobik bakterileri önemli ölçüde etkilemediği, ancak dış kabuk yüzeylerindeki ortalama aerobik mikroorganizma sayısını etkilediği sonucuna varmıştır. Hatta pH'ı 10 ila 12 arasında tutulan soğuk suyla yapılan bir işlem, işleme sırasında ve sonrasında yumurtanın iç sıcaklığını düşürme, yumurtaların fiziksel niteliklerini geliştirme ve mikrobiyal kalitelerini iyileştirme potansiyeline sahiptir. Farklı sıcaklık şemaları kullanarak, Caudill ve diğerleri (2010) 2,98'den 3,12 log CFU/mL'ye bir azalma elde ettiler.

Jones ve diğerleri (2005) tarafından gerçekleştirilen 60 saniyelik bir maruz kalma süresi ile 6 sıcaklık şeması kullanan, pH'ı 10,5 ile 11,5 arasında tutan, 48,9 °C'de 200 ppm klor çözeltilisinin püskürtülmesinden ve 9 haftalık bir depolama ve sürekli numune alma periyodundan oluşan bir yıkama sonrası işlem içeren bir diğer araştırma da, kabuklarda ve zarlarda 2.3 log CFU/mL'den 2.87 log CFU/mL'ye kadar bir aerobik bakteri yükü ile sonuçlandı; *S. Enteritidis* ile deneysel olarak aşılana numunelerin %53,33 ila %61,8'i ise negatifti. Sonuç olarak, kabuklu yumurtaların başlangıçta 48.9 °C'de yıkanması, ardından 23.9 °C veya 15.6 °C'lik 2. yıkama sıcaklığının, 23,9 °C ve 15,6 °C kombinasyonunda yıkanan yumurtalara göre kabuk yüzeyinde daha az aerobik bakteri bulunmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Birkaç yıl önce, Hutchison ve diğerleri (2004), çeşitli işleme koşulları altında spreyle yıkanan *Salmonella* spp'nin kabuk yüzeyi sayılarına ve yumurta içeriğinde bakteri varlığına etkileri üzerine bir çalışma gerçekleştirdiler. Deneyler doğal koşulları taklit etti: tam bir yumurtlama döngüsü boyunca yürütüldüler, yumurtalar kütükül sertleşmesinden önce *S. Enteritidis* PT4 ve *S. Typhimurium* DT104 ile kontamine oldu. Ekipman üreticisi tarafından tavsiye edilen ve Hutchison ve diğerleri (2003) tarafından tartışılan aralıklar dahilinde standartlaştırılmış bir en iyi yıkama yönergeleri seti kullandılar. 3 g/L konsantrasyonda klor bazlı dezenfektan ve 25mL/L konsantrasyonda kuaterner amonyum bazlı dezenfektan olmak üzere 2 farklı yıkama kimyasalı kullandılar; yumurta yıkama işleminde 3 farklı adım kullanılmıştır: 44 °C'de, 138 kPa su akış basıncında ön yıkama; 44 °C'de ve 262 kPa su akış basıncında yıkama ve 262 kPa su akış basıncında 48 °C'de durulama, ardından 42 °C'de 2 dakika havayla kurutmadan oluşan son bir adım. Kullanılan su yumuşak, içilebilir ve 1,4 ppb demir konsantrasyonuna sahipti. Ek olarak, kayış hızı 111 cm/dk idi. Solüsyonda kullanılan farklı kimyasalların yumurta dezenfektanı olarak etkilerini araştırmayı amaçlayan bir başka çalışmada; ilk ticari dezenfeksiyon ürünü (pH 6.6), 43.3 °C'de 5 dakika boyunca suda kullanıldı ve yumurta kabuğu üzerinde mikrobiyal aerobik florada 4.27 log azalma belirlendi. İkincisi ise (pH 7.56) 10 dakika boyunca 25 °C'de suda kullanıldı ve 3.11 log'luk bir azalma belirlendi. 10 dakika boyunca 25 °C'de kullanılan üçüncü bir sodyum hipoklorit çözeltisi (100 ppm serbest klor içeren, pH 8.74), 3.08'lik bir log azalması ortaya koymuştur. 25 °C'de 10 dakika boyunca kullanılan sodyum hipoklorit ve ikinci çözeltinin (pH 8.4) bir kombinasyonu, 2.38'lik bir log azalmasıyla sonuçlandı. Yan etkiler göz önüne alındığında, birinci bileşik ayrıca artan bir gözenek boyutu gösteren bir kütükül erozyonu ortaya koymuş, ikincisinde ise kabuğun iç tabakası çok sayıda çatlak ve gözenek göstermiştir (Favier ve diğerleri 2000).

Standart yıkama prosedürleri setinden bir sapma şeklinde sofralık yumurta yıkamanın gıda güvenliği etkilerini değerlendirmek için, birkaç parametre değiştirildi. Çalışmalarının sonuçları, sıkı bir şekilde kontrol edilen en iyi uygulama koşullarına göre yürütüldüğünde, *Salmonella* spp ile kontamine olmuş yumurtaların yıkanmasının, kabuk yüzeyinden 5 log'dan fazla *Salmonella* spp sayısında bir azalma ile sonuçlandığını göstermiştir. Ayrıca bu, yumurta içeriğinin gıda kaynaklı patojen ile kontaminasyonuna yol açmaz.

Yıkama kimyasal bileşiklerinin konsantrasyonu, yıkama süresinin uzunluğu, su akışının azaltılmış basıncı ve yumurta tavuklarının yaşı, yumurta içeriğinin kontaminasyonunu etkilemiyor gibi görünmektedir. Ancak, yıkama ve durulama suyu sıcaklıklarının 34 °C'nin altına düşmesine izin verilirse, içerik kontaminasyonu riski artar.

Ticari işlemede, yumurtalar en sık olarak antimikrobiyal ajanlar olarak hareket eden klor ve klor içeren bileşiklerle durulanır. Ek olarak, yaygın olarak bulunurlar, nispeten düşük bir maliyete ve yüksek bir etkinliğe sahiptirler. Zeidler (2001a), optimal parametreler altında, ticari yumurta yıkamanın kabuk üzerindeki bakteri yükünün 2 ila 3 log₁₀ oranında azalmasına yol açabileceğini gözlemlemiştir. Yüksek düzeyde klor, yumurta kabuğunda biriken kalıntılardan dolayı yumurtaların kalitesi için zararlı olabilir (Bialka ve diğerleri 2004).

Hidrojen peroksit. Hidrojen peroksit (H₂O₂) biyolojik sistemlerdeki bakterisidal etkilerden sorumludur. Toksikitesi, görünüşe göre, biyomoleküllerin oksidasyonunu başlatabilen radikal hidroksil (-OH) gibi daha reaktif ve sitotoksik oksijen türleri üretme kapasitesinden kaynaklanmaktadır. H₂O₂'nin bu toksik bileşiklere dönüşümü, indirgeyici maddeler ve paroksidazlar tarafından güçlendirilebilir (Juven ve Pierson 1996).

Padron (1995), *S. Typhimurium*'u içeren bir mücadelede kuluçkalık yumurtaların dekontaminasyonu için H₂O₂'yi başarıyla kullandı. Yumurtalar, %6'lık bir konsantrasyonda H₂O₂'ye çift daldırma ile işleme tabi tutulmuştur.

Cox ve diğerleri (2000), *S. Typhimurium* ile kontamine olmuş kabuklu yumurtaların, yüzey aktif madde içeren bir çözeltiye daldırılarak H₂O₂ (%1.4) ile işleme tabi tutulduğunu ve daha sonra 4 dakika boyunca uygulanan 12 ila 13 Hg (0,4 bar) vakuma tabi tutulduğunu bildirmiştir. Bu işlem, kuluçka randımanı veya erken civciv ölümlerini olumsuz etkilemeden, verimli kuluçkalık yumurtalarda *Salmonella* 'nun ortadan kaldırılmasını maksimuma çıkardı. Bu sonuçlar, yumurta kabuğuna hâlihazırda nüfuz etmiş olan *Salmonella* ları öldürmenin zor olduğunu göstermiştir.

Böyle bir uygulama, daldırma işlemi göz önüne alındığında, biraz farkla sofralık yumurtalara kadar genişletilebilir. Bu son işlem, endüstriyel ölçekte uygulanabilirliği arttırmak için sprey yıkama ile değiştirilmelidir.

Elektrolize su. Su elektroliz teknolojisi, sodyum hipoklorit üretimi de dahil olmak üzere soda endüstrisinde 1900 yıllarında ilk kez kullanılmıştır, günümüzde çeşitli alanlarda uygulanmaktadır ve hijyen kontrolü için umut verici bir termal olmayan tedavi olarak kabul edilmektedir. (Al-Haq ve diğerleri 2005). Elektrolize oksitleyici su (EOW), seyreltilmiş bir tuz çözeltisinin, içinde anot ve katodun bir zarla ayndığı, bir asidik ve bir alkali bileşen elde edildiği bir elektrolitik hücreden geçirilmesiyle üretilir (Huang ve diğerleri 2008; Howard ve diğerleri 2012). Asidik EOW, 2 ila 3 pH'a, 1.150 mV oksidasyon azaltma potansiyeline (ORP) ve 50 ppm'ye kadar serbest kullanılabilir klor konsantrasyonuna sahip olabilir, alkalın EOW ise, maksimum pH değerinde 6,8 ila 11,6 pH'a ve 795 mV ORP'ye ulaşabilir (Mukhopadhyay ve Ramaswamy 2012). EOW'nin bakterisidal aktivitesinin değerlendirilmesi için yapılan birçok çalışma, çeşitli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır: *Staphylococcus aureus* (Park ve diğerleri 2002b), *E. coli* O157:H7 (Kim ve diğerleri 2000a, 2000b), *Salmonella*

Enteritidis (Venkitanarayanan ve diğerleri 1999), *S. Typhimurium* ve *Listeria monocytogenes* (Fabrizio ve Cutter 2003), *Campylobacter jejuni* (Park ve diğerleri 2002a) ve diğerleri.

EOW'nin antimikrobiyal etkisi esas olarak pH, ORP ve HOCl'ye atfedilir (Mukhopadhyay ve Ramaswamy 2012). Aerobik bakteriler çoğunlukla +200 ila 800 mV ORP aralığında büyürken, anaerobik bakteriler -700 ila +200 mV arasında büyür. EOW'deki yüksek ORP, muhtemelen hücrelerdeki elektron akışındaki değişiklik nedeniyle metabolik akışların ve ATP üretiminin modifikasyonuna neden olabilir. Genel olarak, bakteriler 4 ila 9 pH aralığında büyürler. Düşük bir pH, bakteri hücrelerinin dış zarını klor bileşiklerinin en aktif olan HOCl'nin girişine

karşı hassaslaştırabilir. İkincisinin, karbonhidrat metabolizmasında önemli olan belirli enzimlerin klor oksitleyici sülfhidril grupları tarafından glikoz oksidasyonunu inhibe ederek mikrobiyal hücreyi öldürdüğü görülmektedir. Önerilen diğer klor etkisi modları şunlardır: protein sentezinin bozulması; amino asitlerin nitritlere ve aldehitlere oksidatif dekarboksilasyonu; nükleik asitler, pürinler ve pirimidinler ile reaksiyonlar; anahtar enzimlerin yok edilmesinden sonra dengesiz metabolizma; deoksiribonükleik asit (DNA) lezyonlarının indüksiyonu ile birlikte DNA dönüştürme yeteneği kaybı; bazı makromoleküllerin sızıntısı ile birlikte oksijen alımı ve oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu; sitozinin toksik N-klor türevlerinin oluşumu; ve kromozomal anormalliklerin yaratılması (Marriott ve Gravani 2006; Huang ve diğerleri 2008).

Tek başına kabuklu yumurtalar göz önüne alındığında, *S. Enteritidis* ile yapay olarak aşılansız kabuklu yumurtaların dekontaminasyonu için EOW uygulamasını ticari bir deterjan-dezenfektan tedavisi ile her ikisi de in vitro olarak karşılaştırmak için bir çalışma yapılmıştır. Bu in vitro çalışma için, yumurtalar alkalın EOW içinde ve ardından çeşitli sıcaklıklarda asidik EOW içinde ıslatıldı. İşleme tabi tutulan yumurtalar, popülasyonda ≥ 0.6 ve ≥ 2.6 log₁₀-CFU/g kabuk *S. Enteritidis* arasında bir azalma göstermiştir. Tipik ticari deterjan-dezenfektan uygulamaları için *S. Enteritidis* için 1.7'lik log₁₀ azalması gözlemlenirken, *S. Enteritidis* için ≥ 2.1 'lik log₁₀ azalması EOW muamelesi kullanılarak elde edilmiştir (Bialka ve diğerleri 2004).

Elektrostatik püskürtme (4 farklı tekrarda) ile uygulanan EOW'nin kabuklu yumurtalara inokulum uygulandıktan ve bakterilerin tutunmasına 1 saat izin verildikten sonra *S. Typhimurium* ve diğer patojen bakteri türleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla kabuklu yumurtalar üzerinde yapılan bir çalışmada; EOW, yüksek aşılama kullanıldığında bile 4 farklı uygulama tekrarında 15 yumurtadan sırasıyla 3, 7, 1 ve 8'inde *S. Typhimurium*'u tamamen ortadan kaldırmıştır (Russell 2003).

Başka bir çalışmada, yazarlar (Cao ve diğerleri 2009), asidik EOW'nin kabuklu yumurtaların yüzeyindeki (*S. Enteritidis*'i hedefleyen) patojenik mikroorganizma popülasyonlarını azaltmada etkili olduğunu gözlemlediler; ancak, düşük pH değerleri (≤ 2.7) gözlemlendiğinde kullanımı sınırlıdır, çünkü çözünmüş Cl₂ gazı, buharlaşma nedeniyle hızla kaybolabilir ve zamanla solüsyonun bakterisidal aktivitesi azalır. Diğer taraftan, hafif asidik elektrolize su (seyreltik bir hidroklorik asidin membransız bir haznede elektrolüzi ile üretilir), Cl₂'nin gaz çıkışıyla ilgili olarak insan sağlığı için güvenlik sorunlarını en aza indirir. Aynı zamanda, EOW, yüzeylerin korozyonunu hafifçe azaltır ve 5.0 ila 6.5'lik bir pH'ta, klorun etkin formu HOCl olduğundan, bu tip EOW, asidik EOW'ye kıyasla daha güçlü bir antimikrobiyal aktivite ile sonuçlanabilir. Aynı yazarlar, hafif asidik EOW'nin bakterisit etkinliğinin sıcaklıkla arttığını, log₁₀ CFU/mL'deki düşüşün 45 °C'de, 1 dakika sonra 1.0'dan daha az bir değere ulaştığını, 8.0 ila 8.4 log₁₀ CFU/mL'lik bir başlangıç değerinden sonra kanıtladılar. 2 dakika sonra 4 °C, 20 °C ve 45 °C sıcaklıklar kullanılarak *S. Enteritidis* öldürüldü (Cao ve diğerleri 2009). Sonuç olarak, son çalışma, hafif asidik oksitlenmiş suyun, kabuklu yumurta yıkama işlemi ve kabuklu yumurtaların yüzeyine aşılansız *S. Enteritidis*'in çevreye zarar vermeden azaltılması veya etkisizleştirilmesi için umut verici bir dezenfektan ajanı olarak etkili bir şekilde hareket edebileceğini göstermektedir.

Öte yandan, Bialka ve diğerleri (2004) asidik elektrolize suyun yumurta akı yüksekliğini veya yumurta kabuğu mukavemetini önemli ölçüde etkilemediğini, ancak kütükül varlığı üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Çalışmalarının işleme parametrelerinin, yukarıda bahsedilen hafif asidik oksitleyici su işleme parametrelerine kıyasla çok daha ciddi etkilere sahip olduğu belirtilmelidir.

Ozon. Ozon, nispeten düşük konsantrasyonlarda her tür mikroorganizmaya karşı aktif olan, bilinen en güçlü dezenfektanlardan biridir (Khadre ve diğerleri 2001). Düşük stabilitesi nedeniyle ozon depolanamaz, talep üzerine üretilir. Ticari düzeyde genellikle korona deşarj yöntemi kullanılır. Korona deşarjında biri yüksek gerilim elektrotu diğeri düşük gerilim elektrotu (toprak elektrotu) olmak üzere 2 elektrot seramik bir dielektrik ortam ile ayrılarak dar bir boşalma aralığı sağlanır. Elektronlar oksijen molekülünü ayırmak için yeterli kinetik enerjiye sahip olduklarında bu çarpışmaların belli bir bölümü meydana gelir ve her oksijen atomundan bir ozon molekülü oluşur (Güzel-Seydim ve diğerleri 2004a). Bakterilerin ozon yıkımı, bakteriyel membran glikoproteinlerine ve/veya glikolipidlerine saldırarak, hücresel bileşenlerin sızıntısına neden olarak ve ardından, hayati hücresel bileşenlerin progresif oksidasyonu yoluyla hücre ölümü, nükleik materyale ulaşılması ve DNA zinciri kırılmalarına neden olarak gerçekleştirilir (Güzel-Seydim ve diğerleri 2004b; Perry ve Yousef 2011). Bakterisidal etkinliğine ek olarak, ozon kendiliğinden O₂'ye ayrışır, bu nedenle kabuklu yumurtalar için kirletici olmayan bir dezenfektan olma avantajına sahiptir.

Ozon, kabuklu yumurtalarda *Salmonella* 'yı etkin bir şekilde inaktive eden güçlü bir mikrobiyal ajandır, sulu fazdaki etkinliği kanıtlanmıştır. *Salmonella* Enteritidis, yüksek ozon konsantrasyonları (O₂ karışımında %12 ila %14 wt/wt O₃) ile kabuklu yumurtaların yüzeylerinde ≥ 5 log birim etkin bir şekilde inaktive edilmiştir (Rodriguez-Romo ve diğerleri 2007). Aynı *S. enterica* serotipini içeren başka bir çalışmada, kabuklu yumurtalara 3 dakika süreyle atmosfer basıncında ozon uygulaması önemli ölçüde ($P < 0.05$) yumurta kabuğundaki *S. Enteritidis*'i işlenmemiş kontrole kıyasla 3.1 log birim azalttı; daha uzun süreler (8 dakikaya kadar) ek inaktivasyona neden olmadı. 20 dakikaya kadar basınçlı gaz halinde ozonun uygulanması, mikroorganizmanın doğrusal olmayan inaktivasyonu ile sonuçlanmıştır; bu, atmosfer basıncında ozonun uygulanması sırasında gözlenen benzer bir eğilimdir. Basınçlı ozon uygulanmış kabuklu yumurtalarda *Salmonella* Enteritidis popülasyonları önemli ölçüde azaldı ($P < 0.05$). İşleme tabi tutulmayan kontrollere kıyasla 10 dakikalık işlem 4.5 ve 5.9 log ünite veya daha fazlasını inaktive etti ve 20 dakikalık işlem 3.7 ve 5.7 log ünite veya daha fazlasını inaktive etti (Rodriguez-Romo ve Yousef 2005). Aynı konuda, Perry ve diğerleri (2008), yumurta kabuklarında *Salmonella* Enteritidis'in log azalmasını değerlendirmek için sırayla ve ısı ve ozon kombinasyonunu kabuklu yumurtalara uygulamışlardır. *Salmonella* Tek başına ozon ve tek başına ısı ile işleme tabi tutulan tüm yumurtalardan *Salmonella* elde edildi, ancak kombinasyonla işlem görmüş 18 yumurtadan sadece 10'unun testi pozitif çıktı, bu da numunelerin çoğunda *Salmonella* azalmasına işaret etmektedir. Kabuklu yumurtaların ısıtılması, zarlarının ozon gazı geçirgenliğini arttırmıştır, bu nedenle ozon uygulaması, yalnızca kabuklu yumurtalar ozon işleminden önce ısıya maruz bırakıldığında iç *Salmonella* 'ya karşı etkili olmuştur. Ayrıca, sofra yumurtalarında ozon içeren çeşitli uygulamaları ayırt etmek amacıyla, Davies ve Breslin (2003a) kuru ve nemli ozonlanmış hava kullandı, sonuçlar, ilki için 12 kontrolden 11'i (%91,7) ile karşılaştırıldığında, uygulamadan sonra 24 yumurtanın 23'ünün (%95,8) kontamine kaldığını gösterdi ve işleme tabi tutulan edilen 12 yumurtadan 4'ü kontamine olurken, ikinci olarak 12 kontrol yumurtasından 9'u (%75,0) kontamine oldu. Bu nedenle, her iki tür ortamda da ozonun uygulanması yalnızca kısmen etkili olmuştur.

İşinleme. Gıda işinlemesi için şu anda sanitasyon için kullanılmasına izin verilen 3 tip iyonlaştırıcı radyasyon vardır: yüksek enerjili gama ışınlarından, X ışınlarından ve hızlandırılmış elektronlardan gelen işinleme (Codex Alimentarius Komisyonu 2003).

Gama ışınları, kobalt-60 (⁶⁰Co) ve sezyum-137 (¹³⁷Cs) olmak üzere radyoizotop adı verilen radyoaktif maddeler tarafından

üretilir. Enerji içerikleri 1,17 ila 1,33 megaelektronvolt (MeV) (⁶⁰Co) ve 0,662 MeV (¹³⁷Cs) değerine ulaşır. Hızlandırılmış elektronlar (veya elektron demetleri), lineer hızlandırıcılarda neredeyse ışık hızında üretilen 10 MeV'yi aşmayan bir maksimum kuantum enerjisine sahiptir. Yavaşlama ışınları olarak da adlandırılan X-ışınları da hızlandırıcılarda üretilir ve elektronların kuantum enerjileri 5 MeV'yi aşmaz (Riganakos 2010). Mikroorganizmaların inaktivasyon mekanizması, iyonlaştırıcı ışınların (gama ışınları) işlem görmüş ürünün atomlarından elektron toplaması gerçeğiyle açıklanmaktadır, bu nedenle serbest elektronlar kimyasal reaksiyonlarda daha fazla yer alabilir ve canlı mikroorganizmalardan DNA moleküllerini yok edebilir (Riganakos 2010).

İkincisi ile karşılaştırıldığında, elektron ışınları (iyonize edici elektronlar) işlemde radyoaktif madde olmadığı için daha kolay kabul edilmektedir (Riganakos 2010). Işık hızına hızlanma ile elektron ışını tabancası daha sonra yüksek enerjili elektronları ürüne geçirerek mikrobiyal aktivasyona neden olur. Elektron ışını işlemi, işlenmiş gıdanın sıcaklığını değiştirmez ve yüksek doz oranlarının uygulanmasını mümkün kılar (gama radyasyonu için sadece 0,01 ila 1 Gy/sn'ye kıyasla 103 ila 105 Gy/sn). (Tahergorabi ve diğerleri 2012). Bununla birlikte, tipik gıda ürünleri için nüfuz derinliği sadece 8 ila 10 cm'dir, bu nedenle gıda ürünlerinin işinlenmesinden önce, boyut, işlem öncesi dikkate alınmalıdır (Jaczynsky ve Park 2003).

X-ışınları, elektron ışını ile gıda ürünü arasında metal bir hedef yerleştirilerek üretilir. Bu şekilde, hızlandırıcı tarafından üretilen yüksek enerjili elektronlar metal hedefe çarpacak ve X-ışını üretecektir. Enerji seviyesi elektron ışınları durumunda olduğundan daha düşüktür, ancak nüfuz derinliği daha yüksektir (Tahergorabi ve diğerleri 2012).

Bilimsel literatür, *Salmonella* spp inaktivasyonunun etkinliğini kanıtlamak için kabuklu yumurtalar üzerinde farklı girişimler göstermektedir.

Taze kabuklu yumurtalar, 3 doz gama işinlemesinin (1, 2 ve 3 kGy) etkisini test etmek amacıyla 108 CFU *S. Enteritidis* ile aşılmıştır. İşinleme işleminden sonra yumurtalar 4 °C'de 42 saat tutulmuştur. 1 kGy'lik işinleme dozu, kabuk üzerinde saptanabilir *S. Enteritidis* için 3,9 logCFU'luk bir azalma ortaya koymuştur. Ayrıca, kullanılan daha yüksek dozlar, kabuk üzerinde bakteriyel kontaminasyonun saptanamayan seviyelere indirilmesini ortaya koymuş ve bu uygulamanın kabuklu yumurta yüzey dekontaminasyonu için etkinliğini kanıtlamıştır (Tellez ve diğerleri 1995).

Serrano ve diğerleri (1997), yüzeyde (106 CFU/mL düzeyinde) veya kabuklu yumurtalarda (1 mL 108 hücre/mL enjekte ederek) aşılana 5 *S. Enteritidis* izolatının işinleme duyarlılığını test etti. Aşılama numuneleri 0, 0,5, 1,0 ve 1,5 kGy'lik işinleme dozlarına tabi tutulmuştur. Tüm izolatların yüzeyden elimine edilmesi için minimum 0,5 kGy dozu yeterli kabul edildi. Ancak aynı izolatlar içeriklere aşılama sırasında daha büyük direnç gösterdi ve bu durumda sadece teste dahil edilen maksimum doz içerikteki *S. Enteritidis* sayılarını yaklaşık 4 log10 oranında azaltabildi.

2003 yılında, Wong ve Kitts 109 hücre/mL-1 dozunda 0,5 mL *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *S. Typhimurium* süspansiyonu ile aşılama kabuklu yumurtalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelemek için düşük dozlarda elektron ışını işinlemesi (2, 3 ve 4 kGy) kullandılar. İnokule edilen numuneler 20 °C'de 24 saat tutulduktan sonra yukarıda belirtilen dozlar kullanılarak işinleme işlemi yapılmıştır.

3 ve 4 kGy'lik elektron ışını ışınlanması dozları, 3 patojenin saptanamayan seviyelere indirildiğini ortaya koymuştur; S. Typhimurium ışımaya karşı daha yüksek bir direnç göstermektedir, sayımlar diğer 2 türün durumundan daha yavaş azalmaktadır.

10^7 ile 10^8 CFU/yumurta aşısı kullanılarak, kabuklu yumurtalar, S. Typhimurium, S. Enteritidis, Campylobacter coli ve C. jejuni'nin referans suşları ile yapay olarak kontamine edilmiştir. D değerlerinin (mikroorganizmalar için ısı direnci değerleri) belirlenmesi için ışınlama dozları aralığı *Salmonella* spp için 0,2 ila 1 kGy ve Campylobacter spp için 0,2 ila 0,7 kGy idi. Gama ışınması dozları, 0,5 ila 5 kGy aralığında yer almıştır. D değerleri S. Typhimurium ve S. Enteritidis için sırasıyla 0.31 ile 0.26 ve 0.20 ve 0.19 kGy arasında, yumurta kabuğu için C. coli ve C. jejuni için 0.21 ile 0.18 kGy ve 0.07 ile 0.09 kGy arasında değişmektedir (Cabo Verde ve diğerleri 2004).

Al-Bachir ve Zeinou (2006), kabuklu yumurtaların ışınlanması üzerine başka bir çalışma yapmışlardır. 10^7 CFU/mL *Salmonella* spp süspansiyonu kullanılarak kabuklu yumurtalar aşılandı ve daha sonra hayatta kalma eğrilerinin tahmini ile 500 ila 3000 Gy gama ışınmasına tabi tutuldu. *Salmonella* spp yükünü bir log döngü (D_{10}) azaltmak için gereken radyasyon dozu 448 Gy idi. Yun ve diğerleri (2012) başka bir yaklaşım önerdi. Farklı konsantrasyonlarda kitosan kaplamaları ve farklı iyonlaştırıcı radyasyon dozlarını birleştirerek, ışınlanmış yumurtaların güvenilir ve fonksiyonel özelliklerini en üst düzeye çıkarırken kalite bozulmalarını en aza indirmek için en uygun koşulları tahmin etmeyi amaçladılar. 1. adımda, yumurtalar %0.0, %0.5, %1.0, %1.5 ve %2.0 konsantrasyonları kullanılarak kitosan ile kaplandı. 2. aşama, kabuklu yumurtaların daldırma yoluyla S. Typhimurium ile aşılanmasından ve ayrıca 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 kGy dozları kullanılarak bir ışınlama işlemine tabi tutulmasından oluşuyordu. Sonuçlar, %1'den fazla kitosan konsantrasyonları ile kombinasyon halinde 0,5 kGy'den fazla dozlar kullanıldığında, S. Typhimurium'un yumurta kabuğundan başarıyla ortadan kaldırıldığını gösterdi. Ayrıca, 0.45 kGy ışınlama dozu ve %0.525 kitosan kaplama konsantrasyonu kullanıldığında köpük stabilitesi, köpürme kapasitesi ve Haugh birimliği olumsuz etkilenez.

Mikrodalga teknolojisi. Mikrodalgalar, 300 MHz ila 300 GHz aralığında frekanslara sahip salınan elektromanyetik dalgalarıdır. Mikrodalgaların patojenler üzerindeki etkileri genel olarak 2 şekilde ifade edilebilir: termal ve termal olmayan. Termal inaktivasyon, enzimlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin veya diğer hayati bileşenlerin denatürasyonu ve membranların bozulması gibi değişiklikleri içeren mikrodalga uygulama işlemi sırasında ısıtmadan kaynaklanır.

Termal olmayan etkiler 4 kategoride sınıflandırılmıştır:

- Mikrodalgaların katı mikroorganizmaları çevreleyen ortamdan daha etkili bir şekilde ısıtması ve organizmanın daha hızlı öldürülmesine neden olmasıyla açıklanan seçkili ısıtma;
- bir elektrik potansiyeli mikroorganizmanın zarını geçtiğinde meydana gelen ve zarda gözeneklerin oluşmasına ve hücrel bileşenlerin daha fazla sızıntısına yol açan elektroporasyon;
- bir zar boyunca voltaj düşüşü nedeniyle hücre zarının yırtılması;
- hücresinin iç bileşenlerinde bir bozulmanın neden olduğu ve hücre lizisine yol açan manyetik alan eşleşmesi (Datta ve Davidson 2000; Leonelli ve Mason 2010).

Mikrodalgalar, Lakins ve diğerlerinin (2008) daha önce gösterdiği gibi, aralarında S. Enteritidis'in de bulunduğu yumurta kabuğunda bulunan farklı bakterilerin yükünü azaltmak için kullanılabilir. Yeni bir yönlü mikrodalga teknolojisi (ITACA New Tech, Brescia, İtalya) kullanılarak yumurtalar 20 saniye boyunca 12.2 cm dalga boyuna karşılık gelen 2.45 GHz'e maruz bırakıldı. Mikrodalga işleminin sonunda 30 saniyelik bir CO₂ işlemi gerçekleştirildi. Yumurta kabuğu üzerinde S. Enteritidis'in maksimum azalması yaklaşık 2 log döngü idi, bu değer yazarlar

tarafından doğal olarak kontamine olmuş yumurtaların çoğunda S. Enteritidis'i ortadan kaldırmak için uygun olarak değerlendirildi. Bununla birlikte, minimum 3 ila 4 log₁₀'luk bir azalmaya ulaşmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Ultraviyole ışın teknolojisi. Ultraviyole (UV) ışık, X-ışınları (200 nm) ve görünür ışık (400 nm) arasındaki elektromanyetik spektrumun iyonlaştırıcı olmayan bölgesinde geniş bir dalga boyu bandını kaplamaktadır, ancak yalnızca 250 ila 260 nm aralığındaki UV (kısa dalga UV radyasyonu veya UVC) çoğu mikroorganizma için öldürücü olabilir. Pratik uygulamaları arasında şunlar sayılabilir: yüzeylerde mikroorganizmaların inhibisyonu, havadaki mikroorganizmaların yok edilmesi ve sıvıların sterilizasyonu (Bintsis ve diğerleri 2000). UV radyasyonu, DNA'daki pirimidin nükleotid bazları arasında bir çapraz bağlanmayı indükleyerek mikroorganizmaları etkisiz hale getirir, bu da DNA transkripsiyonunun ve replikasyon mekanizmalarının inhibisyonu ile sonuçlanır ve sonunda mikrobiyal hücre ölümüne yol açar. Ayrıca UV radyasyonunun hücre zarı bütünlüğünü etkilediği, protein modifikasyonlarını indüklediği ve oksidatif fosforilasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Rodriguez-Romo ve Yousef 2005).

Keklik ve diğerleri (2009), 3800 V giriş voltajının UV atımlı ışığını (saniyede 3 kez, her atımın süresi 360 µs) kullanarak, lamba yüzeyinin 1,5 cm altında 1.27 J/cm²/atım radyan enerji ürettirler. S. Enteritidis ile yapay olarak kontamine edilmiş kabuklu yumurtalardan oluşan numuneler, farklı işlem sürelerine tabi tutulmuş ve farklı mesafeler de kullanılmıştır (1, 3, 5, 10, 15, 20 ve 30 s, 9,5 ve 14,5 cm). Sonuçlar, UV flaşından 9,5 cm'lik bir uygulama mesafesinde, azalmanın 2,0 ile 5,3 CFU/cm² arasında olduğunu ve uygulamadan sonra numunelerin görsel görünümünün herhangi bir farklılık göstermediğini gösterdi. 3, 5 ve 10 saniyelik uygulamalar önemli ölçüde farklılık göstermemiştir (P < 0.05), 10 saniyelik uygulama 15 saniyelik uygulamadan önemli ölçüde farklılık göstermemiştir (P > 0.05). 20 s ve 30 s sonuçları, diğer uygulamalardan önemli ölçüde farklılık göstermiştir (P < 0.05) ve mesafeler dikkate alındığında, 9,5 ve 14,5 cm'deki uygulamalar, uygulama sürelerinden bağımsız olarak önemli ölçüde farklılık göstermemiştir (P > 0.05). Negatif zenginleşmeye neden olan en kısa süreli işlem 9,5 cm mesafe içeren işlem olmuştur.

Salmonella ile kontamine kabuklu yumurtaların 2 ve 4 dakika süreyle UV radyasyonu (100 µW/cm²) ile işleme tabi tutulması (P < 0.05), S. Enteritidis popülasyonunu işleme tabi tutulmamış kontrollere kıyasla sırasıyla 2.6 ve 2.0 log birim azalttı. Aynı çalışmada fakat başka bir denemede, *Salmonella* ile kontamine kabuklu yumurtalar, 5 dakikaya kadar daha yüksek UV radyasyon yoğunluğu (1500 ila 2500 µW/cm²) ile işleme tabi tutuldu; bu işlem, önemli bir (P < 0.05) mikrobiyal azalma ile sonuçlandı; 1, 3 ve 5 dakikalık UV uygulamaları, işleme tabi tutulmamış kontrollerle karşılaştırıldığında, *Salmonella* popülasyonlarını sırasıyla 3.4, 3.0 ve 4.3 log birim azalttı; 1, 3 ve 5 dakikalık ışınlamadan sonra *Salmonella* popülasyonlarındaki azalmalar karşılaştırıldığında önemli bir fark (P > 0.05) gözlemlenmedi (Rodriguez - Romo ve Yousef 2005).

Elle çalıştırılan bir yumurta silindiri kullanılarak, kabuklu yumurtalara 0, 15, 30 ve 60 saniye süreyle 7,35 mW/cm²'de 254 nm ışıktan oluşan bir UV işlemi uygulandı; son olarak yumurta kabukları üzerindeki mikrobiyal yükün azalmasını gözlemlemek için APC değerlendirildi. Tüm 30 saniyelik UV maruz bırakma denemelerinde, kontrollere kıyasla 1 ila 2 log₁₀ CFU/yumurta oranında önemli bir azalma meydana geldi. 60 saniye döndürülen yumurtalar, diğer maruz kalma zaman aralıklarından önemli ölçüde daha fazla APC düşüşüne sahipti (kontrollere kıyasla, 60 saniye UV radyasyonuna maruz kaldıktan sonra 2 ila 3 log₁₀ CFU/yumurta aerobik mikroorganizma gözlemlendi) (Chavez ve diğerleri 2002).

Ampullerden 20 cm uzaklıkta 10 mW/cm²/s'lik bir UVC (254 nm) doz hızı ve maruz kalma sırasında 4 kez 90° dönüşle ışınlama kullanılarak, Sommers ve diğerleri (2010), kabuklu yumurtalarda *Salmonella* spp'nin J/cm² başına farklı log azalması elde ettiler: 0.5 J/cm²'de 0.43 ± 0.21; 1 J/cm²'de 0.31 ± 0.2; 2 J/cm²'de 0.53 ± 0.52 ve 4 J/cm²'de 0.98 ± 0.55.

Atımlı ışık teknolojisi. Atımlı ışık (PL) işlemi, yoğun bir geniş spektrumlu ışığın (200 ila 1000 nm) kısa süreli atımların uygulanmasından oluşan termal olmayan bir teknolojidir. Spektrumun bu kısmı, esas olarak fotokimyasal ve/veya fototermal mekanizmalar yoluyla PL'nin öldürücü etkisinden sorumludur. Bakteriler üzerinde üretilen fotokimyasal hasar, spektrumun UV-C bölgesi (200 ila 290 nm) tarafından esas olarak DNA üzerinde indüklenirken, fototermal hasar mikroorganizmalar tarafından ışığın absorpsiyonundan kaynaklanır; bu da hücre içindeki suyun buharlaşmasına ve zararlı yıtılmasına neden olan geçici bir aşırı ısınmaya neden olur (Wekhof ve diğerleri 2001; Woodling ve Moraru 2005). Hierro ve diğerleri (2009), UV ışığına karşılık gelen spektral çıktının %30'u ile 100 µs'de iletilen PL kullanılarak *S. Enteritidis*'in etkisizleştirilmesinin mümkün olduğunu gösterdi. Bunun için kütükülün yokluğunun/varlığının etkisini de gözlemek için yıkanmış ve yıkanmamış yumurta kullandılar. Yıkanmamış yumurtaların kültüre daldırılması, kabukta 4.5 log birimlik bir ilk kontaminasyon sağladı. Bu kategori için, PL işlemi, yumurtaların %24 ila %80'inde 3,6 logCFU/yumurta oranında bir azalma tespit etmiştir. Yıkanmış yumurtalar için, aşılama 6.3 log birimlik bir ilk kontaminasyona yol açtı; elde edilen maksimum azalma sadece 1.8 log CFU/yumurta idi. 12 J/cm² uygulandığında yumurtalarda kaydedilen maksimum sıcaklık artışı 3 °C olduğundan bu yöntem yumurta kalitesi için herhangi bir risk oluşturmamaktadır. Yıkanmış yumurtalarda elde edilen daha düşük kontaminasyon, kütükülün durumunun uygulamanın faydasını etkilediği hipotezini desteklemektedir. Bu nedenle kütükülün bütünlüğünün bozulmasına neden olan herhangi bir durum PL işleminin etkinliğini azaltır.

Yıkanmamış yumurtalar da kullanılarak, *S. Enteritidis* ile aşılama ve 0,5 J/cm²'lik 8 flaş ile işleme tabi tutularak, kabuklu yumurtaların yüzeyinde 8 log azalma gözlemlendi. Aynı yazar, yumurtadan daha soğuk bir inokulum solüsyonu kullanıldığında, mikroorganizmaların kabuğa daha derin bir şekilde nüfuz etmesinin arttığını, inaktivasyonun ise 1. deneye kıyasla 2 ila 4 kat daha düşük log azalması sağladığını gözlemledi (Dunn 1996).

Gaz plazma teknolojisi. Plazma, sürekli etkileşim halindeki parçacıklardan oluşur: fotonlar, elektronlar, pozitif ve negatif iyonlar, atomlar, serbest radikaller ve uyarılmış ve uyarılmamış moleküller. Plazma, oluşturuldukları koşullara bağlı olarak termal olabilir ve termal olmayabilir. Termal plazmalar yüksek basınçta elde edilir ve korunmak için önemli bir güce ihtiyaç duyarken, termal olmayan plazmalar daha düşük basınçta elde edilir, daha az güç kullanır ve gazından çok daha yüksek bir elektron sıcaklığı ile karakterize edilir (Moisan ve diğerleri 2001; Moreau ve diğerleri 2008).

Plazma işlemi sırasında mikroorganizmalar, OH ve NO radikalleri tarafından yoğun bir bombardımana maruz kalırlar, ancak inaktivasyonlarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İşlem muhtemelen canlı bakteri hücrelerinin yeterince hızlı tamir edemediği yüzey lezyonlarına neden olur. Mikroorganizmaların yok edilmesinde yer alan süreç, aynı zamanda, plazma bileşenlerinin mikroorganizmaların yüzeyine emilmesi ve daha sonra hücrelerden elimine edilen uçucu bileşiklerin oluşturulmasıyla da ifade edilebilir. Ayrıca plazma, mikroorganizmaların zarlarında deliklere neden olur ve besiyerinde belirgin bir asitleşmeye neden olur (Laroussi ve diğerleri 2003; Laroussi ve Leipold 2004).

Gaz plazma, geleneksel yöntemlerle sterilize edilemeyen ürünler için alternatif bir yöntem olarak gıdaların dekontaminasyonu için iyi bir fırsat sunabilir. Avrupa Birliği'nde, tasniften önce veya sonra kabuklu yumurtaların yıkanması veya temizlenmesi yasaklanmıştır; bu nedenle alternatif yöntemlere olan ihtiyaç artmaktadır. Ragni ve diğerleri (2010), kabuklu yumurtaların yüzeyini dekontamine etmek için termal olmayan bir gaz plazma cihazı kullanma olasılığını araştırdı. Cihaz, 2 elektrottan oluşan dirençli bir bariyer deşarj sistemi ile temsil edilmiştir. Bir veya her ikisi, ark oluşumunu önleyecek yüksek dirençli bir malzeme ile kaplanmıştır. Yüzeysel dekontaminasyon için prototipin etkinliği, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* ile yapay olarak aşılanmış kabuklu yumurtaların farklı zamanlarda gaz plazmasına maruz bırakılmasıyla değerlendirildi: 0, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90 dakika. *S. Enteritidis* için, 10 ila 20 dakikalık bir maruz kalma, işleme tabi tutulmamış numunelere kıyasla 1.0 ila 1.6 log CFU/yumurta kabuğu azalmasıyla sonuçlandı. 60 ila 90 dakika sonra, %35 bağıl nemde (RH) 2,2 ila 2,5 log CFU/yumurta kabuğunda maksimum azalma gözlemlenirken, %65 RH'de uygulamaların etkinliği artırıldı. Gaz plazma üreticinin etkinliği, işlem süresinin arttırılmasıyla arttı; bu yarı-doğrusal bir eğilim göstermektedir. *S. Typhimurium* için, %65 RH kullanıldığında daha yüksek bir hassasiyet gözlemlendi. Ayrıca, 90 dakika boyunca işleme tabi tutulduğunda 3.5 log CFU/yumurta kabuğunda önemli bir azalma gözlemlendi.

Kayes ve diğerleri (2007), gıda kaynaklı patojenlerin inaktivasyonu için bir atmosfer tek tip ışıma deşarjı kullanan başka bir gaz plazma jeneratörü cihazının etkinliğini incelediler ve farklı bakteri türlerinin (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*) mikrobiyal yükünün, 30 ila 90 s'lik bir ilk maruz kalma süresi boyunca güçlü bir şekilde azaldığını gösterdiler. Bununla birlikte, spor oluşturan *B. cereus*, spor oluşturmayan türlere göre plazmaya daha dirençli olmasına rağmen, Gram-pozitif ve Gram-negatif patojenler arasında kayda değer bir fark gözlenmemiştir (Kayes ve diğerleri 2007).

Ultrason. Akustik enerjinin transferinin anlık olması ve ürünlerin tüm hacmine dağılması gerçeğinden dolayı, gıda ürünlerinin ultrasonla işleme tabi tutulması, minimum işleme için yararlı bir araçtır (Ulusoy ve diğerleri 2007). Ultrasonik dalgalarla mikrobiyal öldürme mekanizması, esas olarak hücre zarlarının incelenmesi, lokalize ısınma ve serbest radikallerin üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Piyasena ve diğerleri 2003). Mikro-mekanik şok dalgaları, ultrasonikasyon işlemi altında dalgalanan basınçların neden olduğu mikroskobik kabarcıklar oluşturup kırarak oluşturulur; bu şok dalgaları hücresel yapısal ve fonksiyonel bileşenleri bozar ve hücre lizisine yol açar (Ulusoy ve diğerleri 2007). Sonikasyon işlemi mikrobiyal yıkıma şu şekilde yol açmaktadır: alternatif sıkıştırma ve genişleme bölgeleri yaratarak, uzunlamasına dalgalar kaviteasyonun meydana gelmesine neden olur ve kabarcıklar oluşur; genişleme yoluyla, sağlanan ultrasonik enerjinin bir buhar fazını tutmak için yeterli olmadığı bir noktaya ulaşırlar ve bu nedenle hızlı yoğunlaşma meydana gelir. Yoğunlaşan moleküller şiddetli bir şekilde çarpışarak şok dalgaları yaratır; bu dalgalar, 5500 °C ve 50 MPa'ya ulaşan çok yüksek sıcaklık ve basınç bölgeleri oluşturur. Bu teknolojinin diğer uygulamalarla farklı kombinasyonları önerilmiştir: termosonik (ısı artı sonikasyon), manosonik (basınç artı sonikasyon) ve manotermosonik (ısı artı basınç artı sonikasyon), bunların tümü, mikroorganizmaları öldürmede daha enerji verimli ve etkili olduklarından, mikropları etkisiz hale getirmek için yüksek verimli yöntemleri temsil etmektedir (Dolatowski ve diğerleri 2007). Ultrasonik yöntem, ısıl işleme

birlikte kabuklu yumurta tedavisi ile *Salmonella* Enteritidis'e verimli bir şekilde uygulandı. Kullanılan parametreler şunlardı: 5 dakika için 54 °C, 24 kHz ve 60 µm'de 400 W. S. Enteritidis sayısı 7,78 log CFU/yumurta kabuğundan 2,95 log CFU/yumurta kabuğuna düşürüldü (P < 0.05). Yumurta kabuğu morfolojisi ve yapıları üzerinde termoultrasonik işlemin ihmal edilebilir bir etkisi vardı, kütükül morfolojisinde bazı değişikliklere uğradı, ancak depolama koşulları ve yumurta içeriğinde tespit edilen bakteri üremesi üzerinde bir etkisi olmadı (Cabeza ve diğerleri 2011).

Bitki özlerinin kullanımı. Tüketicilerin organik ve işlenmemiş gıda ürünlerine olan talebi giderek artıyor; bu nedenle sofralık yumurta dekontaminasyonu için bitki özlerinin kullanılması bu açıdan uygun bir seçenek olarak değerlendirilebilir.

Son zamanlarda Krittika ve Gi-Hyong (2012) birkaç bitki özünün *Salmonella* spp üzerindeki inhibitör etkileri hakkında bir inceleme yayınladılar. Bu yazarlara göre, fenolik bileşikler, zarı geçişen hale getirerek etkileşime girdiklerinden bakteriyel etkilerinden sorumludur. Biyolojik aktiviteleri, ekstraksiyon için kullanılan çözücüye de bağlı gibi görünmektedir.

Şu anda, bu konuda, özellikle kabuklu yumurtalar üzerinde çok az çalışma yayınlanmıştır. Davies ve Breslin (2003a), *Salmonella* ve diğer zararlı bakteriler üzerinde engelleyici etkisi olan doğal bir bitki özünden bahsetmiştir. Daha önce *Salmonella* Enteritidis ile kontamine olmuş yumurtalar %2 Protecta I'ye (Bavaria Corp. Intl., Apopka, Fla., ABD) daldırıldığında ve ayrıca oda sıcaklığında havada kurutulduğunda, yazarlar, damıtılmış su kontrolü (8/20) ile karşılaştırıldığında kontamine kalan yumurta sayısında (8/20) bir fark gözlemlenemediler.

Son zamanlarda, Pohan ve diğerleri (2009), *Punica granatum* L.'nin etanolik ekstraktının *Salmonella* Enteritidis'e karşı yumurta kabukları ve yumurta kabuğu zarları üzerindeki etkisini test ettiler. 10 dakika boyunca uygulanan bu alkollü bitki özünün %1,25'lik bir konsantrasyonu ve %2,5'lik (a/h) birinin kullanılması, hem yumurta kabuklarında hem de yumurta kabuğu zarlarında S. Enteritidis'in tamamen ortadan kaldırılmasına yol açmadı.

Bu bitki özlerinin etkinliği şimdiye kadar tam olarak kanıtlanmamıştır.

Sonuçlar

Farklı koruyucu yöntemlerin kullanılması, yumurtaların *Salmonella* spp., özellikle S. Enteritidis ile kontamine olma olasılığını azaltma etkisine sahiptir. Çiftlik düzeyinde, farklı hasat öncesi yöntemleri, enfeksiyon sürecine müdahale ederek ve bu gıda kaynaklı patojenin oluşan yumurtaya nüfuz etme olasılığını azaltarak yumurta kontaminasyonu riskini azaltabilir. Ayrıca, hasat sonrası yöntemler, soğutma adımına uyarak ve kimyasal ya da fiziksel farklı prosedürler uygulayarak insanda salmonelloz riskini azaltabilir. Bunlar özellikle yumurta kabuğundaki mevcut bakteri sayısını azaltır ve dünyanın farklı yerlerinde pazarlanan kabuklu yumurtaların mikrobiyolojik kalitesini sağlar. Ancak, bu hasat sonrası kimyasal veya fiziksel prosedürler dünya çapında kabul görmemekte ve uygulanmamaktadır; çünkü uygulanan işleme yöntemleri ne olursa olsun, kabuklu yumurtaların besin kalitesinin ve özelliklerinin korunmasını sağlamak için bu konuda araştırmalara hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür Bölümü

Bu belgenin hazırlanması, Avrupa Sosyal Fonu'nun desteğiyle uygulanan POS-DRU/88/1.5/S/52614 projesi aracılığıyla finanse edilmiştir.

Referanslar

- Al-Bachir M, Zeinou B. 2006. Effect of gamma irradiation on some characteristics of shell eggs and mayonnaise prepared from irradiated eggs. J Food Safety 26(4):348-60.
- Al-Haq MI, Sugiyama J, Isobe S. 2005. Applications of electrolyzed water in agriculture and food industries. Food Sci Technol Res 11(2):135-50.
- Alodan MA, Mashaly MM. 1999. Effect of induced molting in laying hens on production and immune parameters. Poult Sci 78(2):171-7.
- Ammor MS, Florez BA, Mayo B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol 24(6):559-70.
- Arnold ME, Carrique-Mas JJ, Davies RH. 2010. Sensitivity of environmental sampling methods for detecting *Salmonella* Enteritidis in commercial laying flocks relative to the within-flock prevalence. Epidemiol Infect 138(3):330-9.
- Atterbury RJ, Carrique-Mas JJ, Davies RH, Allen VM. 2009. *Salmonella* colonization of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial *Salmonella* vaccines. Vet Rec 165(7):493-6.
- Baron F, Gautier M, Brule G. 1997. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg white. J Food Prot 60(11):1318-23.
- Beaumont C, Chapuis H, Protais J, Sellier N, Menanteau P, Fravalo P, Velge P. 2009a. Resistance to *Salmonella* carrier state: selection may be efficient but response depends on animal's age. Genet Res (Camb) 91(3):161-9.
- Beaumont C, Chapuis H, Sellier N, Calenge F, Zongo P, Velge P, Protais J. 2009b. Selection for increased resistance to *Salmonella* carrier-state. World's Poult Sci J 66(2):251-60.
- Beaumont C, Calenge F, Chapuis H, Fablet J, Miniville F, Tixier-Boichard M. 2010. Génétique de la qualité de l'œuf. INRA Prod Anim 23(2):123-32.
- Bennett DD, Higgins SE, Moore RW, Beltran R, Caldwell DJ, Byrd II JA, Hargis BM. 2003. Effects of lime on *Salmonella* Enteritidis survival in vitro. J Appl Poult Res 12(1):65-8.
- Berry WD. 2003. The physiology of induced molting. Poult Sci 82(6):971-80.
- Bhunja AK. 2007. Foodborne microbial pathogens. 1st ed. New York, N.Y.: Springer Science and Business Media. p 276.
- Bialka KL, Demirci A, Knabel SJ, Patterson PH, Puri VM. 2004. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. Poult Sci 83(12):2071-8.
- Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - a critical review. J Sci Food Agric 80(6):637-45.
- Board RG, Halls NA. 1973. The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. Br Poult Sci 14(1):69-97.
- Borie C, Sánchez ML, Navarro C, Ramirez S, Morales MA, Retamales J, Robeson J. 2009. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. Avian Dis 53(2):250-4.
- Braden C. 2006. *Salmonella* enterica Serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. Clin Infect Dis 43(4):512-7.
- Braun P, Fehlhauer K. 1995. Short communication. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. Int J Food Microbiol 25(1):95-9.
- Brenes A, Roura E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. Anim Feed Sci Technol 158(1-2):1-14.
- Cabeza MC, Cambero MI, De la Hoz L, Garcia ML, Ordóñez JA. 2011. Effect of the termoultrasonication treatment on the eggshell integrity and their impact on the microbial quality. Innovative Food Sci Emerg Technol 12(2):111-117.
- Cabo Verde S, Tenreiro R, Botelho ML. 2004. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies. Radiat Phys Chem 71(1-2):27-31.
- Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C. 2010. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. Genet Sel Evol 42(11):1-11.
- Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. J Anim Sci 86(suppl. E):E163-72.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J Dairy Sci 90(6):2580-95.

- Cao W, Zhu ZH, Shi ZX, Wang CY, Li BM. 2009. Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* Enteritidis and its contaminated shell eggs. *Int J Food Microbiol* 130(2):88–93.
- Carvalho CM, Santos SB, Kropinski AM, Ferreira EC, Azeredo J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. In: Kurtboke I, editor. *Bacteriophages*. Croatia: InTech. p 179–215.
- Caudill AB, Curtis PA, Anderson KE, Kerth LK, Oyarazabal O, Jones DR, Musgrove MT. 2010. The effects of commercial cool water washing of shell eggs on Haugh unit, vitelline membrane strength, aerobic microorganisms and fungi. *Poult Sci* 89(1):160–8.
- CDC. 2010. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2008 (Final Report). Atlanta, Ga.: US Dept. of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. Div. of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases. Natl. Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Available from: <http://www.cdc.gov/nceid/dfwed/PDFs/SalmonellaAnnualSummaryTables2009.pdf>. Accessed June 13, 2012.
- CDC. 2012. Centers for Disease Control and Prevention. Div. of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases. Natl. Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Available from: <http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html#Salmonella>. Accessed Feb 1, 2012.
- Cerquetti MC, Gherardi MM. 2000a. Orally administered attenuated *Salmonella* Enteritidis reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol* 76(2):185–92.
- Cerquetti MC, Gherardi MM. 2000b. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 18(11–12):1140–5.
- CFR. 2012a. Code of Federal Regulations, Title 21, parts 172–186 (21 CFR 172–186). Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/cfrsearch.cfm>. Accessed Oct 22, 2012.
- CFR. 2012b. Code of Federal Regulations, Title 7, part 56, section 76. Minimum facility and operating requirements for shelled eggs grading and packing plants. (7 CFR 56.76). Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2001-title7-vol3/pdf/CFR-2001-title7-vol3-sec56--76.pdf>. Accessed Oct 22, 2012.
- Chao SC, Young DG, Oberg CJ. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res* 12(5):639–49.
- Chalghoumi R, Thewis A, Portetelle D, Beckers Y. 2008. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in the same egg yolk. *Poult Sci* 87(1):32–40.
- Chalghoumi R, Thewis A, Beckers Y, Marcq C, Portetelle D, Schneider YJ. 2009a. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium *in vitro*. *Foodborne Pathog Dis* 6(5):593–604.
- Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Thewis A. 2009b. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 13(2):295–308.
- Chaussé AM, Grépinet O, Bottreau E, Le Vern Y, Menanteau P, Trotreau J, Robert V, Wu Z, Kerboeuf D, Beaumont C, Velge P. 2011. Expression of Toll-like Receptor 4 and downstream effectors in selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to *Salmonella* carrier state. *Infect Immun* 79(8):3445–54.
- Chavez C, Knappe KD, Coufal CD, Carey JB. 2002. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult Sci* 81(8):1132–5.
- Chen J, Shallo Thesmar H, Kerr WL. 2005. Outgrowth of *Salmonella e* and the physical property of the albumen and vitelline membrane as influenced by egg storage conditions. *J Food Prot* 68(12):2553–8.
- Chung CH, Day DF. 2004. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltotoligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poult Sci* 83(8):1302–6.
- Clavijo RI, Luoi C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. 2006. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Appl Environ Microbiol* 72(2):1055–64.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71(1):1–20.
- Codex Alimentarius Commission. 2003. Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of foods. Code of practice for radiation processing of food (CAC/RCP 19–1979). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. p 6.
- Cogan TA, Domingue G, Lappin-Scott HM, Benson CE, Woodward MJ, Humphrey TJ. 2001. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *Int J Food Microbiol* 70(1–2):131–41.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69(Suppl.):1052S–7S.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Ardezi E, Plamas F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymes essential oils. *Lett Appl Microbiol* 29(2):130–5.
- Cox NA, Berrang ME, Buhr RJ, Bailey JS. 2000. Bactericidal treatment of hatching eggs IV. Hydrogen peroxide applied with vacuum and a surfactant to eliminate *Salmonella* from hatching eggs. *J Appl Poult Res* 9(4):530–4.
- Datta AK, Davidson PM. 2000. Microwave and radio frequency processing. *J Food Sci* 65(s8):32–41.
- Davidson F, Kaspers B, Schat KA. 2008. *Avian immunology*. 1st ed. Oxford: Elsevier's Science and Technology. p 481.
- Davies RH, Breslin M. 2001. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying flocks. *Vet Rec* 149(23):699–704.
- Davies RH, Breslin M. 2003a. Investigations into possible alternative decontamination methods for *Salmonella* Enteritidis on the surface of table eggs. *J Vet Med B* 50(1):38–41.
- Davies RH, Breslin M. 2003b. Persistence of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ Microbiol* 5(2):79–84.
- Davies RH, Breslin M. 2004. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathol* 33(2):133–44.
- Davies RH, Hinton MH. 2000. *Salmonella* in animal feed. In: Wray C, Wray W, editors. *Salmonella* in domestic animals. Oxon: CABI Publishing, CAB Intl. p 285–300.
- Davies RH, Wales AD. 2010. Investigations into *Salmonella* contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *J Appl Microbiol* 109(4):1430–40.
- Davies RH, Wray C. 1995. Mice as carriers of *Salmonella* Enteritidis on persistently infected poultry units. *Vet Rec* 137(14):337–41.
- Davies RH, Wray C. 1996. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *Br Poult Sci* 37(3):589–96.
- Davies PR, Scott Hurd H, Funk JA, Fedorka-Cray PJ, Jones FT. 2004. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog Dis* 1(4):202–15.
- Davis M, Morishita TY. 2005. Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of *Salmonella* species and *Escherichia coli* inside and outside commercial layer facilities. *Avian Dis* 49(1):30–5.
- Davis AJ, Lordelo MM, Dale N. 2002. The use of cottonseed meal with or without added soapstock in laying hen diets. *J Appl Poult Res* 11(2):127–33.
- Davison S, Benson CE, Eckroade RJ. 1996. Evaluation of disinfectants against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 40(2):272–7.
- Dawoud TM, Herrera P, Hanning I, Kwou YM, Ricke SC. 2011. *In vitro* invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. *Poult Sci* 90(5):1134–7.
- De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004a. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol* 97(2):233–45.
- De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004b. Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathol* 33(3):314–20.
- De Reu K, Grijspeerdt K, Messens W, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, Herman L. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 112(3):253–60.
- De Vylder J, Dewulf J, Van Hoorebeke S, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2011. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poult Sci* 90(7):1391–6.
- Desin TS, Wisner ALS, Lam PKS, Berberov E, Mickael CS, Potter AA, Koster W. 2011. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island-1 proteins as vaccine candidates against *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. *Vet Microbiol* 148(2–4):298–307.

- Dias Paiva A, Breukink E, Mantovani HC. 2011. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. *Antimicrob Agents Chemother* 55(11):5284–93.
- Diez-Gonzalez F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr Issues Intest Microbiol* 8:15–24.
- Dolatowski ZJ, Stadnik J, Stasiak D. 2007. Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 6(3):89–99.
- Donalson LM, Kim WK, Chalova VI, Herrera P, McReynolds JL, Gotcheva VG, Vidanovic D, Woodward CL, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. 2008a. In vitro fermentation response of laying hen cecal bacteria to combinations of fructooligosaccharide prebiotics with alfalfa or a layer ration. *Poult Sci* 87(7):1263–75.
- Donalson LM, McReynolds JL, Kim WK, Chalova VI, Woodward CL, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. 2008b. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal shedding in laying hens. *Poult Sci* 87(7):1253–62.
- Doyle MP, Erickson MC. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci* 85:960–73.
- Dunkley KD, Callaway IR, Chalova VI, McReynolds JL, Hume ME, Dunkley CS, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe* 15(1–2):26–35.
- Dunn J. 1996. Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs. *Poult Sci* 75(9):1133–6.
- Durant JA, Corrier DE, Byrd JA, Stanker LH, Ricke SC. 1999. Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella* Enteritidis colonization and invasion of Leghorn hens. *Appl Environ Microbiol* 65(5):1919–23.
- Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. 2000. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella* Typhimurium. *J Food Prot* 63(5):573–8.
- EC. 2001. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on product Toyocerin® for use as feed additive, DG SANCO, p. 1–13. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72_en.pdf. Posted on and accessed Dec 5, 2001.
- EC 2003. Regulation no. 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. *Off J European Union*. 12.12.2003. L325/1–15. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0001:0015:EN:PDF>. Accessed Nov 1, 2012.
- EC. 2007a. Commission Regulation (EC) No. 557/2007 of 23 May 2007, laying down rules for implementing Council Regulation (EC) No. 1028/2006 on marketing standards for eggs. *Official Journal of the European Union* L 132/5–9. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:32:0005:0020:EN:PDF>. Accessed Nov 5, 2012.
- EC. 2007b. Commission Regulation (EC) No. 1237/2007 of October 2007 amending Regulation (EC) No. 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and Decision 2006/696/EC as regards the placing on the market of eggs from *Salmonella*-infected flocks of laying hens. *Official Journal of the European Union* L280/5:3–5. Available from: http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Legislation_Update/Reg1237_2007.pdf. Posted Oct 24, 2007. Accessed March 14, 2012.
- EC. 2008. Commission Regulation (EC) No 589/2008 of 23 June 2008 laying down detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 1237/2007 as regards marketing standards for eggs. *Official Journal of the European Union* L163/6:6. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:163:0006:0023:EN:PDF>. Posted June 24, 2008. Accessed Oct 1, 2012.
- EFSA. 2004. Opinion on the scientific panel on biological hazards on the requests from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *EFSA J* 114:1–74. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/114.pdf>. Posted Dec 2, 2004. Accessed March 14, 2012.
- EFSA. 2005. Opinion of the Scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to microbiological risks on washing of table eggs. *EFSA J* 269:1–39.
- EFSA. 2008. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA J* 720:1–84.
- EFSA. 2010. Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *EFSA J* 8(4):42–9.
- EFSA. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J* 9(3):378.
- EFSA. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J* 10:442.
- Eriksson de Rezende CL, Mallinson ET, Tablant NL, Morales R, Park A, Carr LE, Joseph SW. 2001. Effect of dry litter and airflow in reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* populations in the broiler production environment. *J Appl Poult Res* 10(3):245–51.
- Erwing WN. 2009. *The living gut*. 2nd ed. Thrumpton, UK: Nottingham Univ. Press. p 192.
- Fabrizio KA, Cutter CN. 2003. Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 66(8):1379–84.
- Fancher BI, Rollins D, Trimbee B. 1996. Feed processing using the annular gap expander and its impact on poultry performance. *J Appl Poult Res* 5(4):386–94.
- Farnell MB, Donoghue AM, Solis de los Santos F, Blore PJ, Hargis BM, Tellez G, Donoghue DJ. 2006. Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poult Sci* 85(11):1900–6.
- Favier GI, Escudero ME, Velazquez L, De Guzman AMS. 2000. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria in eggshell by washing with surfactants and their effect on the shell microstructure. *Food Microbiol* 17(1):73–81.
- FDA. 2000. Food labeling, safe handling statements, labeling of shell eggs; refrigeration of shell eggs held for retail distribution. Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2000-12-05/pdf/00-30761.pdf>. Accessed Oct 28, 2012.
- FDA. 2009a. Code of Federal Regulations, title 21, parts 16 and 118. Federal Register Final Rule: Guidance for industry. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production, storage and transportation. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodSafety/UCM285137.pdf>. Accessed Oct 28, 2012.
- FDA. 2009b. Food Code. Recommendations of the United States Public Health Service Food and Drug Administration. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2009/UCM189448.pdf>. Accessed Nov 5, 2012.
- Fedorka-Cray PJ, Hogg A, Gray TJ, Lorenzen K, Velasquez J, VonBehren P. 1997. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. *Swine Health Prod* 5(5):189–93.
- Fernandez F, Hinton M, Van Gils B. 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathol* 31(1):49–58.
- Fife MS, Salmon N, Hocking PM, Kaiser P. 2009. Fine mapping of the chicken salmonellosis resistance locus (SAL1). *Anim Genet* 40(6):871–7.
- Foster JW. 2001. Acid stress responses of *Salmonella* and *E. coli*: survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *J Microbiol* 39(2):89–94.
- Fukata TK, Sasai Y, Miyamoto T, Baba E. 1999. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly or in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. *J Food Prot* 62(3):229–33.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66(5):365–78.
- Furuta K, Shigeichi M, Shizuo S. 1980a. Bacterial contamination in feed ingredients, formulated chicken feed and reduction of viable bacteria by pelleting. *Lab Anim* 14(3):221–24.
- Furuta K, Iwao O, Shigeichi M. 1980b. Effect of steam temperature in the pelleting process of chicken food on the viability of contaminating bacteria. *Lab Anim* 14(4):293–96.
- Gaggia F, Di Gioia D, Baffoni L, Biavati B. 2011. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends Food Sci Technol* 22(Suppl. 1):S58–66.
- Galán JE. 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol*(17):53–86.
- Galvez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R. 2010. Microbial antagonists to foodborne pathogens and biocontrol. *Curr Opin Biotechnol* 21(2):142–8.
- Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F, Pasmans F, Van Immerseel F. 2006. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac E and TAD *Salmonella* vac T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 24(37–39):6250–5.

- Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2008. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol* 37(4):399–406.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 33(4):718–38
- Garcia P, Martinez B, Obeso JM, Rodriguez A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* 47(6): 479–85.
- Gast RK. 2007. Serotype-specific and Serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis* 51(4):817–28.
- Gast RK, Beard CW. 1990. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis* 34(4):991–3.
- Gast RK, Guard JY. 2011. Controlling egg contamination with *Salmonella* Enteritidis by understanding its pathobiology. XXII Latin American Poultry Congress, 6–9 September 2011, Buenos Aires, Argentina. Available from: <http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/health/forums/controlling-egg-contamination-t5344/165-p0.htm>. Accessed Oct 26, 2012.
- Gast RK, Holt PS. 2000. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poult Sci* 79(4): 559–63.
- Gast RK, Holt PS. 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poult Sci* 80(7):997–1002.
- Gast RK, Guard-Petter J, Holt PS. 2002. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Dis* 46(3):629–35.
- Gast RK, Guard-Bouldin J, Holt PS. 2004. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 48(4):863–9.
- Gast RK, Holt PS, Guraya R. 2006. Effect of refrigeration on in vitro penetration of *Salmonella* Enteritidis through the egg yolk membrane. *J Food Prot* 69(6):1426–9.
- Gast RK, Guraya R, Guard-Bouldin J, Holt PS, Moore RW. 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis of *Salmonella* Heidelberg. *Avian Dis* 51(1):40–4.
- Girard-Santosuoso O, Lantier F, Lantier I, Bumstead N, Elsen JM, Beaumont C. 2002. Heritability of susceptibility to *Salmonella* Enteritidis infection in fowls and test of the role of the chromosome carrying the NRAMP1 gene. *Genet Sel Evol* 34(2):211–9.
- Golden NJ, Marks HH, Coleman ME, Schroeder CM, Bauer NE, Schlosser WD. 2008. Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet Microbiol* 131(3–4):215–28.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2003. Immunology, 6th ed. New York, N.Y., W.H. Freeman and Co. p 574.
- Gordon DM, Oliver E, Littlefield-Wyer J. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. 1st ed. Berlin, Springer. p 5–18.
- Grizard D, Barthomeuf C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reprod Nutr Dev* 39(5–6):563–88.
- Groisman EA. 2001. Principles of bacterial pathogenesis. London: Academic Press. p 826.
- Gürtler M, Methner U, Kobilke H, Fehlhaber K. 2004. Effect of orally administered egg yolk antibodies on *Salmonella* Enteritidis contamination of hen's eggs. *J Vet Med* 51(3):129–34.
- Gusils C, Gonzalez SN, Oliver G. 1999. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. *Can J Microbiol* 45(12):981–7.
- Guzel-Seydim Z, Bever Jr PI, Greene AK. 2004a. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiol* 21(4):475–9.
- Guzel-Seydim Z, Greene AK, Seydim AC. 2004b. Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Sci Technol* 37(4):453–60.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2004. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. p 456.
- Hacking WC, Mitchell WR, Carlson HC. 1978. *Salmonella* investigation in an Ontario fed mill. *Can J Comp Med* 42(4):400–6.
- Hammack TS, Sherrod PS, Bruce VR, June GA, Satchell FB, Andrews WH. 1993. Research note: growth of *Salmonella* Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poult Sci* 72(2):373–7.
- Hancock REW, Chapple DS. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43(6):1317–23.
- Health Canada. 2011. Guidance for industry on reducing the risk of *Salmonella* Enteritidis in Canadian shell eggs. Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/consult/Salmonella-egg-aefuf/redu-Salmonella-egg-aefuf-eng.php>. Accessed Nov 5, 2012.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EH, Gorris LGM, VonWright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* 46(9):3590–5.
- Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin: Springer. p 45–92.
- Henzler DJ, Opitz HM. 1992. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis* 36(3):625–31.
- Hierro E, Manzano S, Ordóñez JA, De la Hoz L, Fernandez M. 2009. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *Int J Food Microbiol* 135(2):125–30.
- Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM. 2005a. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult Sci* 84(7):1141–5.
- Hogue A, White P, Guard-Petter J, Schlosser W, Gast R, Ebel E, Farrar J, Gomez T, Madden J, Madison M, McNamara AM, Morales R, Parham D, Sparling P, Sutherland W, Swerdlow D. 1997. Epidemiology and control of egg-associated *Salmonella* Enteritidis in the United States of America. *Rev Sci Tech* 16(2):542–53.
- Holt PS. 1995. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted and unmolted laying chickens. *Avian Dis* 39(2):239–49.
- Holt PS. 1999. Impact of induced molting on immunity and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in laying hens. In: Saeed AM, Gast RK, Potter ME, Wall PG, editors. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals - epidemiology, pathogenesis, and control. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p367–75.
- Holt PS, Mitchell BW, Gast RK. 1998. Airborne horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted laying chickens. *Avian Dis* 42(1):45–52.
- Holt PS, Geden CJ, Moore RW, Gast RK. 2007. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. *Appl Env Microbiol* 73(19):6030–5.
- Holt PS, Davies RH, Dewulf J, Gast RK, Huwe JK, Jones DR, Waltman D, Willian KR. 2011. The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poult Sci* 90(1):251–62.
- Howard ZR, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC. 2012. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. *Food Res Int* 45(2):755–64.
- Huang Y-R, Hung Y-C, Hsu S-Y, Huang Y-W, Hwang D-F. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19(4):329–45.
- Humphrey TJ, Whitehead A. 1993. Egg age and the growth of *Salmonella* Enteritidis PT4 in egg contents. *Epidemiol Infect* 111(2):209–19.
- Hutchison ML, Gittins J, Walker A, Moore A, Burton C, Sparks N. 2003. Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. *World Poult Sci J* 59(2):233–48.
- Hutchison ML, Gittins J, Walker A, Sparks N, Humphrey TJ, Burton C, Moore A. 2004. An assessment of the microbiological risks involved with egg washing under commercial conditions. *J Food Prot* 67(1):4–11.
- Ibarra JA, Steele-Mortimer O. 2009. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* 11(11):1579–86.
- ICMSF. Intl. Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2005. Feeds and pet foods. In: *Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*. New York, N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 250–70.
- Jaczynski J, Park JW. 2003. Microbial inactivation and electron penetration in Surimi seafood during electron beam processing. *J Food Sci* 68(5):1788–92.
- Jim LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poult Sci* 79(6):886–91.

- Joerger RD. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci* 82(4):640–7.
- Johny AK, Darre MJ, Hoagland TA, Schreiber DT, Donoghue AM, Donoghue DJ, Venkitanarayanan K. 2008. Antibacterial effect of *trans*-cinnamaldehyde on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken drinking water. *J Appl Poult Res* 17(4):490–7.
- Jones FT. 2006. Control of toxic substances. *Feedstuffs* 80(38):77–81.
- Jones FT. 2011. A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. *J Appl Poult Res* 20(1):102–13.
- Jones FT, Richardson KE. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult Sci* 83(3):384–94.
- Jones DR, Anderson KE, Curtis PA, Jones FT. 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: effects of layer strain and hen age. *Poult Sci* 81(5):715–20.
- Jones DR, Musgrove MT, Caudill AB, Curtis PA, Northcutt JK. 2005. Microbial quality of cool water washed shell eggs. *Int J Poult Sci* 4(12):938–43.
- Juven BJ, Pierson MD. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J Food Prot* 59(11):1233–41.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2682–4.
- Kassaify ZG, Mine Y. 2004a. Nonimmunized egg yolk powder can suppress the colonization of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* in laying hens. *Poult Sci* 83(9):1497–506.
- Kassaify ZG, Mine Y. 2004b. Effect of food protein supplements on *Salmonella* Enteritidis infection and prevention in laying hens. *Poult Sci* 83(5):753–60.
- Kassaify ZG, Li EW, Mine Y. 2005. Identification of antiadhesive fraction(s) in nonimmunized egg yolk powder: *in vitro* study. *J Agric Food Chem* 53(11):4607–14.
- Kayes MM, Critzer FJ, Kelly-Wintenberg K, Reece Roth J, Montie TC, Golden DA. 2007. Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Foodborne Pathog Dis* 4(1):50–9.
- Keery I. 2010. *Salmonella* Enteritidis control programs in the Canadian Poultry Industry, Surveillance and Epidemiology Advisory Committee. 43–69. Available from: http://www.agf.gov.bc.ca/lhmr/pubs/se_control_programs0910.pdf. Accessed September 2010.
- Keklik NM, Demirci A, Patterson PH, Puri VM. 2009. Decontamination of shell-eggs with pulsed UV-light, ASABE Annual Intl. Meeting, Reno, Nevada, June 2009, 1–10.
- Keshavarz K, Quimby FW. 2002. An investigation of different molting techniques with an emphasis on animal welfare. *J Appl Poult Res* 11(1):54–67.
- Khadre MA, Yousef AE, Kim J-G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J Food Sci* 66(9):1242–52.
- Khan MI, Fadl AA, Venkitanarayanan KS. 2003. Reducing colonization of *Salmonella* Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins. *J Appl Microbiol* 95(1):142–5.
- Kim J-W, Slavik MF. 1996. Changes in eggshell surface microstructure after washing with cetylpyridinium chloride or trisodium phosphate. *J Food Prot* 59(8):859–63.
- Kim C, Hung YC, Brachett RE. 2000a. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 61(2–3):199–207.
- Kim C, Hun YC, Brachett RE. 2000b. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for inactivation of food-related pathogens. *J Food Prot* 63(1):19–24.
- Kinde H, Castellan DM, Kerr D, Campbell J, Breitmeyer R, Ardans A. 2005. Longitudinal monitoring of two commercial layer flocks and their environments for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and other *Salmonella* e. *Avian Dis* 49(2):189–94.
- Knappe KD, Chavez C, Burgess RP, Coufal CD, Carey JB. 2002. Comparison of eggshell surface microbial populations for in-line and off-line commercial egg processing facilities. *Poult Sci* 81(5):695–98.
- Kornschober C, Mikula C, Springer B. 2009. Salmonellosis in Austria: situation and trends. *Wien Klin Wochenschr* 121(3–4):96–102.
- Krittika N, Gi-Hyung R. 2012. Inhibitory effect of plant extracts on *Salmonella* spp. *Salmonella* – a dangerous foodborne pathogen. Barakat DD, Mahmoud SM, editors. Croatia: InTech. Available from: http://cdn.intechopen.com/pdfs/26434/InTech-Inhibitory_effect_of_plant_extract_on_Salmonella_spp.pdf. Accessed Nov 18, 2012.
- Kumar Y. 2012. *Salmonella* – a diversified superbug, Croatia, Croatia: InTech. p 562.
- Kwon YM, Ricke SC. 1998. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. *Appl Environ Microbiol* 64(9):3458–63.
- Lakins DG, Alvarado CZ, Thompson LD, Brashears MT, Brooks JC, Brashears MM. 2008. Reduction of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs using directional microwave technology. *Poult Sci* 87(5):985–91.
- Laroussi M, Leipold F. 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrometry* 233(1–3):81–6.
- Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. 2003. Plasma interaction with microbes. *New J Phys* 5(1):41.1–41.10.
- Leatham GF. 1982. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. *Forest Prod J* 32(8):29–35.
- Lee HS, Ahn YN. 1998. Growth-inhibiting effects of Cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem* 46(1):8–12.
- Lee KW, Everts H, Beynen AC. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int J Poult Sci* 3(12):738–52.
- Leonelli C, Mason TJ. 2010. Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry. *Chem Eng Proc* 49(9):885–900.
- Levin BR, Bull JJ. 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol* 2(2):166–73.
- Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S. 2009. Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. *Avian Pathol* 38(2):97–106.
- Li X, Bethune LA, Jia Y, Lovell RA, Proescholdt TA, Benz SA, Schell TC, Kaplan G, McChesney DG. 2012. Surveillance of *Salmonella* prevalence in animal feeds and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. *Foodborne Pathog Dis* 9(8):692–8.
- Lima ET, Andreatti Filho RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. 2007. Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Can J Vet Res* 71(2):103–7.
- Lin J. 2009. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathog Dis* 6(7):755–65.
- Line JE, Bailey JS, Cox NA, Stern NJ, Tompkins T. 1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poult Sci* 77(3):405–10.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 52(3):1094–100.
- Linke D, Goldman A. 2011. Bacterial adhesion – chemistry, biology and physics. 1st ed. New York, N.Y.: Springer Science and Business Media BV. p 368.
- Liu W, Yang Y, Kwang J. 2001. Induction of humoral immune responses and protective immunity in chickens against *Salmonella* Enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. *Avian Dis* 45(4):797–806.
- Lock JL, Board RG. 1992. Persistence of contamination in hens' egg albumen *in vitro* with *Salmonella* serotypes. *Epidemiol Infect* 108(3):389–96.
- Lublin A, Sela S. 2008. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the eggs. *Poult Sci* 87(11):2208–14.
- Lucore LA, Jones FT, Anderson KE, Curtis PA. 1997. Internal and external bacterial counts from shells of eggs washed in a commercial-type processor at various wash-water temperatures. *J Food Prot* 60(11):1324–8.
- Maciorowski KG, Herrera P, Kundiger MM, Ricke SC. 2006. Animal feed production and contamination by foodborne *Salmonella*. *J Verbr Lebensm* 1(3):197–209.
- Maciorowski KG, Herrera P, Jones FT, Pillai SD, Ricke SC. 2007. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Anim Feed Sci Tech* 133(1–2):109–36.
- MacKenzie MA, Bains BS. 1976. Dissemination of *Salmonella* serotypes from raw feed ingredients to chicken carcasses. *Poult Sci* 55(3):957–60.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50(6):882–9.

- Marriott NG, Gravani RB. 2006. Principles of food sanitation. 5th ed. New York, N.Y.: Springer Science and Business Media. p 413.
- Martelli F, Davies RH. 2012. *Salmonella* serovars isolated from table eggs: an overview. *Food Res Int* 45(2):745–54.
- Mastroeni P, Grant A, Restifo O, Maskell D. 2009. A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat Rev Microbiol* 7(1):73–80.
- Messens W, Dubocage L, Grijspeerdt K, Heyndrickx M, Herman L. 2004. Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected to storage prior to inoculation. *Food Microbiol* 21(1):25–32.
- Mian LS, Maag H, Tacal JV. 2002. Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. *J Vector Ecol* 27(1):82–5.
- Miyamoto T, Horie T, Fujiwara T, Sasai K, Baba E. 2000. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. *Poult Sci* 79(1):7–11.
- Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. 2001. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 226(1–2): 1–21.
- Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. 2010. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol* 51(4):363–9.
- Moreau M, Orange N, Feuilloley MGJ. 2008. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol Adv* 26(6):610–7.
- Mukhopadhyay S, Ramaswamy R. 2012. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: a review. *Food Res Int* 46(2):666–77.
- Murchie L, Whyte P, Xia B, Horrigan S, Louise K, Madden RH. 2007. Prevalence of *Salmonella* in Grade A whole shell eggs in the island of Ireland. *J Food Prot* 70(5):1238–43.
- Musgrove MT, Shaw JD, Harrison MA. 2012. *Salmonella* collected from nest run cart shelves in commercial shell egg processing facilities. *Poult Sci* 91(9):2386–9.
- Nabbut NH. 1978. *Salmonella* serotypes encountered in animal feed additives in Lebanon. *Amer J vet Res* 39(5):893–95.
- Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, Sato S. 1994. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis* 38(4):717–24.
- Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR. 1993. Effect of a mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on *Salmonella* Typhimurium colonization in broiler chicks. *Avian Dis* 37(2):528–35.
- Nys Y, Van Immerseel F. 2009. SAFEHOUSE et RESCAPE: deux projets Européens pour contrôler la contamination liée à *Salmonella* dans les systèmes alternatifs de production d'œufs. Available from: http://www.international.inra.fr/partnerships/with_the_private_sector/live_from_the_labs/safehouse_and_rescape. Accessed Nov 12, 2012.
- O'Bryan CA, Crandall PG, Chalova VI, Ricke SC. 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *J Food Sci* 73(6):264–7.
- Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA, Tani H, Sasai K, Baba E, Lillehoj EP. 2005. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 107(3–4):327–35.
- Okamura M, Sonobe M, Obara S, Kubo R, Nagai R, Noguchi M, Takehara K, Nakamura M. 2010. Potential egg contamination by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 following experimental infection of pullets at the onset of lay. *Poult Sci* 89(8):1629–34.
- Olsen AR, Hammack TS. 2000. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aeneovens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. *J Food Prot* 63(7):958–60.
- Omwandho COA, Kubota T. 2010. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: a mini-review of contamination routes and limitations to effective control. *Jpn Agric Res Q* 44(1):7–16.
- Ordoñez G, Llopis N, Penalver P. 2008. Efficacy of eugenol against a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in commercial layers in production. *J Appl Poult Res* 17(3):376–82.
- Ouweland AC, Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H, Rautonen N. 2010. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Vet Med* 55(2):71–8.
- Padron M. 1995. *Salmonella* Typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis* 34(2):463–5.
- Park CM, Hung YC, Brackett RE. 2002a. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int J Food Microbiol* 72(1–2):77–83.
- Park H, Hung YC, Kim C. 2002b. Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. *J Food Prot* 65(8):1276–80.
- Pascual M, Hugas M, Badiola JI, Monfort JM, Garriga M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4981–6.
- Patterson JA, Burkholder KM. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 82(4):627–31.
- Perry JJ, Rodriguez-Romo LA, Yousef AE. 2008. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in shell eggs by sequential application of heat and ozone. *Lett Appl Microbiol* 46(6):620–5.
- Perry JJ, Yousef AE. 2011. Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques. *Annu Rev Food Sci Technol* 2:281–98.
- Peschel A, Sahl HG. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529–36.
- Pithva S, Ambalam P, Dave JM, Vyas BRM. 2011. Antimicrobial peptides of probiotic *Lactobacillus* strains. In: Mendez-Vilas A, editor. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Vol. 1. Badajoz, Spain: FORMATEX. p 987–91.
- Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol* 87(3):207–16.
- Pohuang T, Chuachan K, Sarachu K. 2009. Effect of *Punica granatum* L. rind extract against *Salmonella* Enteritidis on eggshells and eggshell membranes. *KKU Vet J* 19(1):38–47.
- Pomares MF, Salomon RA, Pavlova O, Severinov K, Farias R, Vincent PA. 2009. Potential applicability of cymotrypsin-susceptible microcin J25 derivatives to food preservation. *Appl Environ Microbiol* 75(17):5734–8.
- Pontier-Bres R, Prodon F, Munro P, Rampal P, Lemichez E, Peyron JF, Czerucka D. 2012. Modification of *Salmonella* Typhimurium motility by the probiotic yeast strain *Saccharomyces boulardii*. *PLoS One* 7:e33796. Available from: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033796>. Accessed July 30, 2012.
- Portrait V, Gendron-Gaillard S, Cottenceau G, Pons AM. 1999. Inhibition of pathogenic *Salmonella* Enteritidis growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Rev Can de Microbiol* 45(12):988–94.
- Prévost K, Magal P, Protais J, Beaumont C. 2008. Effect of genetic resistance of the hen to *Salmonella* carrier-state on incidence of bacterial contamination: synergy with vaccination. *Vet Res* 39(2):20.
- Ragni L, Berardinelly A, Vannini L, Montanari C, Sirri F, Guertzoni ME, Guarneri A. 2010. Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *J Food Eng* 100:125–32.
- Raspot R, Gantois I, Devloo R, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2011. *Salmonella* Enteritidis universal stress protein (*usp*) gene expression is stimulated by egg white and supports oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Vet Microbiol* 153(1–2):186–90.
- Revolledo L, Ferreira AJP, Mead GD. 2006. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics and enhancement of avian intestinal immunity. *J Appl Poult Res* 15(2):341–51.
- Ricke SC. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 82(4):632–9.
- Riganakos KA. 2010. Food irradiation techniques. In: Arvanitoyannis IS, editor. Irradiation of food commodities. New York, N.Y.: Elsevier Inc. p 710.
- Riley MA, Wertz JE. 2002a. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84(5–6):357–64.
- Riley MA, Wertz JE. 2002b. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu Rev Microbiol* 56:117–37.
- Rodriguez-Romo LA, Yousef AE. 2005. Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *J Food Prot* 68(4):711–7.
- Rodriguez-Romo LA, Vurma M, Lee K, Yousef AE. 2007. Research note: penetration of ozone across the shell of hen eggs. *Ozone Sci Eng* 29(2):147–50.
- Rossi LM, Rangasamy P, Zhang J, Qiu XQ, Wu GY. 2008. Research advanced in the development of peptide antibiotics. *J Pharm Sci* 97(3):1060–70.
- Roy MF, Malo D. 2002. Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice. *Genes Immun* 3:381–93.

- Russell SM. 2003. The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poult Sci* 82(1):158–62.
- Sadeyen JR, Trotter J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow PA, Bumstead N, Lalmanach AC. 2004. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes Infect* 6(14):1278–86.
- Sadeyen JR, Trotter J, Protais J, Beaumont C, Sellier N, Salvat G, Velge P, Lalmanach AC. 2006. *Salmonella* carrier state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. *Microbes Infect* 8(5):1308–14.
- Salminen SJ, Nybom S, Meriluoto J, Collado MS, Vertsvelung S, El-Nezami H. 2010. Interaction of probiotics and pathogens – benefits to human health? *Curr Opin Biotechnol* 21(2):157–67.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infect Dis* 17(1):7–15.
- Schneitz C. 2005. Competitive exclusion in poultry – 30 years of research. *Food Control* 16(8):657–67.
- Schneitz C, Mead GC. 2000. Competitive exclusion. In: Wray C, Wray W, editors. *Salmonella* in domestic animals. Oxon: CAB Publishing, CAB Intl. p 301–22.
- Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wang AC. 1995. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol* 24(3):385–93.
- Seo KH, Holt PS, Gast RK, Hofacre CL. 2000. Combined effect of antibiotic and competitive exclusion treatment on *Salmonella* Enteritidis fecal shedding in molted laying hens. *J Food Prot* 63(4):545–8.
- Seo KH, Holt PS, Gast RK. 2001. Comparison of *Salmonella* Enteritidis infection in hens molted via long-term feed withdrawal versus full-fed wheat middling. *J Food Prot* 64(12):1917–21.
- Serrano LE, Murano EA, Shenoy K, Olson DG. 1997. D values of *Salmonella* Enteritidis isolates and quality attributes of shell eggs and liquid whole eggs treated with irradiation. *Poult Sci* 76(1):202–5.
- Shah DH, Zhou X, Addwebi T, Davis MA, Call DR. 2011. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis clinical strains isolated from North America. *Arch Microbiol* 193(11):811–21.
- Shirota K, Katoh H, Ito T, Otsuki K. 2000. *Salmonella* contamination in commercial layer feed in Japan. *J Vet Med Sci* 62(7):789–91.
- Sirsat SA, Muthaiyan A, Ricke SC. 2009. Antimicrobials for foodborne pathogen reduction in organic and natural poultry production. *J Appl Poult Res* 18(2):379–88.
- Sommers CH, Sites JE, Musgrove M. 2010. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. *J Food Saf* 30(2):470–79.
- Sterzo EV, Paiva JB, Mesquita AL, Freitas Neto OC, Berchieri A. 2007. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. *Braz J Poult Sci* 9(1):69–73.
- Stott JA, Hodgson JE, Chaney JC. 1975. Incidence of *Salmonella e* in animal feed and the effect of pelleting on content of enterobacteriaceae. *J Appl Bacteriol* 39(1):41–6.
- Sugita-Konichi Y, Sakanaka S, Sasaki K, Juneja LR, Noda T, Amano F. 2002. Inhibition of bacterial adhesion and *Salmonella* infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. *J Agric Food Chem* 50(12):3607–13.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris Jr J. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):649–59.
- Šušćković J, Kos B, Goretta J, Matošić S. 2001. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol Biotechnol* 39(3):227–35.
- Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Kovalev YN, Stepanshin YG, Siragusa GR, Seal BS, Stern NJ. 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E50–52 bacteriocin. *J Agric Food Chem* 56:1942–8.
- Tahergorabi R, Matak KE, Jaczynski J. 2012. Application of electron beam to inactivate *Salmonella* in food: Recent developments. *Food Res Int* 45(2):685–94.
- Tellez IG, Trejo RM, Sanchez RE, Cenicerros RM, Luna QP, Zazua P, Hargis BM. 1995. Effect of gamma irradiation on commercial eggs experimentally inoculated with *Salmonella* Enteritidis. *Radiat Phys Chem* 46(4):789–92.
- Tellez G, Petrone VM, Escorcía M, Morishita TY, Cobb CW, Villasenor L, Promsopone B. 2001. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* Enteritidis-, *Salmonella* Typhimurium- and *Salmonella* Heidelberg-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* Enteritidis in broilers. *J Food Prot* 64(3):287–91.
- Tellez G, Pixley C, Wolfenden RE, Layton SL, Hargis BM. 2012. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* in poultry. *Food Res Int* 45(2):628–33.
- Thomas M, van der Poel AFB. 1996. Physical quality of pelleted animal feed. 1. Criteria for pellet quality. *Anim Feed Sci Technol* 61(1–4):89–112.
- Thomas M, van Zuilichem DJ, van der Poel AFB. 1997. Physical quality of pelleted animal feed. 2. Contribution of processes and its conditions. *Anim Feed Sci Technol* 64(2–4):173–92.
- Thomas M, van Vliet T, van der Poel AFB. 1998. Physical quality of pelleted animal feed. 3. Contribution of feedstuff components. *Anim Feed Sci Technol* 70(1–2):59–78.
- Thompson JL, Hinton M. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonella* s in the crop. *Br Poult Sci* 38(1):59–65.
- Toro H, Price SB, McKee S, Hoerr FJ, Krehling J, Perdue M, Bauermeister L. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis* 49(1):118–24.
- Toyota-Hanatan Y, Ekawa T, Ohta H, Igimi S, Hara-Kudo Y, Sasai H, Baba E. 2009. Public health assessment of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis inactivated-vaccine treatment in layer flocks. *Appl Environ Microbiol* 75(4):1005–10.
- Turnbull PCB, Snoeyenbos GH. 1973. The roles of ammonia, water activity and pH in the *Salmonella* cidal effect of long-used poultry litter. *Avian Dis* 17(1):72–86.
- Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol* 174(4):233–8.
- Ulusoy BH, Colak H, Hampikyan H. 2007. The use of ultrasonic waves in food technology. *Res J Biol Sci* 2(4):491–7.
- Umali DV, Lapuz RR, Suzuki T, Shirota K, Katoh H. 2012. Transmission and shedding patterns of *Salmonella* in naturally infected captive wild roof rats (*Rattus rattus*) from a *Salmonella*-contaminated layer farm. *Avian Dis* 56(2):288–94.
- USDA 2005. Code of Federal Regulations. 21 CFR 179.26(b) Ionizing radiation for the treatment of food. Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2005-title21-vol3/xml/CFR-2005-title21-vol3-sec179-26.xml>. Accessed Nov 16, 2012.
- Van Coillie E, Goris J, Cleenwerck I, Grijspeerd K, Botteldoorn N, Van Immerseel F, De Buck J, Vancanney M, Swings J, Herman L, Heyndrickx M. 2007. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. *J Appl Environ* 102(4):1095–106.
- Van der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP, van Knapen F. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broilers chickens during growth. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2536–40.
- Van Hoorebeke S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Dewulf J. 2011. The influence of the housing system on *Salmonella* infections in laying hens: a review. *Zoonoses Public Hlth* 58(5):304–11.
- Van Immerseel F, Cauwerts K, Devirese LA, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World's Poult Sci J* 58(4):501–13.
- Van Immerseel F, Boyen F, Gantois I, Timmermont L, Bohez L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2005a. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult Sci* 84(12):1851–6.
- Van Immerseel F, De Buck J, Boyen F, Pasmans F, Bertrand S, Collard JM, Saegerman C, Hooyberghs J, Haesebrouck D, Ducatelle R. 2005b. *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les oeufs: un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann Med Vet* 149:34–48.
- Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. 2005c. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect* 133(6):959–78.
- Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timmermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol* 35(3):182–8.

- Van Immerseel F, Eeckhaut V, Teirlinck E, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2007. Mechanisms of action of nutritional tools to control intestinal zoonotic pathogens. Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition, August 26–30, 2007, Strasbourg, France: World Poultry Science Assn.
- Van't Hof W, Veerman ECI, Helmerhorst EJ, Amerongen AVN. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 382(4):597–619.
- Vandeplas S, Dubois Dauphin R, Beckers Y, Thonart P, Théwis A. 2010. *Salmonella* in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *J Food Prot* 73(4):774–85.
- Veldman A, Vahl HA, Borggreve GJ, Fuller DC. 1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and *Enterobacteriaceae* in poultry feeds and feed components. *Vet Record* 136(7):169–172.
- Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle M. 1999. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Appl Env Microbiol* 65(9):4276–9.
- Vicente JL, Lopez C, Avila E, Morales E, Hargis BM, Tellez G. 2007. Effect of dietary natural capsaicin on experimental *Salmonella* Enteritidis infection and yolk pigmentation in laying hens. *Int J Poultry Sci* 6(6):393–6.
- Vila B, Fontgibell A, Badiola I, Esteve-Garcia E, Jimenez G, Castillo M, Brufau J. 2009. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var toyoi inclusion in poultry feeds. *Poult Sci* 88(5):975–9.
- Wagner RD, Cerniglia CE. 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of competitive exclusion bacteria applied to newly hatched chickens. *Int J Food Microbiol* 102(3):349–53.
- Wales A, Davies R. 2011. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathol* 40(5):429–36.
- Wales A, Breslin M, Carter B, Sayers R, Davies R. 2007. A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathol* 36(3):187–97.
- Wang H., Slavik M.F. 1998. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *J Food Prot* 61(3):276–9.
- Waseh S, Hanifi-Moghaddam P, Coleman R, Masotti M, Ryan S, Foss M, MacKenzie R, Henry M, Szymanski CM, Tanha J. 2010. Orally administered P22 phage tailspike protein reduces *Salmonella* colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. *PlosOne* 5(11):e13904.
- Wekhof A, Trompeter F-J, Franken O. 2001. Pulsed UV disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. The 1st Intl. Conference on Ultraviolet Technologies, June 14–16, Washington, D.C., USA, 1–15.
- Whitelaw CBA, Sang HM. 2005. Disease-resistant genetically modified animals. *Bull Off Int Epizoot* 24(1):275–83.
- Whyte P, McGill K, Collins JD. 2003. A survey of the prevalence of *Salmonella* and other enteric pathogens in a commercial poultry feed mill. *J Food Safety* 23(1):13–24.
- Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, De Kruijff B, Sahl HS. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 276(1):1772–9.
- Wigley P. 2004. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. *Res Vet Sci* 76(3):165–9.
- Willis WL, Goktepe I, Isikhuemhen OS, Reed M, King K, Murray C. 2008. The effect of mushroom and pokeweed extract on *Salmonella*, egg production and weight loss in molting hens. *Poult Sci* 87(12):2451–7.
- Windisch W, Schedle K, Pletzner C, Kroismayr A. 2008. Use of phytochemical products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci* 86(E suppl.):E140–8.
- Wong PYY, Kitts DD. 2003. Physicochemical and functional properties of shell eggs following electron beam irradiation. *J Sci Food Agric* 83(1):44–52.
- Woodling SE, Moraru CI. 2005. Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *J Food Sci* 70(7):M345–51.
- Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S. 2002. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol* 31(4):383–92.
- Woodward CL, Kwon YM, Kubena LF, Byrd JA, Moore RW, Nisbet DJ, Ricke SC. 2005. Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and invasion by an alfalfa diet during molt in Leghorn hens. *Poult Sci* 84(2):185–193.
- Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci* 82(6):1030–6.
- Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. 2011. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnol Adv* 29(6):860–8.
- Yun H, Jung Y, Lee KH, Song HP, Kim K, Jo C. 2012. Predicting optimal conditions to minimize quality deterioration while maximizing safety and functional properties of irradiated egg. *Rad Phys Chem* 81(8):1163–5.
- Zeidler G. 2001a. Processing and packaging shell eggs. In: Bell DD, Weaver Jr D, editors. Commercial chicken meat and egg production. Norwell, Mass.: Kluwer Academic Publishers. p 1129–61.
- Ziprin RL, Deloach JR. 1993. Comparison of probiotics maintained by *in vivo* passage through laying hens and broilers. *Poult Sci* 72(4):628–35.

The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis

Shannon E. Majowicz,¹ Jennie Musto,³ Elaine Scallan,⁶ Frederick J. Angulo,⁶ Martyn Kirk,^{4,5} Sarah J. O'Brien,⁹ Timothy F. Jones,⁸ Aamir Fazil,² and Robert M. Hoekstra,⁷ for the International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies

¹Center for Food-borne, Environmental and Zoonotic Infectious Diseases and ²Laboratory for Food-borne Zoonoses, Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario, Canada; ³Communicable Diseases Branch, New South Wales Department of Health, and ⁴Department of Health and Ageing and ⁵Australian National University Canberra, Australia; ⁶Enteric Diseases Epidemiology Branch, ⁷Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Zoonotic, Vectorborne, and Enteric Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia; ⁸Tennessee Department of Health, Nashville; and ⁹School of Translational Medicine, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

To estimate the global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis, we synthesized existing data from laboratory-based surveillance and special studies, with a hierarchical preference to (1) prospective population-based studies, (2) “multiplier studies,” (3) disease notifications, (4) returning traveler data, and (5) extrapolation. We applied incidence estimates to population projections for the 21 Global Burden of Disease regions to calculate regional numbers of cases, which were summed to provide a global number of cases. Uncertainty calculations were performed using Monte Carlo simulation. We estimated that 93.8 million cases (5th to 95th percentile, 61.8–131.6 million) of gastroenteritis due to *Salmonella* species occur globally each year, with 155,000 deaths (5th to 95th percentile, 39,000–303,000 deaths). Of these, we estimated 80.3 million cases were foodborne. *Salmonella* infection represents a considerable burden in both developing and developed countries. Efforts to reduce transmission of salmonellae by food and other routes must be implemented on a global scale.

Salmonella species are a leading bacterial cause of acute gastroenteritis. Although the global human health impact of *Salmonella* infections has not been estimated, gastroenteritis is a major cause of morbidity and mortality, worldwide, both in children <5 years old [1, 2] and in the general population [3]. In a study from four developed countries, Scallan et al [3] estimated that the incidence of diarrheal disease ranged from 0.44 to 0.99 episodes per person-year; conservatively, such an incidence would translate into an order of 2.8 billion cases of diarrheal illness each year worldwide. Accurate estimates of the burden of diarrheal diseases caused by *Salmonella* species and other foodborne pathogens are needed to effectively set public health goals and allocate resources to reduce disease burden. Recently, the World Health Organization (WHO) established the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group to provide global foodborne disease estimates [4].

Although laboratory-based surveillance provides useful trend information, it underestimates disease burden [5–12]. To be ascertained in a laboratory-based surveillance system, an ill person must seek medical care, submit a specimen (usually stool), the laboratory must test for the pathogen and report a positive finding, and the laboratory-confirmed infection must be ascertained by public health authorities. Therefore, cases in laboratory-based surveillance represent a fraction of the total community cases. Several countries have conducted either prospective population-based studies, or cross-sectional surveys to determine the extent of the underascertainment within laboratory-based surveillance [6, 11, 13–16]. However, global estimates are difficult to calculate because many countries, particularly developing countries, have insufficient surveillance data.

In 2000, Crump et al [17] estimated the global burden of typhoid fever by summarizing available data and extrapolating to countries and regions where data were lacking. The WHO has recommended a similar approach for estimating the global burden of foodborne disease [18]. Thus, we synthesized existing data from the literature, special studies and laboratory-based surveillance to estimate the global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis.

Received 15 May 2009; accepted 23 November 2009; electronically published 16 February 2010.

Reprints or correspondence: Jennie Musto, Communicable Diseases Branch, NSW Health, LMB 961, North Sydney NSW 2059, Australia (jennie.musto@gmail.com).

Clinical Infectious Diseases 2010;50:882–889

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

1058-4838/2010/5006-0014\$15.00

DOI: 10.1093/cid/cir073

METHODS

Regional incidence. We classified the world population into 21 regions, as designated by the 2005 Global Burden of Disease, Injuries and Risk Factors Study (GBD; Table 1) [19]. We used the United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division year 2005 median fertility variant regional population estimates [20], and included the regional populations as point estimates (ie, without uncertainty) in the stochastic model.

We used a hierarchy of data sources to estimate the incidence of *Salmonella* gastroenteritis for each GBD region (Table 1). The ideal source was a prospective population-based study, in which a cohort of individuals was followed up to determine illness and collect specimens, and which estimated the incidence of *Salmonella* infection in the population. If such a study existed from a country within a GBD region, that incidence estimate was extrapolated to the entire region. If these data were not available, we used data from “multiplier studies” conducted in the region. Multiplier studies calculate the incidence of *Salmonella* by multiplying the incidence of laboratory-confirmed infections, ascertained from laboratory-based surveillance, by a *Salmonella*-specific multiplier which adjusts for under-ascertainment. If a multiplier study existed from a country within a GBD region, that incidence estimate was extrapolated to the entire region.

If neither a prospective population-based study nor a multiplier study existed in a GBD region, we used disease notification data from countries in the region, averaged among the countries within the region. To account for underascertainment, notification data were multiplied by a *Salmonella*-specific multiplier estimate obtained from the literature. If disease notification data were not available, we used an estimate of the incidence of *Salmonella* in foreign travelers returning from one or more countries in the region, with two adjustments. Because the incidence in foreign travelers represents only the fraction of travelers who seek care and submit stool once back in their home country, we adjusted for under-ascertainment using a *Salmonella*-specific multiplier estimate from the literature. Because the susceptibility of foreign travelers to infection is likely greater than the susceptibility of the resident population, potentially due to lack of prior exposure to regional serotypes or to differing exposure risks, we created a “correction factor” by comparing incidence estimates from returning travelers to those from the resident population, by region, where data allowed. In GBD regions where none of the above data sources were available, data were extrapolated from the geographically closest GBD region with either prospective population-based and multiplier study data, because such data were considered superior to the other data sources.

Disease notification data were obtained from institutional Web sites. Estimates of the incidence and underascertainment

of *Salmonella* were identified from the published scientific literature for the period 1966–2007 using the keyword “*Salmonella*” and any one of the following keywords: “incidence,” “prevalence,” “public health,” “mortality,” “population surveillance,” “surveillance,” “burden,” “distribution,” “area,” “location,” “developing countries,” “developed countries,” “country,” “epidemiology,” “geography,” and permutations of the word “monitor-.” Additional articles were obtained through consultation with experts and cross-referencing citations from articles identified above. We also consulted members of WHO Global Salm-Surv, an international network of laboratories and individuals involved in surveillance, isolation, identification and antimicrobial resistance testing of *Salmonella* to identify unpublished studies [21].

Global incidence. For each GBD region, the estimated population was multiplied by the estimated incidence of *Salmonella* gastroenteritis. The resulting annual number of cases was summed across all regions to yield the annual number of cases of *Salmonella* gastroenteritis worldwide. This calculation was performed repeatedly using Monte Carlo simulation to account for uncertainties in the estimated incidences. Each incidence estimate was modeled as a PERT distribution [22]. The PERT distribution is a smooth curve, which places emphasis on values nearer to the most likely value and is often used to model expert opinion data. The incidence estimate reported in the literature was used as the most likely value in the corresponding PERT distribution. For the majority of incidence estimates, confidence intervals were reported in the literature, and were thus used as the minimum and maximum values in the PERT distribution. Where there was >1 confidence interval per region, the lowest and highest values reported were used as the minimum and maximum values. Because disease notification data did not have confidence intervals, in regions where we used such data, we used the lowest and highest country-specific incidences within the region as the minimum and maximum values.

A distribution of estimates of the annual number of cases of gastroenteritis due to *Salmonella* worldwide was generated in @RISK, version 4.5.2 (Palisade Corporation), with 10,000 iterations and Latin Hypercube sampling. To determine the annual number of deaths, we used two published case fatality rates to parameterize a uniform distribution: 0.0003% [15] and 0.003% [23]. A sensitivity analysis was conducted to determine which parameters had the most influence on the estimated annual number of cases, by ranking correlation coefficients between each of the input parameters and the annual number of cases. Scenarios were run to explore the impact of the most influential model parameter, select model assumptions, and the potential impact of regions whose resulting incidence appeared markedly lower than the geographically surrounding regions.

To estimate the proportion of estimated cases of *Salmonella*

Table 1. The Global Burden of *Salmonella* Gastroenteritis, Circa 2006, Shown by 2005 Global Burden of Disease, Injuries and Risk Factors Study (GBD) Region and Grouped by the 6 World Health Organization (WHO) Subregions

GBD region	2006 Population	Existing sources of incidence data			Estimated global burden, mean value		
		Incidence per 100,000 person-years			No. of cases	No. of deaths	Incidence per 100,000 person-years
		Type of data	Most likely value (range)	Reference(s)			
EMRO							
North Africa/Middle East	410,800,000	Multiplier	124 (58–267)	[27]	563,000	900	140
Total	410,800,000	563,000	900	140
AFRO							
Sub-Saharan Africa, Central	84,412,000	Returning traveler	93 (43–205)	[30]	85,000	100	100
Sub-Saharan Africa, East	314,208,000	Returning traveler	471 (294–755)	[30]	1,488,000	2500	470
Sub-Saharan Africa, Southern	68,021,000	Returning traveler	69 (48–98)	[30]	46,000	<100	70
Sub-Saharan Africa, West	300,598,000	Returning traveler	279 (180–432)	[30]	839,000	1400	280
Total	767,239,000	2,458,000	4100	320
WPRO							
Asia Pacific, High Income	180,468,000	Multiplier	32 (15–69)	[13]	64,000	100	40
Asia, Central	76,815,000	Returning traveler	39 (28–53)	[30]	29,000	<100	40
Asia, East	1,344,125,000	Multiplier	3600 (1688–7763)	... ^a	53,429,000	88,200	3980
Australasia	24,407,000	Multiplier	257 (79–480)	[11]	66,000	100	270
Oceania	9,002,000	Extrapolation	257 (79–480)	[11]	24,000	<100	270
Total	1,634,817,000	53,610,000	88,500	3280
SEARO							
Asia, South	1,498,563,000	Returning traveler	474 (330–681)	[30]	7,034,000	11,600	470
Asia Southeast	573,711,000	Extrapolation	3,600 (1688–7763)	... ^a	22,805,000	37,600	3980
Total	2,072,274,000	29,839,000	49,200	1440
EURO							
Europe, Central	118,750,000	Disease notification	160 (39–322)	[28]	2,835,000	4700	2390
Europe, Eastern	211,614,000	Disease notification	40 (23–69)	[28]	1,265,000	2100	600
Europe, Western	407,707,000	Population	220 (110–430)	[6]	965,000	1600	240
Total	738,071,000	5,065,000	8400	690
AMRO							
North America, High Income	332,117,000	Multiplier	495 (250–870)	[14, 15]	1,716,000	2800	520
Caribbean	40,525,000	Returning traveler	107 (86–134)	[30]	42,000	<100	110
Latin America, Andean	49,517,000	Returning traveler	80 (60–106)	[30]	39,000	<100	80
Latin America, Central	215,172,000	Returning traveler	108 (77–150)	[30]	229,000	400	110
Latin America, Southern	58,371,000	Returning traveler	80 (60–106)	[30]	46,000	<100	80
Latin America, Tropical	192,735,000	Returning traveler	80 (60–106)	[30]	151,000	300	80
Total	888,437,000	2,222,000	3,700	250
Global total ^b	6,511,638,000	93,757,000	155,000	1140

NOTE. GBD regions crudely grouped into WHO sub-regions, based on majority overlap of countries between regions. Disease notification, disease notification data plus underascertainment multiplier; extrapolation, extrapolation from regions in close geographic proximity; multiplier, multiplier study (laboratory-based incidence adjusted for underascertainment); population, prospective population-based incidence study; returning traveler; returning traveler data, plus underascertainment multiplier and susceptible traveler correction factor.

^a Ran Lu, Branch of Enteric Infection Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, unpublished data

^b Numbers may not add due to rounding.

gastroenteritis that were foodborne, we used the average “proportion foodborne” from 6 published estimates of the foodborne proportion [5, 8, 11, 24–26]. The proportion of foodborne cases was multiplied by the annual number of cases to estimate the annual number of foodborne gastroenteritis cases due to *Salmonella* species. Because of the uncertainty associated with such source attribution values, we also calculated estimates using the lowest (55%) [24] and highest (95%) [5, 26] proportions in the published literature.

RESULTS

Availability of data. We found 14,806 articles with the keyword “*Salmonella*,” which, when linked with the secondary keywords, reduced to 1,619 articles, of which 724 were related to humans. From these we identified one prospective, population-based study, from England in the 1990s, which estimated the community incidence of *Salmonella* infection [6]. This incidence was extrapolated to the “Europe, Western” region.

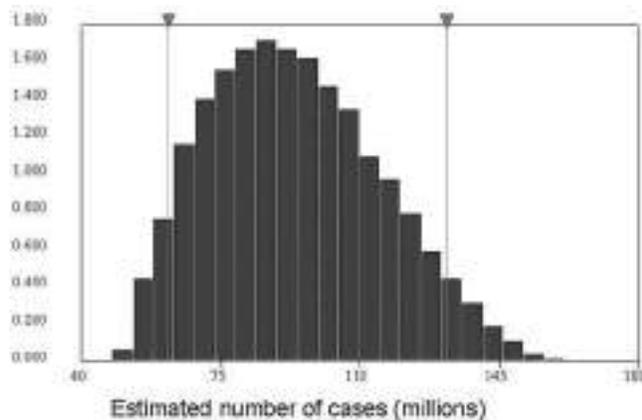


Figure 1. Distribution of plausible values for the estimated annual number of cases of *Salmonella* gastroenteritis worldwide, circa 2006, showing 5th and 95th percentiles.

Six countries in 5 GBD regions had “multiplier studies,” which used laboratory-confirmed incidences adjusted for under-ascertainment. The estimated incidence of *Salmonella* from Australia [11] was extrapolated to the “Australasia” region, Jordan [27] to the “North Africa/Middle East” region, Japan [13] to the “Asia Pacific, High Income” region, and China (Ran Lu, Branch of Enteric Infection Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, unpublished data) to the “Asia, East” region. The estimated incidence from the United States [15] and Canada [14] were averaged, and extrapolated to the “North America, High Income” region.

Two GBD regions had available disease notification data for one or more country within the region. Data from the European Food Safety Authority [28] for 2005 were used, with the exception of Slovenia, for which 2004 data were used. Disease notification data from countries within regions were averaged, and multiplied by a *Salmonella*-specific multiplier from the Netherlands [29], and the resulting incidence estimate applied to the respective “Europe, Central” and “Europe, Eastern” regions.

Eleven GBD regions had information available on the incidence of *Salmonella* gastroenteritis in returning Swedish travelers [30]. These incidences were multiplied by the *Salmonella*-specific multiplier from the Netherlands [29], and then by the correction factor to account for differences in the susceptibility between traveling Swedes and the resident population in a given region. The correction factor was calculated by taking advantage of the fact that 2 incidence estimates were available for 1 region (“North Africa/Middle East”): one from a multiplier study from Jordan [27], and one from Swedish travelers [30], corrected for under-ascertainment. The ratio of these 2 estimates (0.0678) was used to correct for the hypothesized increased susceptibility of traveling Swedes versus regional residents.

For the final 2 GBD regions, it was necessary to extrapolate

from neighboring regions. The calculated incidence from the Australia multiplier study [11] was extrapolated to the “Oceania” region, and the calculated incidence from the China multiplier study (Ran Lu, Branch of Enteric Infection Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; unpublished data) was extrapolated to the “Asia, Southeast” region.

The distribution of estimates for the annual number of cases of *Salmonella* gastroenteritis worldwide is shown in Figure 1. Overall, we estimate that 93,757,000 cases of gastroenteritis due to nontyphoidal *Salmonella* occur annually (Table 1), ranging from 61,768,000 (5th percentile) to 131,634,000 (95th percentile). The estimated annual number of deaths and the incidence per 100,000 persons are shown by GBD region, WHO sub-region, and overall (Table 1). We estimate that nontyphoidal *Salmonella* causes 155,000 deaths (5th to 95th percentile, 39,000–303,000 deaths) each year, worldwide. By applying the average of published values of the proportion of *Salmonella* infections that is foodborne (86%), we estimated that, of the 93,757,000 cases, ~80,318,000 are foodborne, and that the number of foodborne cases is likely between 51,566,000 (assuming 55% are foodborne) and 89,069,000 (assuming 95% are foodborne).

The input parameter with the most influence on the estimated annual number of cases was the incidence estimate for the “Asia, East” region (Table 2). To illustrate its impact, we ran the 4 scenarios: 1 with a 10-fold decreased incidence, 1 with a 2-fold decreased incidence, and 2 using data from other sources considered lower in the hierarchy (returning traveler data and extrapolation from Japan). We also assessed the impact of our assumption that travelers to a region are ~15 times more susceptible than regional residents, by decreasing our suscep-

Table 2. Correlation between the Input Parameters and the Distribution of the Annual Number of Cases of *Salmonella* Gastroenteritis Worldwide, Showing the Top 5 Variables

Rank	Proportion	Correlation coefficient
1	Incidence estimate for “Asia, East” region	0.917
2	Incidence estimate for “Asia, Southeast region ^a ”	0.391
3	A Incidence estimate for “Asia, South” region	0.059
	B Incidence estimate from “Europe, Central” region	0.055
4	Incidence estimate for “North America, High Income” region	0.024
5	A Incidence estimate for “Sub-Saharan Africa, East” region	0.016
	B Incidence estimate from “Europe, East” region	0.016
	C Incidence estimate from “Europe, West” region	0.015

^a Incidence for “Asia, Southeast” estimated by extrapolating from “Asia, East.”

tible traveler correction factor 2-fold (ie, travelers ~7 times more susceptible) and 7-fold (ie, travelers ~2 times more susceptible). Because the incidence estimate for the “Asia, South” region was markedly lower than its geographic counterparts, we assessed its impact using both a 2-fold and a 10-fold increase (Table 3).

DISCUSSION

The global human health impact of nontyphoidal *Salmonella* is high, with an estimated 93.8 million illnesses, of which an estimated 80.3 million are foodborne, and 155,000 deaths each year. The estimated total number of cases is plausible given previously published diarrheal disease estimates [3], which suggest that the total annual number of diarrheal illnesses may be on the order of 2.8 billion worldwide. If so, *Salmonella* infections represent ~3% of these illnesses. Worldwide, mass production and distribution of food disseminates pathogens rapidly; this, combined with the challenge of multidrug resistance related to antibiotic use, creates new challenges for controlling and preventing *Salmonella* infection. Improving food safety and reducing the burden of *Salmonella* infection means promoting and implementing effective food safety interventions on a global scale.

We estimated the global burden of *Salmonella* gastroenteritis by using the best available data in each of the 21 GBD regions. Our hierarchical approach allowed us to use published data, as well as information from special studies and surveillance to inform estimates of the disease burden. These methods may be useful for other foodborne pathogens, particularly since data on other pathogens, such as *Campylobacter*, *Shigella*, and *Yersinia* species, will likely have the same data availability issues as encountered with *Salmonella* species. We considered prospective population-based incidence studies the gold standard for determining the incidence and used them in preference to other data sources. However, these studies are complex and

expensive, so few countries have used them to estimate the incidence of enteric disease [6, 16].

In lieu of a prospective study, investigators in several countries have conducted multiplier studies that estimate the incidence of *Salmonella* gastroenteritis by multiplying the incidence of laboratory-confirmed infections by a multiplier to correct for underascertainment. The multiplier is derived from cross-sectional surveys of the general population and clinical diagnostic laboratories. Multiplier studies, which estimate the frequency at which cases are lost to surveillance at each surveillance step (care seeking, specimen submission, laboratory testing), have been conducted in Australia [11], Canada [14], the United States [15], Jordan [27], Japan [13], and China (Chinese Center for Disease Control and Prevention; unpublished data).

For 2 GBD regions, both European, there were no prospective, population-based or multiplier studies, but available disease notification data allowed us to estimate the disease burden by determining the average incidence of laboratory-confirmed *Salmonella* infection and adjusting for underascertainment using values from the literature. *Salmonella*-specific multipliers range from 3.2 in England [6], 7 in Australia [31], 14.3 in the Netherlands [29], 25 in Canada [14], 38 in the United States [15], to 64 in Japan [13]. Because of geographic proximity, the Netherlands *Salmonella*-specific multiplier of 14.3 [29] was used to adjust for underascertainment in these 2 European regions. It is very unlikely, however, that the completeness and ascertainment of laboratory-confirmed cases of *Salmonella* infection would be the same across all European countries given varying methods of surveillance and levels of socioeconomic development. Thus, the Netherlands multiplier probably provides a conservative estimate of the population incidence.

To overcome the lack of regional incidence data in Africa, Asia (central, south, and southeast), Latin America, and the Caribbean, we used a novel approach, using data from a Swed-

Table 3. Estimated Annual Global Burden of *Salmonella* Gastroenteritis, Circa 2006, under Different Scenarios

Variable	Mean no. of cases	Mean no. of deaths	Mean incidence per 100,000 person-years
Results from Table 1	93,757,000	155,000	1140
Scenario			
Estimated incidence in “Asia, South” increased by a factor of 10	157,059,000	259,000	2400
Susceptible traveler correction factor decreased by a factor of 7	153,916,000	254,000	2400
Susceptible traveler correction factor decreased by a factor of 2	103,783,000	171,000	1600
Estimated incidence in “Asia, South” increased by a factor of 2	100,790,000	166,000	1600
Estimated incidence in “Asia, East” decreased by a factor of 2	55,639,000	92,000	850
Estimated incidence in “Asia, East” decreased by a factor of 10	25,145,000	42,000	390
Estimated incidence in “Asia, East” derived from returning traveler data	22,545,000	37,000	350
Estimated incidence in “Asia, East” derived from extrapolation (from “Asia Pacific, High Income”)	18,136,000	30,000	280

ish study on travel-associated *Salmonella* infections (adjusted for underascertainment) to estimate the incidence of laboratory-confirmed cases in these regions. The concept of using such data as a measure of relative risk between regions was first proposed by Ekdahl et al [30] in the Swedish traveler study. We hypothesized that acquired immunity to specific *Salmonella* serovars that are prevalent may mean that travelers are more likely than residents to be infected with *Salmonella*. To compensate, we derived a correction factor by comparing the incidence in Swedish travelers returning from the “North Africa/Middle East” region to the incidence estimate calculated for the Jordan population, finding that the incidence in travelers was 15 times greater. However, it is likely that local populations of countries which are less developed than Jordan are relatively more malnourished and susceptible to *Salmonella* infections than their Jordanian counterparts. In such populations, the local susceptibility may approach that of travelers to the area; thus, estimates for such regions presented here would significantly underestimate the true incidence.

We recognize that the methods used here do not capture the full extent of the actual uncertainty associated with the data. For example, we did not capture the uncertainty associated with data coverage in a region, and thus did not distinguish between regions which had information from only one country versus multiple countries. As well, we did not distinguish between variability and uncertainty. However, we made the best use of existing data to estimate the global burden of *Salmonella* gastroenteritis and attempted to capture the main sources of uncertainty. Further advancements are needed to better characterize uncertainty in such models.

There is currently no consensus or guidance available on the weight of evidence or uncertainty associated with different types of burden of illness studies (for instance, prospective versus laboratory-based incidence calculations) or extrapolations between countries or regions. Clearly, however, there is a scale of declining weight of evidence and increasing uncertainty as we move from prospective studies and extrapolate away from the country in which the study was conducted. Future work should consider accounting for this by, for instance, increasing the spread of the uncertainty distributions based on study type, as well as increasing the uncertainty in the results for some regions as a function of the nature of the extrapolation performed.

We used a range of possible case fatality rate values, from 0.0003% [15] to 0.003% [23], to estimate the annual deaths. However, the case-fatality rate—and, thus, the estimated number of deaths per year due to *Salmonella* infection—may be higher in countries where nutrition is poor and access to health care limited. Unfortunately, few published data exist with which to improve these estimates; thus the estimated number of deaths reported here should be considered a conservative value.

We limited this study to assessing the human health burden

of gastroenteritis caused by *Salmonella* as measured by numbers of cases and deaths. We did not attempt to estimate its impact in terms of hospitalization, disability, long-term sequelae, or economic costs because of lack of data. These factors impact hugely on the human health burden, and should be considered in future. We also did not account for invasive *Salmonella* infection, which poses a significant burden, particularly in HIV-prevalent regions, such as sub-Saharan Africa.

We estimated the number of foodborne cases by averaging published values of the estimated proportion of *Salmonella* infections that were foodborne [5, 8, 11, 24–26], and applying that average to our estimated number of cases. This crude approach is subject to several limitations. First, since we applied a single proportion to the total number of cases, we assumed that the proportion of *Salmonella* cases that were foodborne was the same across all world regions. However, the proportion likely varies widely between countries and regions. More information on the country- and region-specific foodborne transmission of *Salmonella* is needed, particularly for developing regions, where the importance of waterborne transmission is likely greater, due to more frequent contamination at the source and during household storage, and lack of disinfection. Information from developing countries is particularly needed since all published estimates of the proportion of *Salmonella* infections that are foodborne currently come from developed countries. We recognize that the proportion that is foodborne is likely lower in developing countries because the proportion waterborne is likely higher. However, in the absence of regional estimates we extrapolated an average of all published estimates of the proportion that is foodborne to arrive at a global value.

The major limitation of this study is the significant reliance of its results on the unpublished Chinese incidence estimate. To address this, we explored the impact of using returning traveler data and extrapolating from the “Asia Pacific, High Income” region in lieu of the China data. Unfortunately, both alternate data sources have their own inherent biases. A main criticism of analyses such as this one is the use of data primarily from developed countries, thus yielding values that significantly underestimate the true incidence of disease. Through WHO Global Salm-Surv, an international network of epidemiologists and laboratory scientists, we were able to identify an unpublished study from China which we felt more accurately depicted the incidence of *Salmonella* infection in this populous region, compared to either the returning traveler data and extrapolation. The Chinese estimate is significantly higher than the other multiplier studies, although this is likely due to true population differences in rates of illness. It is also higher than the returning traveler data for the “Asia, East” and other adjacent regions, although this is likely due to the bias associated with returning traveler data as discussed above. Unfortunately, other sources of information (eg, disease notification data) with which to

validate our choice of estimate were unavailable for the “Asia, East” region. Thus, we chose the data we felt most accurately represented the incidence in the region.

Salmonella causes considerable burden globally. Although subject to several limitations, these data provide important information for priority setting in specific regions. They also highlight the need for improved public health surveillance for human foodborne illness in some regions. There were no publicly available notification data from some regions, including those with a large proportion of the global population, such as South/South-East Asia, and South America, which account for 39% of the world population. This lack of good surveillance information significantly impacts the quality of the global estimate. Assessing the true burden of *Salmonella* infection should be prioritized in countries within these regions, for example via capacity-building initiatives such as WHO Global *Salmonella* Surveys, to improve global burden estimates and better inform priority setting.

GLOBAL BURDEN OF *SALMONELLA* WORKING GROUP

The Global Burden of *Salmonella* Working Group members are (in alphabetical order, not including the authors) Donald Campbell, Birgitte De Jong, Henriette De Valk, Danilo Lo Fo Wong, Rob Lake, Ran Lu, Karin Nygard, Wilfred van Pelt, Paul Sockett, Kate Thomas, and Hajime Toyofuku.

Acknowledgments

We thank the members of the International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies for discussion of early manuscript drafts and final results. The authors also thank the World Health Organization’s Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group for their critical appraisal of the methods and results.

Potential conflicts of interest. All authors: no conflicts.

References

- Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* **1992**; 70:705–714.
- Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* **2003**; 81:197–203.
- Scallan E, Majowicz SE, Hall G, et al. Prevalence of diarrhoea in the community in Australia, Canada, Ireland, and the United States. *Int J Epidemiol* **2005**; 34:454–460.
- Senior K. Estimating the global burden of foodborne disease. *Lancet Infect Dis* **2009**; 9:80–81.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **1999**; 5:607–625.
- Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *BMJ* **1999**; 318:1046–1050.
- de Wit MA, Koopmans MPG, Kortbeek LM, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and aetiology. *Am J Epidemiol* **2001**; 154:666–674.
- Adak GK, Long SM, O’Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* **2002**; 51:832–841.
- Scallan E, Fitzgerald M, Collins C, et al. Acute gastroenteritis in Northern Ireland and the republic of Ireland: a telephone survey. *Commun Dis Public Health* **2004**; 7:61–67.
- Majowicz SE, Dore K, Flint JA, et al. Magnitude and distribution of acute, self reported gastrointestinal illness in a Canadian community. *Epidemiol Infect* **2004**; 132:607–617.
- Hall G, Kirk MD, Becker N, et al. OzFoodNet Working Group. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis* **2005**; 11(8):1257–1264.
- Flint JA, Van Duynhoven YT, Angulo FJ, et al. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. *Clin Infect Dis* **2005**; 41(5):698–704.
- Kubota K, Iwasaki E, Inagaki S, et al. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. *Foodborne Path Dis* **2008**; 5(5):641–648.
- Thomas MK, Majowicz SE, Sockett PN, et al. Estimated number of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: pathogen-specific community rates. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2006**; 17(4):229–234.
- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, et al. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* **2004**; 38(Suppl 3):S127–S134.
- de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* **2001**; 154(7):666–674.
- Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* **2004**; 82(5):346–353.
- World Health Organization. WHO consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases: taking stock and charting the way forward. Geneva: World Health Organization, **2006**.
- The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors study, operations manual, final draft. 31 January **2008**. http://www.globalburden.org/GBD_Study_Operations_Manual_Jan_31_2008.pdf. Accessed 10 December 2008.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs. World population prospects: the 2008 revision population database. <http://esa.un.org/unpp/> Accessed 28 December 2008.
- Galanis E, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, et al. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis* **2006**; 12(3):381–388.
- Vose D. Risk analysis: a quantitative guide. 2nd ed. West Sussex, England: John Wiley & Sons, **2000**.
- Adak GK, Long SM, O’Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* **2002**; 51:832–41.
- Havelaar AH, Galindo AV, Kurowicka D, Cooke RM. Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation. *Foodborne Path Dis* **2008**; 5(5):649–659.
- van Duynhoven YTPH, de Wit MAS, Kortbeek LM, Koopmans MPG. Voedselinfecties in Nederland. *Ned Tijdschr Med Microbiol* **2002**; 10: 79–83.
- Anonymous. Morbidité et Mortalité Dues aux Maladies Infectieuses d’Origine alimentaire en France. Sainte-Maurice, France : Institut National de Vieille Sanitaire, **2004**.
- Gargouri N, Walke H, Belbeisi A, et al. Estimated burden of human *Salmonella*, *Shigella*, and *Brucella* infections in Jordan, 2003–2004. *Foodborne Path Dis* **2009**; 6(4):481–486.
- The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. The EFSA Journal **2006**; 94:2–228.
- van Pelt W, de Wit MAS, Wannet WJB, Ligtoet EJJ, Widdowson MA, van Duynhoven YTHP. Laboratory surveillance of bacterial gastroen-

- teric pathogens in The Netherlands, 1991–2001. *Epidemiol Infect* **2003**; 130:431–441.
30. Ekdahl K, de Jong B, Wollin R, Andersson Y. Travel-associated nontyphoidal salmonellosis: geographical and seasonal differences and serotype distribution. *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11(2):138–144.
31. Hall G, Yohannes K, Raupach J, Becker N, Kirk M. Estimating community incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Australia. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14(10):1601–1609.

Review

***Salmonella* and Eggs: From Production to Plate**

Harriet Whiley * and Kirstin Ross

Health and the Environment, Flinders University, GPO Box 2100, Adelaide, 5001, Australia;
E-Mail: Kirstin.Ross@flinders.edu.au

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Harriet.Whiley@flinders.edu.au;
Tel.: +61-8-7221-8585; Fax: +61-8-7221-8590.

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 13 January 2015 / Accepted: 23 February 2015 / Published: 26 February 2015

Abstract: *Salmonella* contamination of eggs and egg shells has been identified as a public health concern worldwide. A recent shift in consumer preferences has impacted on the egg industry, with a push for cage-free egg production methods. There has also been an increased desire from consumers for raw and unprocessed foods, potentially increasing the risk of salmonellosis. In response to these changes, this review explores the current literature regarding *Salmonella* contamination of eggs during the production processing through to food handling protocols. The contamination of eggs with *Salmonella* during the production process is a complex issue, influenced by many variables including flock size, flock age, stress, feed, vaccination, and cleaning routines. Currently there is no consensus regarding the impact of caged, barn and free range egg production has on *Salmonella* contamination of eggs. The literature regarding the management and control strategies post-collection, during storage, transport and food handling is also reviewed. Pasteurisation and irradiation were identified as the only certain methods for controlling *Salmonella* and are essential for the protection of high risk groups, whereas control of temperature and pH were identified as potential control methods to minimise the risk for foods containing raw eggs; however, further research is required to provide more detailed control protocols and education programs to reduce the risk of salmonellosis from egg consumption.

Keywords: *Salmonella*; salmonellosis; public health; risk assessment; caged; free range; organic; food handling; foodborne illness

1. Introduction

Worldwide, *Salmonella* is one of the most prevalent causes of foodborne illness [1,2]. Globally, the annual incidence of foodborne salmonellosis is conservatively estimated at 80.3 million cases [3], but other estimates range from 200 million to 1.3 billion cases [4]. In the United States alone it was estimated that non-typhoidal *Salmonella* spp. are responsible for 1 million cases of domestically acquired foodborne illness annually [5]. A study from the European Union estimated that only 1 out of every 57 cases of salmonellosis is reported. This study also demonstrated that the annual incidence of salmonellosis in each of the European Union member states varied between 16 and 11,800 per 100,000 people and that the incidence of salmonellosis in each country correlated significantly with the presence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in laying hens, suggesting this was the primary source of infection [6].

Contamination of eggs and eggshells has been identified as one of the major causes of foodborne *Salmonella* [1]. In the United States between 1985 and 2002 contamination of eggs was identified as the source of 53% of all cases of *Salmonella* reported to the Centre for Disease Control and Prevention (CDC) [7]. The two most commonly identified causative agents of foodborne salmonellosis are *S. enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis [2]. Both serotypes have the ability to colonise the reproductive organs of hens (the oviduct and ovary) and are major causes of foodborne illness. Globally *Salmonella* Enteritidis is more commonly linked to contaminated eggs, except in Australia, where the majority of egg-related foodborne salmonellosis is caused by *Salmonella* Typhimurium [8–10].

Salmonella contamination of eggs is a complex issue that is influenced by many variables, making it difficult to implement appropriate management strategies. There are two pathways for eggs to become internally contaminated with *Salmonella*. Direct contamination occurs during the formation of an egg in the reproductive tract of hens (including the ovary and oviduct); whereas, indirect contamination occurs after an egg has been laid and *Salmonella* contaminating the outside of the egg penetrates through the shell membrane [1,11]. These pathways for contamination can be influenced by the egg production process, storage, handling and food preparation [7,12–14].

In recent years, there has been shift driven by consumers for more humane methods of egg production, causing a shift from conventional battery cage housing systems to free-range production [15]. There has also been a shift in consumer eating habits with increasing demand for raw and unprocessed foods [16,17]. The increasing popularity of unprocessed home-made foods containing raw eggs such as mayonnaise, certain sauces and raw egg based deserts like ice-cream, tiramisu and even milkshakes potentially increases the risk of salmonellosis [17–20].

Currently, publications assessing the impact that various methods of egg production have on *Salmonella* contamination are conflicting, which makes it difficult to implement informed legislation to ensure food safety [21]. This manuscript reviews the current knowledge regarding *Salmonella* contamination of caged, barn and free range egg production processes. It also explores the various methods for control during production and at the point of use and how this can be influenced by the consumer. Discussion of current management policies and identification of gaps in knowledge will help inform future management protocols to ensure the safety of consumers.

2. Egg Production Processes

Studies comparing *Salmonella* contamination in the different egg production processes have yielded conflicting and inconsistent evidence. This is due to the complexity of confounding factors and variables. These factors include flock size, flock age and stress caused by rehousing, weather, transport, initiation of egg lay and moulting [22]. Another difficulty with interpreting results is the variation in the contamination pathways. Factors affecting *Salmonella* contamination of eggs differ for direct contamination within the ovaries and indirect contamination of environmental samples [23].

Currently, the conflicting evidence surrounding the influence of housing systems on *Salmonella* contamination still causes serious debate. A study by the European Food Safety Authority tested faecal and dust samples from 5000 egg production sites across 25 European countries and concluded that cage flock holdings were more likely to be contaminated with *Salmonella* [24]. However, a more recent review by Holt *et al.* [22] concluded there was no general consensus as to which egg production housing system resulted in less *Salmonella* contamination. This review was criticized by Greger [25] who stated that Holt *et al.* [22] had misrepresented data published by The European Food Safety Authority by only citing individual studies from four countries, representing less than a quarter of the total study. Greger's rebuttal stated that presenting individual studies rather than a cumulative review of results allowed readers to have a more in depth and informative comparison of results. By presenting the data this way it raised the question as to why five of the studies showed higher incidence of *Salmonella* in free range housing compared to caged housing, which was contradictory to the rest of the studies. Answering this question may provide a better insight into the factors which may be promoting *Salmonella* contamination. These publications demonstrate the complexity of this issue and indicate that there is not a singular answer. As the egg production processes are currently undergoing rapid change it is important to identify the specific factors that promote *Salmonella* contamination as this will ensure the best management practices for the future.

3. Direct Contamination

Internal contamination of eggs with *Salmonella* occurs in the reproductive organs during egg formation [26]. Both *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* have been demonstrated to have the ability to colonise the reproductive tract of hens [8], however *S. Enteritidis* is more frequently isolated from the internal contents of eggs due to its ability to adhere better to reproductive tract mucosa compared to *S. Typhimurium* [9]. Internal contamination is an important issue, not only for human health, but for the egg production industry, as Gantois *et al.* [8] observed that hens infected with *Salmonella* had decreased egg production which did not improve within 2 weeks post-infection. Currently there are limited studies investigating the effect of different housing systems on this contamination pathway. Gast *et al.* [13] compared *Salmonella* contamination of hens in conventional cages and colony cages enriched with perching, nesting and scratching areas. Hens were orally dosed with 1.0×10^7 CFU of *S. Enteritidis* for 5 to 6 days prior to euthanasia and testing of internal organs. *S. Enteritidis* was detected at significantly higher frequencies in the livers, spleens, ovaries and oviducts of the hens housed in the conventional cages compared to the hens housed in the enriched cages. It was suggested this could be due to housing parameters such as stocking density or behavioural attributes might affect the susceptibility of hens to

disseminated infection. However, another study by Gast *et al.* [23] demonstrated experimentally that there was no significant difference in the rate of transmission of *S. Enteritidis* from infected hens to healthy hens housed in with conventional cages or enriched cages. The effect of housing on the transmission of *S. Enteritidis* infection was also explored by De Vylder *et al.* [27]. Four housing systems were explored using experimentally infected hens. This included a conventional battery cage, a furnished cage (most similar to an enriched cage), an aviary, and a floor system. The spread of infection between hens was slightly more in the aviary and floor housing systems compared to the two caged housing systems. This was partly reflected with the egg contamination as significantly more contaminated eggs were found in the aviary housing systems compared to two cage and floor housing systems. It was suggested that the increased spread of infection could be to inherent differences between the housing systems, including hygienic status, air quality and increased physical contact between birds.

4. Environmental Contamination

Numerous studies suggest that environmental sources present in free range housing have a lower incidence of *Salmonella* contamination compared to caged housing [12,24,28]. A Belgian study found that 30% (45/148) of dust samples and 30% (45/148) of faecal samples collected from caged housing were positive for *Salmonella*; whereas, only one out of 148 of dust samples and two out of 148 faecal samples collected from barn and free range housing were positive for *Salmonella* [12]. These results were supported by a UK study by Wales *et al.* [28] who found the incidence of *Salmonella* in environmental samples to be higher in caged housing (19%) compared to free range housing (10%). As noted already, the study by Recio *et al.* [24], which investigated the presence of *S. Enteritidis* in faeces and dust samples from 5310 egg production holdings across the European Union found that free range housing systems had significantly lower *Salmonella* contamination compared to caged housing systems. However conflicting evidence was presented by Parisi *et al.* [15] who used eighty-four certified *Salmonella*-free Bovan Brown hens to experimentally demonstrate that free range eggs had a higher incidence of *Salmonella* contamination compared to conventional battery cages. In this study 5/212 (2%) eggs sampled from three free range housings and 0/212 from three conventional battery cages tested positive for *Salmonella*. It was suggested that the higher *Salmonella* incidence in the free range housing was due to prolonged interaction between the hen and the egg after it has been laid, compared to cage systems when the egg is removed more quickly from the physical proximity to the hen.

5. Penetration of Eggs Post-Laying

Post-laying internal *Salmonella* contamination of eggs from environmental sources occurs through penetration of the shell membrane [11]. Miyamoto *et al.* [29] explored the potential of *Salmonella* to penetrate egg shells by immersing the eggs in *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* solutions at varying times post-laying. The highest incidence of internal *Salmonella* contamination occurred when eggs were between 15 min and 3 h post-laying (the shortest time period reported) and stored at 25 °C (compared with 3.25 h to 6 h, 1 day and 7 days post-laying). Refrigerating eggs at 4 °C for 15 min prior to *Salmonella* exposure significantly decreased penetration of the eggshell. It was suggested that this was due to reduced growth at the lower temperature. This indicates that refrigeration of eggs at collection may be a useful tool for minimising internal *Salmonella* contamination; however, realistically this is

difficult to implement as it will not prevent any contamination that occurs in the housing prior to collection. The ability of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* to penetrate eggshells was not significantly different. De Reu *et al.* [11] demonstrated experimentally that the age of the hen and eggshell characteristics such as area, shell thickness and number of pores does not significantly influence the eggshell penetration by *S. Enteritidis*. Another study by Messens *et al.* [30] used commercially available eggs and experimentally inoculated them with 2.71 log CFU of *S. Enteritidis* at 20 °C for 14 days. The rate of internal contamination was 6% for free-range, 16% of the conventional battery caged and 30% to 34% for the brown, organic, and omega-3-enriched eggs. Another trend observed in this study was that hens fed corn cob mix had a higher incidence of penetrated eggshells compared with the hens given the standard feed, suggesting that feed type might affect eggshell permeability.

6. Production Control Measures

There are numerous methods that have been explored to control *Salmonella* contamination through the production process, one of the basic methods being routine cleaning and disinfection between flocks [28]. However, the effectiveness of these cleaning routines can be highly variable [14]. Wales *et al.* [28] investigated 12 *Salmonella*-contaminated caged layer houses post cleaning and disinfection and found that none of the 12 housings were completely *Salmonella*-free. Another study by Davies and Breslin [14] compared the effectiveness of cleaning and disinfection in free range, barn and cage layer housing and found that there was a decrease in *Salmonella* contamination observed in free range housing although the soil remained contaminated, but in the barn and cage housing significant contamination remained on the surfaces of buildings and equipment. Anecdotally it has also been suggested that there may be reduction in contamination as a result of modern farming methods. For example modern barn systems disposing of faecal material via manure belts would have lower contamination compared with older barn systems which would allow faecal material to pool until restocking.

The cross contamination of wildlife vectors has also been identified as a mechanism for recontamination of housing [14,28,31,32]. For example, *S. Enteritidis* was found to be more commonly isolated from caged housing compared to *S. Typhimurium*. One suggestion for the reasoning behind this was the strong correlation between *S. Enteritidis* and rodent activity which was not observed for *S. Typhimurium*. Other animals which have been identified as carriers for *Salmonella* causing recontamination of farms include mice, rats, foxes, cats, flies, litter beetles, ground beetles and centipedes [31,32]. Differences in egg production housings systems, climate and region also influence the effectiveness of biosecurity measures implemented against each of these animal vectors, affecting the success of remediation and prevention measures [22].

Vaccination of hens has had varying success against *Salmonella* infection, depending on the vaccine and the *Salmonella* serotype. Berghaus *et al.* [33] demonstrated that a vaccine containing killed *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, and *S. enterica* serotype Kentucky increased the immunity of the hens and their progeny against these particular serotypes; however, it did not decrease the incidence of *Salmonella* in environmental samples taken from the housing. Another study by Arnold *et al.* [34] found that vaccination did not influence the proportion of hens shedding *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*; however, it did significantly decrease the incidence of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* present on eggshells compared to the non-vaccinated hens.

Antibiotic treatment is a controversial method for the control of *Salmonella* due to the early emergence of antibiotic resistant populations [35]. A study by Li *et al.* [36] tested fecal samples collected from a commercial layer house over a 78 week period. Using PFGE they characterized 45 different *Salmonella* isolates with known serovars. Of these 45 isolates, 16 (35%) were resistant to at least one of the 15 antibiotics tested against. This included resistance against tetracycline, ampicillin, streptomycin, and ceftiofur which are widely used in the treatment of human systemic salmonellosis. A more recent study investigated the presence of antibiotic resistant genotypes of *Salmonella* isolated from broiler hens found that more than 43% of the isolates were resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ceftiofur, cefoxitim, and ceftriaxone [37]. This was supported by Adesiyun *et al.* [38] who isolated 84 isolates of *Salmonella* from egg productions processes in Trinidad and Tobago, Grenada, and St. Lucia and found that all of the 84 isolates displayed resistance to one or more of the seven antimicrobial agents tested. A high frequency of resistance was observed against erythromycin, streptomycin, gentamycin, kanamycin, ampicillin, and tetracycline. The presence of antibiotic resistant strains is highly relevant to food safety and public health with regard to treatment of the more invasive cases of salmonellosis [37].

Another control method was explored by Fiorentin *et al.* [39] who demonstrated that orally treating hens infected with *S. Enteritidis* with bacteriophages isolated from free-range hens was found to significantly reduce the contamination of *S. Enteritidis* found in the caeca. A 3.5 order of magnitude reduction of *S. Enteritidis* CFU/g of caecal matter was observed five days after treatment with the bacteriophage and samples collected up to 25 days after treatment continue to have contamination concentrations compared to infected hens not treated with the bacteriophage.

7. Post-Collection Control Methods

The benefits of current egg washing technology has been debated due to concerns the process may transfer *Salmonella* from the egg shell surface into the contents of the egg [40]. There is also the concern that washing can spread *Salmonella* causing cross contamination [41]. Hutchison *et al.* [42] demonstrated experimentally that washing contaminated eggs under optimum conditions (conveyor belt speed of 111 cm/min, prewash water was 44 °C and 138 kPa, wash water was 44 °C, 262 kPa and contained 3 g/L of chlorowash (a chlorine based disinfectant, rinse water was 48 °C, 262 kPa and contained 2.5 ml/L of Quat 800 rinse water agent and post-washing air eggs drying for 2 min at 42 °C) resulted in a 5 log reduction of *Salmonella* CFU on the shell surface and *Salmonella* was not detected from the internal contents of the egg. However, variations in this wash time and lower temperatures enabled both *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* to penetrate the egg shell and contaminate the egg contents.

Egg washing protocols have been augmented by the addition of chemical compounds. Wang and Slavik [41] experimentally compared the effect three commercial egg washing compounds have on *Salmonella* penetration of the egg shell post washing. Two of the commercially available chemical compounds (quaternary ammonium compound (QAC, pH 7.5) and hypochlorite (NaOCl, 100 ppm, pH 7.5)) were shown to reduce *Salmonella* penetration of the egg shell; however, washing with sodium carbonate (Na₂CO₃, pH 12) was shown to facilitate bacterial penetration. Another addition to the egg washing protocol is the utilisation of slightly acidic electrolysed water, which was demonstrated by Cao *et al.* [43] to experimentally reduce and even eliminate *S. Enteritidis* on shell eggs and washing water

preventing cross contamination. The difficulty with interpreting these results for real world application is that the effect on egg shell penetration was not explored.

Whole eggs and egg pulp pasteurisation through heat treating for short periods of time, is another method which has been demonstrated to reduce *Salmonella* contamination [40,44]. Barbour *et al.* [45] demonstrated that when whole eggs inoculated with *Salmonella* were treated by placing in a hot water bath at 57 °C for 25 min, followed by application of hot air at 55 °C for another 57 min a significant reduction in the *Salmonella* contamination was observed. When the initial inoculation was reduced to approximately 10⁶ CFU there were no viable *Salmonella* detected after this heat pasteurization [45]. Pasquali *et al.* [46] also demonstrated that hot air treatment only reduced *S. Enteritidis* contamination of eggshells by up to 1.9 log, with no significant changes to any of the quality traits of the egg. Pasteurisation may present a suitable method to reduce the risk of salmonellosis from eggs for high risk groups such as aged care facilities and hospitals; however, this is not likely to provide a solution for all due to consumers desire for raw whole foods and concern regarding consumption of pasteurised foods [47].

Irradiation of eggs has been presented as a potential method to prevent salmonellosis. The minimal dose required to inactivate *Salmonella* is 1.5 kGy which had been shown to cause changes in sensorial and functional properties of the egg. Sensorial changes include increased egg yolk odour and decreased clarity of the egg white, functional changes include decrease foam stability of the egg white [48]. Experimentally, egg whites irradiated at doses 2.5 and 5 kGy were shown to have increased foaming ability but decreased foam stability which obviously limits the functionality and desirability of the egg white [49]. Despite this, irradiation and pasteurisation may present an acceptable option for high risk populations, such as the elderly, immunocompromised, children and pregnant women. As such they may be a suitable control method against salmonellosis for hospitals and aged care facilities [48,50]. As such, regulatory guidelines enforcing the use of pasteurised egg products for vulnerable populations would be method to reduce the risk of salmonellosis.

Another approach was presented by Leleu *et al.* [51] who demonstrated that coating eggshell with chitosan (a linear polysaccharide derived from crustaceans) significantly reduced penetration by *S. Enteritidis*. Experimentally a 2% chitosan eggshell coating resulted in only 6.1% of eggs being penetrated compared to 24.5% of untreated eggs. However, chitosan coating did not reduce eggshell contamination, which does not prevent cross contamination during preparation to other food products.

8. Storage and Transport

A study by Radkowski [52] investigated the effect that storage at different temperatures had on 1440 eggs with the outside of the shells artificially contaminated with 10 CFU of *S. Enteritidis*. The artificial contamination of shells occurred after 0, 10, or 20 days stored at room temperature and eggs were stored for 0, 7, 14 and 21 days at 2 °C, 20 °C, and 30 °C prior to measuring the remaining *S. Enteritidis* contamination. The results from this study showed that storage at lower temperatures actually increased *S. Enteritidis* survival on the outside of shell eggs. Alternatively Humphrey *et al.* [53] explored the effect that storage at room temperature has on the internal concentration of *S. Enteritidis* of contaminated eggs. During this study a total of 5262 hen eggs from 15 different *Salmonella* positive flocks were tested for *S. Enteritidis* at a varying number of days post laying during which they were

stored at room temperature. In the first, second and third week post laying 5/1085 (0.5%), 7/1353 (0.5%) and 1/1221 (0.1%) of eggs were contaminated with *S. Enteritidis* and all contaminated eggs had <20 cells of *S. Enteritidis*. After 21 days though 12/1603 (0.8%) of eggs were *S. Enteritidis* positive, seven of these contained <20 cells but five had >100 cells with two eggs containing 1.5×10^4 and 1.2×10^5 cells of *S. Enteritidis*. Another study by Lublin *et al.* [54] demonstrated that after four weeks stored at 25 °C the concentration of *S. Enteritidis* in experimentally inoculated eggs began to increase. They also demonstrated the storing eggs at 6 °C prevented this increase in concentration observed at 25 °C, but did not prevent the survival of the initial concentration of *S. Enteritidis*. Egg storage at 10 °C and 20 °C was shown to control *S. Enteritidis* growth in experimentally inoculated eggs by Okamura *et al.* [55]. However, they also discovered that fluctuation in temperature promoted growth and that eggs stored at 22–30 °C or 27–35 °C for 5 days followed constant storage at 25 °C caused rapid increases in the number of eggs containing >10⁶ *S. Enteritidis* cells after only one and two weeks, respectively. This rapid increase due to fluctuation in temperature is important to consider what managing storage and transportation from the farm to the table.

9. Food Handling and Preparation

There are inconsistencies in the current literature regarding *Salmonella* control methods throughout the processing process and the evidence presented is conflicting. This places a lot of pressure on the control and management of *Salmonella* during food handling and preparation. The importance of management of this pathogen during food handling has been further increased by the growing desire of consumers for raw food products [16,17]. Humphrey *et al.* [56] demonstrated using a model kitchen and experimentally contaminated intact eggs that utensils used to mix eggs were sometimes *Salmonella* positive even after washing. When contaminated eggs were used in a batter mixture that was hand whisked with a fork or hand help mixer, *S. Enteritidis* was recovered from work surfaces over 40 cm away from the mixing bowl. Survival of the bacteria was seen in thin dry spots of egg or batter mixture 24 h after contamination. The importance of successfully cleaning kitchen to remove *Salmonella* contamination was also explored by Barker *et al.* [57]. In this study using detergent based cleaning without a rinse step was insufficient in achieving a hygienic surface within a model kitchen. Although the detergent based cleaning method was improved by addition of a rinse step, the use of hypochlorite at 5000 ppm was a significantly superior to the detergent based cleaning. This is an important message as sufficient cleaning of kitchen surfaces and utensils is crucial to prevent the cross contamination of *Salmonella* to other food products.

The importance of appropriate food handling is demonstrated by the example of a series of related salmonellosis outbreaks in Tasmania, Australia which occurred between June and December 2005. During this period there were five outbreaks and a total of 125 laboratory-confirmed cases of *S. Typhimurium* phage 135 reported to the Tasmania Department of Health. Of these cases 91% were linked to food businesses which had their eggs supplied from the same farm. Each business was found to have inadequate food handling and storage procedures which lead to the cross contamination of *Salmonella* [58]. Crespo *et al.* [59] investigated foodborne disease outbreaks in Spain associated with the consumption of eggs and egg products from 2000–2002. In total there were 895 outbreaks identified and of these 85% were attributed to *Salmonella* (of these 58% were confirmed as *S. Enteritidis*).

Investigations into each of these outbreaks identified that the most important control measures was health education, followed by inspection of premises and monitoring of food handlers. The findings from these outbreaks demonstrated the responsibility of food handlers to ensure the hygiene of the finished food products and to never regard eggs as ‘sterile’. Many food handlers underestimate the risk of *Salmonella* from raw eggs [60]. A recent study interviewing head chefs and catering managers of restaurant in Owerri, Nigeria found that although all participants stated they washed their hands after handling raw meat, chicken or fish, 6% stated they did not wash their hands after cracking raw eggs [61].

The difficulty of ensuring food handlers have the appropriate information regarding food safety education is that the message is not always straight forward. For example Radford and Board [62] explored the role of homemade mayonnaise and *S. Enteritidis* survival. It was found that mayonnaise made with vinegar to a pH of 4.1 or less controlled *S. Enteritidis*. The addition of garlic and mustard to mayonnaise was also protective against *S. Enteritidis*; however, the addition of salt or any vegetable materials promoted the survival of *S. Enteritidis*. The types of oil and vinegar used affected the survival of *S. Enteritidis* and storage of the mayonnaise at refrigeration temperatures actually protected *Salmonella* from acidulants. It was recommended that the mayonnaise was stored at 18–22 °C for 24 h prior to refrigeration.

10. Conclusions

Salmonella contamination of eggs is a complex issue affected by variables at each stage of the food production process. Currently the literature regarding the benefits of free range, barn and caged production processes with respect to *Salmonella* contamination is conflicting. However, the current literature does indicate that it is not yet achievable to produce eggs guaranteed to be *Salmonella*-free. This reinforces the importance of post collection control measures for *Salmonella*. This includes post collection disinfection methods such as washing, pasteurisation and irradiation. Although the second two methods will not be desirable for all consumers, they provide a niche solution for high risk patients. There is also the need for further research to optimise storage, temperature and food handling protocols as currently the information is highly complex and variable. Given the current shift in consumers’ preference and increasing desire for raw food products, there is a need for more informed guidelines regarding the preparation of foods containing raw eggs. Further research is required to explore different protocols to ensure control of *Salmonella* through temperature and pH of food products. There is also a need to re-educate food handlers and consumers of the risk from raw eggs and cross contamination of food products and reduce the public health risk.

Author Contributions

Harriet Whiley and Kirstin Ross conceived and participated in review design and coordination. Harriet Whiley drafted manuscript and Kirstin Ross provided academic input and both authors approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Howard, Z.R.; O'Bryan, C.A.; Crandall, P.G.; Ricke, S.C. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 755–764.
2. Galiş, A.M.; Marcq, C.; Marlier, D.; Portetelle, D.; Van, I.; Beckers, Y.; Thévis, A. Control of *Salmonella* contamination of shell eggs—Preharvest and postharvest methods: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2013**, *12*, 155–182.
3. Majowicz, S.E.; Musto, J.; Scallan, E.; Angulo, F.J.; Kirk, M.; O'Brien, S.J.; Jones, T.F.; Fazil, A.; Hoekstra, R.M.; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 882–889.
4. Coburn, B.; Grassl, G.A.; Finlay, B.B. *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunol. Cell Biol.* **2006**, *85*, 112–118.
5. Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.-A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 7–15.
6. Havelaar, A.H.; Ivarsson, S.; Lofdahl, M.; Nauta, M.J. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol. Infect.* **2013**, *141*, 293–302.
7. Food Drug Administration. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production, storage, and transportation. Final rule. *Fed. Regist.* **2009**, *74*, 33030–33101.
8. Gantois, I.; Eeckhaut, V.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol.* **2008**, *37*, 399–406.
9. Wales, A.; Davies, R. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathol.* **2011**, *40*, 429–436.
10. Moffatt, C.R.; Musto, J. *Salmonella* and egg-related outbreaks. *Microbiol. Aust.* **2013**, *34*, 94–98.
11. De Reu, K.; Grijspeerdt, K.; Messens, W.; Heyndrickx, M.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Herman, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *112*, 253–260.
12. Namata, H.; Méoc, E.; Aerts, M.; Faes, C.; Abrahantes, J.C.; Imberechts, H.; Mintiens, K. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Prev. Vet. Med.* **2008**, *83*, 323–336.
13. Gast, R.K.; Guraya, R.; Jones, D.R.; Anderson, K.E. Contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. *Poultry Science* **2014**, *93*, 728–733.
14. Davies, R.; Breslin, M. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 283–287.

15. Parisi, M.A.; Northcutt, J.K.; Smith, D.P.; Steinberg, E.L.; Dawson, P.L. Microbiological contamination of shell eggs produced in conventional and free-range housing systems. *Food Control* **2015**, *47*, 161–165.
16. Broglia, A.; Kapel, C. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Vet. Parasitol.* **2011**, *182*, 2–13.
17. Kretser, A.; Dunn, C.; DeVirgiliis, R.; Levine, K. Utility of a new food value analysis application to evaluate trade-offs when making food selections. *Nutr. Today* **2014**, *49*, 185–195.
18. Fearnley, E.; Raupach, J.; Lagala, F.; Cameron, S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 219–227.
19. Moffatt, C.R.; Appuhamy, R.; Kaye, A.; Carswell, A.; Denehy, D. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium phage type 135a gastroenteritis linked to eggs served at an Australian Capital Territory café. *Commun. Dis. Intell. Quart. Rep.* **2012**, *36*, E281–E285.
20. Mitchell, E.; O’Mahony, M.; Lynch, D.; Ward, L.; Rowe, B.; Uttley, A.; Rogers, T.; Cunningham, D.; Watson, R. Large outbreak of food poisoning caused by *Salmonella* typhimurium definitive type 49 in mayonnaise. *BMJ Br. Med. J.* **1989**, *298*, 99–101.
21. Jones, D.R.; Anderson, K.E.; Guard, J.Y. Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 1195–1202.
22. Holt, P.S.; Davies, R.H.; Dewulf, J.; Gast, R.K.; Huwe, J.K.; Jones, D.R.; Waltman, D.; Willian, K.R. The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 251–262.
23. Gast, R.K.; Guraya, R.; Jones, D.R.; Anderson, K.E. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens housed in conventional or enriched cages. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 3145–3151.
24. Recio, J.I.A.; Bailie, H.; Bedriova, M.; Beloeil, P.; Boqvist, S.; Borck, B.; Camilleri, K.; Chobanov, G.; Costache, A.; De Smet, K. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *Eur. Food Saf. Auth. J.* **2007**, *97*, 1–84.
25. Greger, M. Housing and egg safety review ignores best available science on *Salmonella* risk. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, doi:10.3382/ps.2011-01369.
26. Gantois, I.; Ducatelle, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Gast, R.; Humphrey, T.J.; Van Immerseel, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 718–738.
27. De Vylder, J.; Dewulf, J.; Van Hoorebeke, S.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poult. Sci.* **2011**, *90*, 1391–1396.
28. Wales, A.; Breslin, M.; Carter, B.; Sayers, R.; Davies, R. A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathol.* **2007**, *36*, 187–197.
29. Miyamoto, T.; Horie, T.; Baba, E.; Sasai, K.; Fukata, T.; Arakawa, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 350–353.

30. Messens, W.; Grijspeerdt, K.; De Reu, K.; De Ketelaere, B.; Mertens, K.; Bamelis, F.; Kemps, B.; De Baerdemaeker, J.; Decuypere, E.; Herman, L. Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 623–628.
31. Liebana, E.; Garcia-Migura, L.; Clouting, C.; Clifton-Hadley, F.A.; Breslin, M.; Davies, R.H. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 1024–1029.
32. Davies, R.H.; Breslin, M. Persistence of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 79–84.
33. Berghaus, R.; Thayer, S.; Maurer, J.; Hofacre, C. Effect of vaccinating breeder chickens with a killed *Salmonella* vaccine on *Salmonella* prevalences and loads in breeder and broiler chicken flocks. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 727–734.
34. Arnold, M.E.; Gosling, R.J.; La Ragione, R.M.; Davies, R.H.; Martelli, F. Estimation of the impact of vaccination on faecal shedding and organ and egg contamination for *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium. *Avian Pathol.* **2014**, *43*, 155–163.
35. Smith, H.W.; Tucker, J.F. The effect of antibiotic therapy on the faecal excretion of *Salmonella* typhimurium by experimentally infected chickens. *Epidemiol. Infect.* **1975**, *75*, 275–292.
36. Li, X.; Payne, J.B.; Santos, F.B.; Levine, J.F.; Anderson, K.E.; Sheldon, B.W. *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses and characterization of the *Salmonella* Isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis, and pulsed field gel electrophoresis. *Poult. Sci.* **2007**, *86*, 591–597.
37. Diarra, M.S.; Delaquis, P.; Rempel, H.; Bach, S.; Harlton, C.; Aslam, M.; Pritchard, J.; Topp, E. Antibiotic resistance and diversity of *Salmonella enterica* serovars associated with broiler chickens. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 40–49.
38. Adesiyun, A.; Webb, L.; Musai, L.; Louison, B.; Joseph, G.; Stewart-Johnson, A.; Samlal, S.; Rodrigo, S. Resistance to antimicrobial agents among *Salmonella* isolates recovered from layer farms and eggs in the Caribbean Region. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 2153–2160.
39. Fiorentin, L.; Vieira, N.D.; Barioni W., Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol.* **2005**, *34*, 258–263.
40. James, C.; Lechevalier, V.; Ketteringham, L. Surface pasteurisation of shell eggs. *J. Food Eng.* **2002**, *53*, 193–197.
41. Wang, H.; Slavik, M.F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 276–279.
42. Hutchison, M.; Gittins, J.; Walker, A.; Sparks, N.; Humphrey, T.; Burton, C.; Moore, A. An assessment of the microbiological risks involved with egg washing under commercial conditions. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 4–11.
43. Cao, W.; Zhu, Z.W.; Shi, Z.X.; Wang, C.Y.; Li, B.M. Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* Enteritidis and its contaminated shell eggs. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *130*, 88–93.
44. Knowles, N.R. Observations on the microbiology of raw and heat-treated liquid eggs. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* **1953**, *16*, 107–118.

45. Barbour, E.K.; El Jurdi, L.; Issa, C.; Tannous, R. Preliminary attempts towards production of table eggs free from *Salmonella* Enteritidis. *J. Clean. Prod.* **2001**, *9*, 69–73.
46. Pasquali, F.; Fabbri, A.; Cevoli, C.; Manfreda, G.; Franchini, A. Hot air treatment for surface decontamination of table eggs. *Food Control* **2010**, *21*, 431–435.
47. Brewer, M.S.; Rojas, M. Consumer attitudes toward issues in food safety. *J. Food Saf.* **2008**, *28*, 1–22.
48. Mészáros, L.; Horti, K.; Farkas, J. Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments I. Gamma irradiation of shell eggs. *Acta Aliment.* **2006**, *35*, 229–236.
49. Liu, X.; Han, R.; Yun, H.; Jung, K.; Jin, D.; Lee, B.; Min, T.; Jo, C. Effect of irradiation on foaming properties of egg white proteins. *Poult. Sci.* **2009**, *88*, 2435–2441.
50. Patrick, M.E.; Adcock, P.M.; Gomez, T.M.; Altekruze, S.F.; Holland, B.H.; Tauxe, R.V.; Swerdlow, D.L. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985–1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1–7.
51. Leleu, S.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; De Reu, K.; Michiels, C.W.; De Baerdemaeker, J.; Messens, W. Effects on *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 43–48.
52. Radkowski, M. Effect of moisture and temperature on survival of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs. *Arch. Geflügelkund.* **2002**, *66*, 119–123.
53. Humphrey, T.J.; Baskerville, A.; Mawer, S.; Rowe, B.; Hopper, S. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: A study involving naturally infected hens. *Epidemiol. Infect.* **1989**, *103*, 415–423.
54. Lublin, A.; Sela, S. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the eggs. *Poult. Sci.* **2008**, *87*, 2208–2214.
55. Okamura, M.; Kikuchi, S.; Suzuki, A.; Tachizaki, H.; Takehara, K.; Nakamura, M. Effect of fixed or changing temperatures during prolonged storage on the growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis inoculated artificially into shell eggs. *Epidemiol. Infect.* **2008**, *136*, 1210–1216.
56. Humphrey, T.; Martin, K.; Whitehead, A. Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella* Enteritidis PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiol. Infect.* **1994**, *113*, 403–409.
57. Barker, J.; Naeni, M.; Bloomfield, S. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 1351–1360.
58. Stephens, N.; Sault, C.; Firestone, S.M.; Lightfoot, D.; Bell, C. Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium phage type 135 infections associated with the consumption of products containing raw egg in Tasmania. *Analysis* **2007**, *31*, 118–124.
59. Crespo, P.S.; Hernández, G.; Echeta, A.; Torres, A.; Ordóñez, P.; Aladueña, A. Surveillance of foodborne disease outbreaks associated with consumption of eggs and egg products: Spain, 2002–2003. *Eurosurveillance* **2005**, *10*, 2726, Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2726> (accessed on 25 February 2015).
60. Allen, K.D. Eggs, recipes and *Salmonella* food poisoning. *J. Public Health Med.* **1994**, *16*, 491–492.
61. Onyeneho, S.N.; Hedberg, C.W. An Assessment of Food Safety Needs of Restaurants in Owerri, Imo State, Nigeria. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 3296–3309.

62. Radford, S.A.; Board, R.G. Review: Fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. *Food Microbiol.* **1993**, *10*, 269–278.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

REVIEW

Salmonella, the host and disease: a brief review

Bryan Coburn^{1,2,3}, Guntram A Grassl^{1,3} and BB Finlay^{1,2}

***Salmonella* species cause substantial morbidity, mortality and burden of disease globally. Infections with *Salmonella* species cause multiple clinical syndromes. Central to the pathophysiology of all human salmonellosis is the induction of a strong host innate immune/inflammatory response. Whether this ultimately reflects an adaptive advantage to the host or pathogen is not clear. However, it is evident that both the host and pathogen have evolved mechanisms of triggering host responses that are detrimental to the other. In this review, we explore some of the host and pathogenic mechanisms mobilized in the two predominant clinical syndromes associated with infection with *Salmonella enterica* species: enterocolitis and typhoid.** *Immunology and Cell Biology* (2007) **85**, 112–118. doi:10.1038/sj.icb.7100007; published online 5 December 2006

Keywords: salmonella; enterocolitis; SPI; typhoid; virulence; PAMP

Salmonella enterica (*S. enterica*) is a Gram-negative facultative intracellular anaerobe of worldwide importance causing as many as 1.3 billion cases of disease annually. Over 2500 serovars of *S. enterica* have been identified belonging to six subspecies.^{1,2} Subspecies are further subdivided into serovars that are differentiated by their flagellar, carbohydrate and lipopolysaccharide (LPS) structures. *S. enterica* species are typically orally acquired pathogens that cause one of four major syndromes: enteric fever (typhoid), enterocolitis/diarrhea, bacteremia and chronic asymptomatic carriage. The disease manifestation depends on both host susceptibility and the infectious *S. enterica* serovar.² In humans, serovars Typhi, Paratyphi and Sendai cause enteric fever, while most serovars cause enterocolitis/diarrhea. Several serovars including Choleraesuis and Dublin are more commonly associated with bacteremia in humans.² While serovar Typhi is largely restricted to humans, other serovars are more broadly host adapted and cause natural animal infection. Serovars Dublin, Typhimurium and Choleraesuis cause disease in both humans and animals, but cause distinct syndromes in different hosts. Serovar Dublin causes intestinal inflammatory disease, bacteremia and abortion in cows; serovar Typhimurium causes a typhoid-like systemic illness in mice; and serovar Choleraesuis causes septicemia in pigs.³ Human typhoid fever and intestinal/diarrheal disease represent the most common syndromes associated with *S. enterica* infection and involve the pathogenic processes of both bacteria and host most thoroughly investigated in infectious models of *Salmonella* pathogenesis. Significant inflammatory disease is a common feature of typhoid and enterocolitis. The various virulence programs employed by *Salmonella* species interact with host defense mechanisms at various tissues in different stages of infection resulting in significant host immunopathology, morbidity and mortality.

TYPHOID

Human typhoid occurs following the ingestion of *S. enterica* serovar Typhi bacteria, usually from contaminated water or animal products or close contact with an infected individual or carrier.⁴ Much of the understanding of typhoid pathogenesis has arisen from the study of infection of susceptible mice with *S. enterica* serovar Typhimurium. In this model, following oral inoculation, virulent serovar Typhimurium survives gastric acidity and colonizes the ileum and cecum, likely by out-competing the resident microflora.^{5,6} Via invasion of the phagocytic epithelial M-cells covering Peyer's patches (PP), as well as through uptake by dendritic cells (DCs), bacteria are translocated across the intestinal epithelium and gain access to the host circulation or are carried from the gut within CD18 expressing phagocytes.^{7–9} Upon extraintestinal infection, bacteria disseminate via the reticulo-endothelial system (RES) and take up residence in granulomatous foci within various splenocytes, predominantly macrophages, DCs and polymorphonuclear leukocytes (PMNs), as well as hepatocytes and other non-professional phagocytes in the liver.^{10–12} In the absence of intestinal infection, intracellular replication and survival may be considered the central virulence features of typhoid. Upon translocation to systemic sites, or upon inoculation of the bacteria into the peritoneal cavity, survival of phagocytic killing is an essential component of bacterial virulence. Fields *et al.*¹³ demonstrated that bacterial survival within phagocytes was essential for virulence. *Salmonella* is capable of infecting a wide variety of cells including DCs, macrophages, hepatocytes, neutrophils, colonocytes and other epithelial cells. *In vitro*, within minutes of contact with cells, *Salmonella* are internalized and take up residence in a unique membrane-bound compartment distinct from a phagosome or lysosome, termed the *Salmonella* containing vacuole (SCV).^{14–16} Within phagocytes, *Salmo-*

¹Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada and ²Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

³These authors have contributed equally to this work.

Correspondence: Professor BB Finlay, Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, 2185 East Mall, Vancouver, British Columbia, Canada V5T 1Z4.

E-mail: bfinlay@interchange.ubc.ca

Received 23 June 2006; accepted 17 July 2006; published online 5 December 2006

nella SCV formation has the important function of evading endosomal fusion with the phagocyte oxidase complex.¹⁷

In humans, typhoid disease manifests one to 2 weeks following bacterial inoculation with generalized fever and malaise, abdominal pain with or without other symptoms including headache, myalgias, nausea, anorexia and constipation. Diarrhea occurs occasionally but is typical only of infection in the immunocompromised. Hepatosplenomegaly is common but not present in all cases and diffuse abdominal tenderness is usual. Fever is typically mild at first and worsening as disease progresses (reviewed by Parry *et al.*¹⁸). In the absence of complications, disease resolves following varied periods of infection although carriage of the bacteria can continue in post-symptomatic patients for months or years and relapse occurs in a minority of patients. The primary treatment for serovar Typhi infection is fluoroquinolones, although nalidixic acid and other antimicrobial agents are also used. Treatment is effective in the vast majority of cases and decreases time to bacterial clearance, carriage rates and infection-associated morbidity and mortality.¹⁸

ENTEROCOLITIS AND DIARRHEA

Although estimates vary greatly due to a lack of consistent diagnosis and reporting, between 200 million and 1.3 billion cases of intestinal disease including 3 million deaths due to non-typhoidal *Salmonella* are estimated to occur each year worldwide.¹⁹ Like typhoid, the incidence of intestinal disease caused by non-typhoidal *Salmonella* species is highest in the developing world, but is also of considerable importance in developed countries. Until the development of a new murine model of *Salmonella* enteropathogenesis,²⁰ the study of intestinal disease was largely restricted to the study of bovine ileal loop inoculations and oral infections and cultured intestinal epithelial cells.

In animal models, upon colonization of the intestine by virulent *S. enterica*, bacteria localize to the apical epithelium, induce invasion-associated virulence machinery and elicit significant inflammatory changes including focal and diffuse PMN infiltrate, crypt abscesses, epithelial necrosis, edema and fluid secretion.^{21–24} Human, bovine, murine and rabbit serovar Typhimurium enterocolitis is most severe in the caudal ileum, the cecum and the proximal colon. Neutrophil recruitment to intestinal epithelium is the histopathological hallmark of intestinal disease. *In vitro*, PMN recruitment to cultured epithelial monolayers occurs via the induction of interleukin-8 (IL-8) by *Salmonella* proximate to the apical epithelium.²⁵ The ability of various *S. enterica* strains to cause human intestinal disease correlated to their ability to attract PMNs across T84 cell monolayers, notably without requiring epithelial invasion.²⁶ While neutrophil recruitment by serovar Typhimurium occurs within the first 1–3 h of infection, massive neutrophil migration and the secretion of protein-rich exudates into the intestinal lumen do not occur until 8–10 h following infection and diarrhea begins approximately 8–72 h after bacterial colonization.^{27,28} Both the temporal separation of inflammation and secretory diarrhea and other evidence indicating that *Salmonella* in different growth stages show differential induction of inflammation vs secretory responses²⁹ suggest that, although perhaps related, diarrhea and inflammation occur independently in enteropathogenesis.

Disease in humans typically follows the ingestion of greater than 50 000 bacteria in contaminated food or water with symptoms occurring between 6 and 72 h after consumption. Onset of symptoms is marked by acute onset, crampy, abdominal pain and diarrhea with or without blood. Nausea and vomiting are also common. Commonly a disease of the ileum, inflammation in non-typhoidal disease also occurs in the large bowel, with rare infections in the jejunum, duodenum and stomach.^{21,30} Enterocolitic infection in children is

marked by increased inflammatory severity, bloody diarrhea and increased duration of infection and risk of complication.

In the absence of treatment for gut-limited infections, symptoms usually last between 5–7 days and resolve spontaneously. Treatment of fluid and electrolyte imbalances by oral or intravenous rehydration is necessary in cases where fluid loss is substantial. In adults, specific antimicrobial therapy is indicated only in the presence of positive signs of invasive disease, and does not decrease the duration of illness or the severity of symptoms. Neonatal gut infection also requires treatment to prevent invasion.

SALMONELLA VIRULENCE DETERMINANTS IN IMMUNE ACTIVATION

Using cell culture and animal models of *Salmonella* infection, multiple virulence determinants critical for the induction of inflammatory/immune responses in infected hosts have been identified. Proinflammatory stimuli during *Salmonella* infection may be broadly considered as representative of two categories: pathogen-associated motifs that are capable of stimulating innate immunity; and virulence-associated proinflammatory behaviors that coopt or exploit host processes resulting in disease pathology. Of critical importance for *in vivo* virulence are the *Salmonella* pathogenicity islands (SPI), in particular SPI-1 and -2. Both SPIs encode a molecular apparatus called a type III secretion system (T3SS) capable of injecting bacterial proteins known as ‘effectors’ through bacterial and host membranes into host cells (translocation) or the extracellular milieu (secretion) to directly influence host biochemistry and cell physiology.

SPI-1 AND INFLAMMATION

In 1989, Galan and Curtiss³¹ identified *Salmonella* genes essential for bacterial invasiveness in cell culture and complete oral virulence that were later shown to be part of a horizontally acquired pathogenicity island, SPI-1.³² Although initially characterized as an invasiveness island, SPI-1 has additional functions related to the activation of innate immune pathways. SPI-1-dependent inflammation appears to reflect multiple processes: (1) the induction of PMN recruitment across intestinal epithelia by the SPI-1 secreted effector SipA; (2) the activation of NF- κ B signaling by the concerted activity of SPI-1-translocated effectors, and; (3) the activation of caspase-1-mediated IL-1 β /IL-18 activation and proinflammatory cell death by the SPI-1-translocated effector SipB.

SIPA AND NEUTROPHIL RECRUITMENT

The recruitment of neutrophils to and across cultured epithelial monolayers requires production of IL-8 and pathogen elicited epithelial chemoattractant (PEEC) and the SPI-1 effector SipA.^{33–35} Secretion or direct addition of purified SipA within the vicinity of intestinal epithelial monolayers induces the production of PEEC and the consequent recruitment and activation of basolateral neutrophils to the apical epithelial membrane.

SIPB AND ‘PYROPTOSIS’

The SPI-1 effector and translocase SipB is also critical for inflammatory disease *in vivo*,³⁶ and *in vitro* is required for the induction of specific inflammatory cascades.³⁷ Upon host cell contact, the SPI-1 T3SS translocates SipB into the host cell cytosol, where it binds caspase-1 (IL-1 β -converting enzyme) resulting in the catalytic cleavage and release of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18.³⁷ This also induces a rapid proinflammatory cell death that has features of both apoptosis and necrosis and has been termed ‘pyroptosis’ due to its proinflammatory nature. Studies of the importance of caspase-1 activation in model

infections have yielded conflicting results^{38,39} suggesting alternately that SPI-1-mediated activation of caspase-1 was necessary for efficient translocation of bacteria from the intestinal lumen to systemic sites during murine typhoid pathogenesis,³⁸ and that caspase-1-deficient mice had increased susceptibility to intestinal infection with *Salmonella*.³⁹ The use of congenic mice, and the corroborative evidence in the latter study indicating that both caspase-1- and IpaF-deficient mice were more susceptible to murine typhoid suggest that caspase-1 plays a protective proinflammatory role in infection.

SPI-1 EFFECTORS AND NF- κ B SIGNALING

Salmonella SPI-1 T3S results in activation of mitogen-associated protein kinases (MAPKs) resulting in the induction of NF- κ B.^{40,41} This requires the activation of Cdc42 and downstream MAPK signaling by the SPI-1 effector SopE.⁴² Interestingly, it is the coordinated activity of the SPI-1 effectors SipA, SopB, SopD and SopE/E2 that induce bacterial uptake by activating intracellular signaling cascades and cytoskeletal machinery. Subsequent to the activation of this important proinflammatory cascade, another SPI-1 effector, SptP antagonizes this pathway, resulting in a significant but transient SPI-1-dependent activation of NF- κ B signaling.⁴³ *In vivo*, this combination of effectors are essential for early inflammatory pathogenesis in mice and cows, explaining in part the overlap between intestinal invasiveness and inflammatory pathogenicity in some models of infection.^{44–53}

In vivo, SPI-1-mediated behaviors seem to be critical for early intestinal inflammation,^{54–56} yet their absence does not influence systemic inflammation following intraperitoneal challenge,³¹ and delayed intestinal inflammation occurs in their absence.^{57,58} Interestingly, although incapable of inducing PEEC-mediated transmigration of neutrophils across model epithelia, comparison of the inflammatory gene expression profiles of cultured intestinal epithelial monolayers infected with wild-type serovar Typhimurium or those with a complete deletion of the SPI-1 pathogenicity island demonstrated little difference in the proinflammatory potential of these strains.⁵⁹ It is apparent therefore that additional factors operating independently of SPI-1 are sufficient to induce inflammatory disease.

SPI-2

The SPI-2 pathogenicity island is essential for intracellular parasitism and systemic virulence in murine typhoid^{60–62} and is essential for evasion of the phagocyte oxidase machinery of the host.¹⁷ Recently, roles for the SPI-2 T3SS have been identified in inflammatory disease as well, indicating that SPI-2 is critical for early and complete induction of *Salmonella* enterocolitis,^{57,63,65} as well as systemic disease. Although the proinflammatory activity of SPI-2 is less well described, several interesting candidates have been identified as potential pathways of SPI-2-mediated immune agonism.

Intestinal inflammation induced in the absence of SPI-1 in mice requires the Toll-like receptor (TLR) adapter MyD88.⁶⁴ Although the specific role of SPI-2 in TLR-mediated activation has not been elucidated, it may in part depend on the delivery of other proinflammatory motifs to the appropriate compartment of the intestine, for example, the subepithelial compartment.⁶⁶ In a series of papers, Uchiya et al.^{67–69} also demonstrate that SPI-2 is involved in the induction of cyclooxygenase as well as the modulation of host cytokine expression and signaling.

SALMONELLA PATHOGEN-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS AND IMMUNE ACTIVATION

Pattern recognition receptors (PRRs) are a crucial innate immune response system that is broadly conserved across wide evolutionary

lineages. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) include constituents of viral, fungal and bacterial pathogens capable of stimulating PRRs to induce immune responses. Several PAMPs of pathophysiological importance are presented by *Salmonella* during infection. Principal among these are bacterial LPS and flagellin, the monomeric subunit of the bacterial flagellar apparatus.

TLR4 AND LPS

The activation of TLR4 in response to *Salmonella* LPS is essential for inducing host responses. Mice lacking a functional TLR4 show dramatically increased susceptibility to infection, regardless of the presence of other *Salmonella* resistance loci.^{70–74} TLR4 is required for a complete inflammatory response to *Salmonella* LPS administered intravenously, and *Salmonella* LPS is a potent inducer of inflammatory responses in macrophages,^{75,76} indicating that *Salmonella* LPS is an important inducer of sepsis during systemic infection.⁷⁷ In contrast to murine typhoid, a role for LPS in intestinal inflammatory salmonellosis has not been established. Although LPS stimulation of macrophages may be involved in intestinal disease, the absence of LPS receptor CD14 on intestinal epithelial cells makes it unlikely that the intestinal epithelium is involved in the direct response to *Salmonella* LPS.

FLAGELLIN

Salmonella flagellin is a potent inducer of host inflammation in polarized epithelial monolayers when delivered to the basolateral surface of the epithelium.^{59,78} Once delivered there, *Salmonella* flagellin induces IL-8 secretion via calcium-dependent NF- κ B activation by stimulating basolateral TLR5.^{78–81} Recently published evidence indicates that *Salmonella* flagellin can also activate inflammatory signaling intracellularly. In primary and cultured macrophages, intracellular monomeric flagellin is capable of inducing the caspase-1 activation of IL-1 β and IL-18 in a manner that requires intracellular PRR signaling.^{82,83} Notably, this activation occurs in the absence of TLR5 and in LPS-tolerized macrophages, indicating that it does not require TLR activation. *Salmonella* produce and secrete monomeric flagellin *de novo* following stimulation with intestinal epithelial culture supernatants,⁸⁴ suggesting a sequence in which *Salmonella* detect host cells, produce flagellin and translocate it into host cell cytosol via the SPI-1 T3SS.

Flagellin stimulation of innate immune responses is critical for intestinal inflammation, but not for murine typhoid. In a model of murine intestinal inflammation, flagellar *Salmonella* mutants cause attenuated early intestinal disease.⁸⁵ Interestingly, the proinflammatory potential of flagellin at least partly requires its SPI-2-dependent translocation to the basolateral membrane of the intestinal epithelium.⁸⁶

SPIs AND THE DELIVERY OF FLAGELLIN

Although capable of inducing intestinal inflammatory responses discretely in intestinal epithelial monolayers, SPI-1 and -2 and PAMP delivery seem intertwined. The proinflammatory capability of *Salmonella* flagellin monomers depends both on SPI-1 and -2. The ability of monomeric flagellin to induce caspase-1 activation requires a functional SPI-1 T3SS.⁸³ Furthermore, while the transcytosis of flagellin occurs within 15 min of contact with intestinal epithelium and does not require bacterial internalization,⁷⁸ it does require SPI-2 T3SS,⁸⁶ and, as noted, SPI-2-dependent SPI-1-independent inflammation requires the presence of the TLR signaling adapter MyD88.⁸⁷ These data suggest the interesting possibility that SPI-1 and SPI-2 represent PAMP-delivery systems during *in vivo* pathogenesis of

Salmonella immune activation, accounting for some component of their functions as virulence factors.

CYTOKINES IN SALMONELLA INFECTIONS

Multiple proinflammatory pathways are clearly involved in *Salmonella* immune activation. Data from murine and bovine infections with bacterial strains lacking a variety of virulence strategies substantiate this observation *in vivo*. However, bacterial virulence programs are not solely responsible for the immunopathology of typhoid or enterocolitis, as the disease manifestations represent an interaction between host and pathogen. Critical to the development of disease is the host signaling milieu induced by contact between microbe and host cells in various tissues, largely mediated by cytokine signaling.

Cytokines play a crucial role in initiating and regulating the innate and adaptive immune response against *Salmonella*. The right balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is essential to control infections and to avoid damage to the host. Cytokines are expressed by many different cell types and they act on various cells. Experiments in tissue culture, bone marrow derived or primary cells demonstrate that *Salmonella* can trigger the synthesis of cytokines and chemokines in epithelial cells,⁸⁸ macrophages^{89,90} and DCs.^{91–93} The consequences of cytokine activation vary. While interferon (IFN)- γ , IL-12, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-18, transforming growth factor - β and CCL2 have protective functions during *Salmonella* infection, IL-4 and IL-10 interfere with host defenses (reviewed by Eckmann and Kagnoff⁹⁴).

HUMAN CYTOKINE ABNORMALITIES AND SUSCEPTIBILITY TO SALMONELLA

A variety of cytokine abnormalities contribute to susceptibility to *Salmonella* infections in humans. Genetic deficiencies in the type I cytokine pathway (IFN- γ /IL-12/IL-23) result in increased susceptibility to infection with intracellular pathogens such as *Salmonella* and *Mycobacteria*.^{95,96} Non-typhoidal *Salmonella* serovars can cause severe extraintestinal disease in patients with these abnormalities. IL-12, produced by antigen presenting cells (APC) such as macrophages and DCs, induces the production of IFN- γ by natural killer (NK) cells and T cells which in turn further upregulates IL-12 production in APC. IFN- γ then enhances antimicrobial activity in macrophages, NK cells and neutrophils, although this role in *Salmonella* infection may not be critical for control of infection. Deficiencies in IL-12b, the common p40 subunit of IL-12 and IL-23, and IL-12R β 1 which is the common receptor subunit for IL-12 and IL-23, result in susceptibility to *Salmonella*. In contrast patients with deficiencies in IFN- γ R1 or IFN- γ R2 are frequently infected with *Mycobacteria* but less frequently with *Salmonella*.^{97–101} Thus, it seems that IL-12/IL-23 exert protective effects against infection with *Salmonella* independently of induction of IFN- γ . A possible IFN- γ -independent mechanism could be the upregulation of TNF- α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-17 by IL-23 leading to enhanced bacterial killing and enhanced nitric oxide (NO) production in macrophages, respectively.

MURINE CYTOKINES IN CONTROL OF SALMONELLA INFECTION

In mice, the first cells encountered by *Salmonella* are intestinal epithelial cells, DCs and macrophages. Interaction with these cells leads to the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines leading to a massive influx of neutrophils, macrophages and immature DCs. IFN- γ , TNF- α and IL-12 have been well demonstrated to be crucial for resistance to *Salmonella*. IFN- γ is important for control of bacterial replication in the early phase of infection,¹⁰² but is not

sufficient for eradication of bacteria.¹⁰³ TNF- α enhances microbicidal activity synergistically with IFN- γ and triggers the production of NO.¹⁰⁴ Neutralization of IFN- γ results in decreased killing of *Salmonella* whereas neutralization of TNF- α results in a increased bacterial replication.¹⁰⁵

IFN- γ production is rapidly upregulated in gut-associated lymphoid tissue (GALT) and spleen by infection with serovar Typhimurium.^{106,107} The main producers of IFN- γ and TNF- α in naive *Salmonella*-infected mice appear to be macrophages and neutrophils,¹⁰⁸ although CD1d-restricted NKT cells also contribute to early IFN- γ production in *Salmonella* infected mice in a manner dependent on IL-12 produced by APCs.¹⁰⁹ T cells and NK cells only produce trace amounts of IFN- γ in a primary infection. In contrast, infection of immunized animals leads to IFN- γ production primarily by T cells and NK1.1+ cells but not by APCs.¹⁰⁸ Furthermore, IFN- γ has been demonstrated to control chronic infections with serovar Typhimurium. Anti-IFN- γ antibody treatment of mice carrying a chronic infection with *Salmonella* reactivates the infection and the bacterial burden in systemic sites increases.¹¹⁰

In addition, preweaned mice exhibit increased susceptibility to *Salmonella* compared to adult mice. This is due to the low expression of IFN- γ in these mice. IFN- γ is upregulated in 6-week-old mice compared to young animals during enterocolitic infection, and intestinal inflammatory disease in preweaned animals results in higher bacterial load in the spleen and lower TNF- α , similar to an infection of IFN- γ ^{-/-} mice.¹¹¹ Thus, IFN- γ is important in animal models of both typhoid and enterocolitis. As is clear from the data of human patients IL-12 is important to control *Salmonella* infections.¹¹² This may relate to IFN- γ function, as IL-12 is a potent activator of IFN- γ production. However, it may also be in part due to IFN- γ independent IL-23-mediated effects as discussed above. IL-12p35^{-/-} mice are more resistant than IL-12p40^{-/-} mice to infection with serovar Typhimurium or serovar Enteritidis as IL-12p40^{-/-} have higher bacterial burdens and decreased serum cytokine levels of IFN- γ and TNF- α .¹¹³ IL-18 contributes to IL-12 induced IFN- γ in *Salmonella* infected mice and anti IL-18 treatment diminishes IFN- γ levels in PP late in infection and survival time.^{114,115}

Cytokine and chemokine production may not only have beneficial but also pathological consequences for the host. Chemokines such as MCP-1, CCL2, CCL20 and CCL3 have protective roles in *Salmonella* infections (119, 120) but may also lead to tissue destruction by triggering a massive influx of inflammatory cells into infected organs.

Inflammation in any host is a heterogeneous process and is the culmination of the activation of numerous complex and interacting proinflammatory cascades that are collectively influenced by host and pathogenic behaviors. A double-edged sword, inflammation is the strategy by which the host controls infection, the Trojan horse by which some pathogens gain influence over host physiology and ultimately the cause of death for either the pathogen or host in all acute infections. Clearly, during infection with *Salmonella enterica* species, both host and bacteria provide powerful stimuli to host innate immune/inflammatory responses.

Salmonella contains multiple virulence mechanisms that, when activated, result in the induction of an inflammatory response within the host. Newly discovered roles for SPIs 1 and 2 in activation of innate immunity and inflammation in human cells and animal models demonstrate that these bacteria have evolved specific mechanisms to elicit a dramatic host response. While the role of some SPI-1 behaviors in innate immune activation has been well established, newly discovered pathways – such as the SPI-1 dependent delivery of PAMPs to intracellular pattern-recognition receptors – also clearly represent

critical steps in the etiopathogenesis of *Salmonella*-induced disease. Recently described roles for SPI-2 in intestinal inflammatory disease suggest that *Salmonella* employs multiple, parallel systems of innate immune activation in order to effect a specific series of inflammatory changes. These behaviors have evolved despite the obvious potential antibacterial effects of the host response induced, suggesting that they confer some adaptive advantage upon the bacteria, perhaps creating a new host environment more susceptible to invasion, or cause the recruitment of cells critical for dissemination of bacteria to systemic organs, and consequent retransmission into the environment.

Similarly, hosts susceptible to *Salmonella* infection mobilize responses that are necessary for effective control of infection. The activation of cytokine responses, or the presence of critical host resistance factors such as TLR4, Nramp1 or phagocyte oxidase, are essential for a cogent and effective immune response to *Salmonella*. In their absence, experimental infections with bacteria are almost always fatal. Yet, it is because of the induction of many of these responses that the clinical sequelae of *Salmonella* infection, such as sepsis, septic shock and inflammation, occur.

As new pathways are investigated in which *Salmonella* and hosts interact to produce innate and adaptive immune dysfunction, the pathophysiology of this important disease will come to be better understood. While judicious use of antimicrobials may represent the backbone of treatment for *Salmonella* infections, the use of immunomodulatory agents have the potential to selectively enhance the host's ability to control infection, without the risk of developing antibiotic resistance. Furthermore, identifying bacterial factors that are critical for inducing disease vs bacterial colonization suggests bacterial targets for the generation of more effective vaccines.

Whether inflammation favors the host or the bacteria may depend not only on the severity but also the nature of the inflammatory response. Using multiple interacting virulence strategies, infection with various *Salmonella* species and serovars results in significant immune activation and consequent morbidity and mortality. Host responses, while clearly critical for control of infection, can also contribute to the nature and severity of the immunopathology. While the ultimate outcome of this competition may favor the host or bacteria in ways we do not yet understand, it is clear that an understanding of these competing forces represents an important step in developing novel approaches to prophylaxis and therapy for *Salmonella* infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

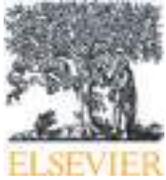
We would like to thank members of the lab for critical review of the manuscript. The work in the Finlay lab is supported by operating grants to BBF from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI). BAC is a recipient of a Studentship from the CIHR, GAG is a recipient of a Fellowship by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), the Michael Smith Foundation for Health Research (MSFHR) and Genome Canada. BBF is a CIHR Distinguished Investigator, an HHMI International Research Scholar and the University of British Columbia Peter Wall Distinguished Professor.

- 1 Ochman H, Groisman EA. The origin and evolution of species differences in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *EXS* 1994; **69**: 479–493.
- 2 Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 2001; **107**: 775–780.
- 3 Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 1998; **66**: 4579–4587.
- 4 Hornick RB. Pathogenesis of typhoid fever. *J Egypt Public Health Assoc* 1970; **45**: 247–259.

- 5 Bonhoff M, Drake BL, Miller CP. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; **86**: 132–137.
- 6 Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* 2005; **73**: 3228–3241.
- 7 Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994; **180**: 15–23.
- 8 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; **2**: 361–367.
- 9 Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W et al. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999; **401**: 804–808.
- 10 Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 1997; **186**: 569–580.
- 11 Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers BJ, Ljunggren HG, Wick MJ. *In vivo* activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2001; **69**: 5726–5735.
- 12 Nakoneczna I, Hsu HS. The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis. *Br J Exp Pathol* 1980; **61**: 76–84.
- 13 Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 5189–5193.
- 14 Gorvel JP, Meresse S. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. *Microbes Infect* 2001; **3**: 1299–1303.
- 15 Meresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* 1999; **18**: 4394–4403.
- 16 Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB. Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1999; **1**: 33–49.
- 17 Vazquez-Torres A, Xu YS, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 2000; **287**: 1655–1658.
- 18 Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. *N Engl J Med* 2002; **347**: 1770–1782.
- 19 World Health Organization Drug-Resistant *Salmonella*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>. 2005. WHO website.
- 20 Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M et al. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 2003; **71**: 2839–2858.
- 21 McGovern VJ, Slavutin LJ. Pathology of *Salmonella* Colitis. *Am J Surg Pathol* 1979; **3**: 483–490.
- 22 Giannella RA, Formal SB, Dammin GJ, Collins H. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum. *J Clin Invest* 1973; **52**: 441–453.
- 23 Clarke RC, Gyles CL. Virulence of wild and mutant strains of *Salmonella typhimurium* in ligated intestinal segments of calves, pigs, and rabbits. *Am J Vet Res* 1987; **48**: 504–510.
- 24 Finlay BB, Heffron F, Falkow S. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 1989; **243**: 940–943.
- 25 McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993; **123**: 895–907.
- 26 McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae – a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 1995; **63**: 2302–2309.
- 27 Tsolis RM, Adams LG, Ficht TA, Baumler AJ. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 1999; **67**: 4879–4885.
- 28 Wray C, Sojka WJ. Experimental *Salmonella typhimurium* infection in calves. *Res Vet Sci* 1978; **25**: 139–143.
- 29 Wallis TS, Hawker RJ, Candy DC, Qi GM, Clarke GJ, Worton KJ et al. Quantification of the leucocyte influx into rabbit ileal loops induced by strains of *Salmonella typhimurium* of different virulence. *J Med Microbiol* 1989; **30**: 149–156.
- 30 Boyd JF. Pathology of the alimentary tract in *Salmonella typhimurium* food poisoning. *Gut* 1985; **26**: 935–944.
- 31 Galan JE, Curtiss III R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6383–6387.
- 32 Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 1995; **15**: 749–759.
- 33 McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 1998; **160**: 455–466.
- 34 Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL, McCormick BA. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect Immun* 1999; **67**: 608–617.

- 35 Lee CA, Silva M, Siber AM, Kelly AJ, Galyov E, McCormick BA. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12283–12288.
- 36 Zhang SP, Santos RL, Tsois RM, Stender S, Hardt WD, Baumler AJ *et al*. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 2002; **70**: 3843–3855.
- 37 Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2396–2401.
- 38 Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* 2000; **192**: 249–258.
- 39 Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ *et al*. Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J Exp Med* 2006; **203**: 1407–1412.
- 40 Chen LM, Hobbie S, Galan JE. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 1996; **274**: 2115–2118.
- 41 Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997; **159**: 5550–5559.
- 42 Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998; **93**: 815–826.
- 43 Fu Y, Galan JE. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999; **401**: 293–297.
- 44 Watson PR, Paulin SM, Bland AP, Jones PW, Wallis TS. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infect Immun* 1995; **63**: 2743–2754.
- 45 Lodge J, Douce GR, Amin II, Bolton AJ, Martin GD, Chatfield S *et al*. Biological and genetic characterization of TnpA mutants of *Salmonella typhimurium* TML in the context of gastroenteritis. *Infect Immun* 1995; **63**: 762–769.
- 46 Watson PR, Galyov EE, Paulin SM, Jones PW, Wallis TS. Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infect Immun* 1998; **66**: 1432–1438.
- 47 Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S *et al*. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 1997; **25**: 903–912.
- 48 Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson PR, Wallis TS, Galyov EE. Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* 1998; **66**: 5799–5804.
- 49 Wallis TS, Wood M, Watson P, Paulin S, Jones M, Galyov E. Sips, Sops, and SPIs but not STN influence *Salmonella* enteropathogenesis. *Mech Pathogen Enteric Dis* 2 1999; **473**: 275–280.
- 50 Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 1998; **29**: 883–891.
- 51 Wood MW, Jones MA, Watson PR, Siber AM, McCormick BA, Hedges S *et al*. The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cell Microbiol* 2000; **2**: 293–303.
- 52 Zhang S, Santos RL, Tsois RM, Mirolid S, Hardt WD, Adams LG *et al*. Phage mediated horizontal transfer of the *sopE1* gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **217**: 243–247.
- 53 Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S *et al*. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 2005; **73**: 146–154.
- 54 Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J *et al*. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003; **71**: 1–12.
- 55 Santos RL, Tsois RM, Baumler AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res* 2003; **36**: 3–12.
- 56 Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 2004; **72**: 795–809.
- 57 Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y *et al*. Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005; **73**: 7161–7169.
- 58 Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M *et al*. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; **174**: 1675–1685.
- 59 Zeng H, Carlson AQ, Guo YW, Yu YM, Collier-Hyams LS, Madara JL *et al*. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol* 2003; **171**: 3668–3674.
- 60 Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 1995; **269**: 400–403.
- 61 Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2593–2597.
- 62 Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7800–7804.
- 63 Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005; **73**: 3219–3227.
- 64 Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M *et al*. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; **174**: 1675–1685.
- 65 Bispham J, Tripathi BN, Watson PR, Wallis TS. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* 2001; **69**: 367–377.
- 66 Hapfelmeier S, Hardt WD. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 497–503.
- 67 Uchiya K, Groisman EA, Nikai T. Involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2 in the up-regulation of interleukin-10 expression in macrophages: Role of protein kinase A signaling pathway. *Infect Immun* 2004; **72**: 1964–1973.
- 68 Uchiya K, Nikai T. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent expression of suppressor of cytokine signaling 3 in macrophages. *Infect Immun* 2005; **73**: 5587–5594.
- 69 Uchiya K, Nikai T. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection induces cyclooxygenase 2 expression in macrophages: involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Infect Immun* 2004; **72**: 6860–6869.
- 70 MacVittie TJ, O'Brien AD, Walker RI, Weinberg SR. Inflammatory response of LPS-hyporesponsive and LPS-responsive mice to challenge with Gram-negative bacteria *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Adv Exp Med Biol* 1982; **155**: 325–334.
- 71 O'Brien AD, Weinstein DA, Soliman MY, Rosenstreich DL. Additional evidence that the Lps gene locus regulates natural resistance to *S. typhimurium* in mice. *J Immunol* 1985; **134**: 2820–2823.
- 72 O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol* 1980; **124**: 20–24.
- 73 Weinstein DL, Lissner CR, Swanson RN, O'Brien AD. Macrophage defect and inflammatory cell recruitment dysfunction in *Salmonella* susceptible C3H/HeJ mice. *Cell Immunol* 1986; **102**: 68–77.
- 74 Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J *et al*. Toll-like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to *Salmonella*: importance of the Kupffer cell network. *J Immunol* 2004; **172**: 6202–6208.
- 75 Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock RE, Finlay BB. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J Immunol* 2000; **164**: 5894–5904.
- 76 Royle MC, Totemeyer S, Alldridge LC, Maskell DJ, Bryant CE. Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *J Immunol* 2003; **170**: 5445–5454.
- 77 O'Brien GC, Wang JH, Redmond HP. Bacterial lipoprotein induces resistance to Gram-negative sepsis in TLR4-deficient mice via enhanced bacterial clearance. *J Immunol* 2005; **174**: 1020–1026.
- 78 Gewirtz AT, Simon Jr PO, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD *et al*. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 2001; **107**: 99–109.
- 79 Yu Y, Zeng H, Lyons S, Carlson A, Merlin D, Neish AS *et al*. TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; **285**: G282–G290.
- 80 Gewirtz AT, Rao AS, Simon Jr PO, Merlin D, Carnes D, Madara JL *et al*. *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca(2+)-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 2000; **105**: 79–92.
- 81 Zeng H, Wu H, Sloane V, Jones R, Yu Y, Lin P *et al*. Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G96–G108.
- 82 Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R *et al*. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol* 2006; **7**: 576–582.
- 83 Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI *et al*. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 2006; **7**: 569–575.
- 84 Subramanian N, Qadri A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic *Salmonella*. *Nat Immunol* 2006; **7**: 583–589.
- 85 Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 2004; **72**: 4138–4150.
- 86 Lyons S, Wang L, Casanova JE, Sitaraman SV, Merlin D, Gewirtz AT. *Salmonella typhimurium* transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J Cell Sci* 2004; **117**: 5771–5780.
- 87 Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M *et al*. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; **174**: 1675–1685.
- 88 Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E *et al*. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; **95**: 55–65.

- 89 Rosenberger CM, Pollard AJ, Finlay BB. Gene array technology to determine host responses to *Salmonella*. *Microb Infect* 2001; **3**: 1353–1360.
- 90 Svensson M, Johansson C, Wick MJ. *Salmonella typhimurium*-induced cytokine production and surface molecule expression by murine macrophages. *Microb Pathog* 2001; **31**: 91–102.
- 91 Yrlid U, Wick MJ. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon *Salmonella* encounter. *J Immunol* 2002; **169**: 108–116.
- 92 Pietila TE, Veckman V, Kyllonen P, Lahteenmaki K, Korhonen TK, Julkunen I. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in *Salmonella*-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2005; **78**: 909–920.
- 93 Yrlid U, Svensson M, Johansson C, Wick MJ. *Salmonella* infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; **27**: 313–320.
- 94 Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microb Infect* 2001; **3**: 1191–1200.
- 95 Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet* 2002; **32**: 97–105.
- 96 van d V, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**: 739–749.
- 97 de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, Breda Vriesman PJ *et al*. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998; **280**: 1435–1438.
- 98 Doffinger R, Patel S, Kumararatne DS. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* 2005; **17**: 440–446.
- 99 Sanal O, Turul T, De Boer T, van d V, Yalcin I, Tezcan I *et al*. Presentation of interleukin-12/23 receptor beta1 deficiency with various clinical symptoms of *Salmonella* infections. *J Clin Immunol* 2006; **26**: 1–6.
- 100 Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998; **19**: 491–494.
- 101 MacLennan C, Fieschi C, Lammas DA, Picard C, Dorman SE, Sanal O *et al*. Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against *Salmonella* in humans. *J Infect Dis* 2004; **190**: 1755–1757.
- 102 Muotiala A, Makela PH. The role of IFN-gamma in murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microb Pathog* 1990; **8**: 135–141.
- 103 Muotiala A, Makela PH. Role of gamma interferon in late stages of murine salmonellosis. *Infect Immun* 1993; **61**: 4248–4253.
- 104 Tite JP, Dougan G, Chatfield SN. The involvement of tumor necrosis factor in immunity to *Salmonella* infection. *J Immunol* 1991; **147**: 3161–3164.
- 105 Gulig PA, Doyle TJ, Clare-Salzler MJ, Maiese RL, Matsui H. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1997; **65**: 5191–5197.
- 106 Nauciel C, Espinasse-Maes F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* 1992; **60**: 450–454.
- 107 Ramarathinam L, Niesel DW, Klimpel GR. *Salmonella typhimurium* induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J Immunol* 1993; **150**: 3973–3981.
- 108 Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ. The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J Immunol* 2002; **169**: 4450–4459.
- 109 Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1230–1237.
- 110 Monack DM, Bouley DM, Falkow S. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrp1+/+ mice and can be reactivated by IFN-gamma neutralization. *J Exp Med* 2004; **199**: 231–241.
- 111 Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric *Salmonella* infection. *J Immunol* 2005; **175**: 1127–1136.
- 112 Mastroeni P, Harrison JA, Chabalgoity JA, Hormaeche CE. Effect of interleukin 12 neutralization on host resistance and gamma interferon production in mouse typhoid. *Infect Immun* 1996; **64**: 189–196.
- 113 Lehmann J, Bellmann S, Werner C, Schroder R, Schutze N, Alber G. IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against *Salmonella enteritidis*. *J Immunol* 2001; **167**: 5304–5315.
- 114 Dybing JK, Walters N, Pascual DW. Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated *Salmonella typhimurium* infections. *Infect Immun* 1999; **67**: 6242–6248.
- 115 Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H *et al*. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1999; **67**: 478–483.



Salmonella Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control

Zoe R. Howard ^a, Corliss A. O'Bryan ^b, Philip G. Crandall ^b, Steven C. Ricke ^{b,*}

^a Department of Defense, San Antonio, Texas 78215, United States

^b Center for Food Safety and Department of Food Science, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas 72704, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2011

Accepted 14 April 2011

Keywords:

Salmonella Enteritidis

Shell eggs

Horizontal transmission

Vertical transmission

ABSTRACT

Foodborne illness caused by *Salmonella* spp. is a worldwide problem. In the United States *Salmonella* Enteritidis is the second most commonly isolated serotype from human illness, and is known to be strongly associated with shell eggs and egg containing products. Eggs can become contaminated internally either by penetration through the shell or directly during formation in the reproductive tract. This review begins with a brief account of the physiology of egg production and the various physical and chemical barriers the egg possesses to prevent bacterial contamination. Factors involved in vertical and horizontal transmission of *S. Enteritidis* are examined, as well as the role of forced molt in colonization of the hen. Pre- and post-harvest mitigation strategies are also discussed.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent decades salmonellosis has been on the rise as a food related illness worldwide. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimates 1 million cases of non-typhoidal salmonellosis occur each year in the US (Scallan et al., 2011). Worldwide it is estimated that incidence of nontyphoid *Salmonella* ranges from 200 million to 1.3 billion, with an estimated death toll of 3 million each year (Coburn, Grassi, & Finlay, 2007). In the US it is estimated that 27% of patients require hospitalization and 378 cases lead to death, a death rate of 0.5% (Scallan et al., 2011).

Serotype *Salmonella* Enteritidis is second only to Typhimurium as the most frequently isolated serotype of *Salmonella* from human illness in the US. In 2006, the most recent year for which data is available, *S. Enteritidis* caused almost 17% of reported cases of salmonellosis (CDC, 2010a). The European Union (EU) reported that *S. Enteritidis* was responsible for 60% of all verified outbreaks due to *Salmonella* (EFSA, 2009). *Salmonella* spp., and in particular *S. Enteritidis*, is strongly associated with eggs and egg products (Patrick et al., 2004). Grade A shell eggs or products containing eggs have been the most common vehicle for the transmission of *S. Enteritidis* (Braden, 2006). In 2010 there was an egg associated outbreak that led to nearly 2000 illnesses nationwide in the US (CDC, 2010b).

This review will have a brief description of eggs and egg products and a discussion of the physiology of egg formation. We will outline

the natural defenses of the egg, as well as the infection routes of *Salmonella*. Risk factors for flock infection with *S. Enteritidis* will be discussed, as well as post-harvest intervention methods.

2. Eggs and egg products

On average, Americans consumed 248 eggs per person in the year 2008 (Evans, 2009). Eggs are used as an inexpensive food source in the form of shell eggs, liquid, frozen, and dried products (Ricke, Birkhold, & Gast, 2001). The US egg industry is the second largest producer of chicken eggs in the world after China (NASS, 2009). According to the 2007 US Census of Agriculture, there were 146,000 US farms with layers in 2007, the majority of which are small-scale producers (USDA, 2009). However, larger producers provide the bulk of commercially produced table eggs. According to United Egg Producers, more than 95% of egg production comes from only 240 egg producing companies that have flocks of more than 75,000 layers per flock. There are six egg producing companies in the US which own from 1 to 5 million layers each, and 12 companies that have more than 5 million layers each.

Not only do eggs and egg products provide a reliable source of nutrition, they also serve a variety of functions in other products. The emulsifying properties of lecithin and cholesterol within the egg yolk make eggs valuable components of mayonnaise and other food systems requiring an emulsifier (Baker & Bruce, 1994). Albumen, or egg white, is noted for its ability to form heat stable foams used in cakes, meringues, and other baked products. Other products involving egg products include noodles, candy and ice creams (Ricke et al., 2001). Eggs used in products with other primary ingredients are referred to as hidden eggs.

Egg products are popular in foodservice operations due to convenience of use, cost savings (for labor and storage) and for

* Corresponding author at: Department of Food Science, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas 72704, United States. Tel.: +1 479 575 4678; fax: +1 479 575 6936.

E-mail address: sricke@uark.edu (S.C. Ricke).

portion control (Messens, Grijspeerdt, Herman, & Billet, 2002). Egg products include whole eggs, egg whites, and egg yolks in frozen, refrigerated liquid, and dried forms, as well as specialty egg products. Specialty egg products include pre-peeled hard-cooked eggs, omelets, egg patties, quiches, quiche mixes, scrambled eggs, fried eggs, and others. Due to wide spread use of eggs as a food source, the safety of this product is important. Eggs and egg contents can become contaminated by bacteria in a variety of ways, not only after being laid, but also during formation in the ovary as well. Eggs contaminated through transovarian infection may pose a significant hazard to both industry and consumers, and therefore necessitate an understanding of the reproductive tract of the laying hen.

3. The physiology of egg laying

The female reproductive system of the chicken is divided into two separate parts: the ovary and the oviduct. In most chickens, only the left ovary and oviduct are functional, the right typically regresses during development and is non-functional in the adult bird (Okubo, Akachi, & Hatta, 1997). There have been cases, however, where the left ovary and oviduct have been damaged and the right one has developed to replace it.

3.1. Follicular hierarchy

In a mature laying hen the ovary is composed of follicles of different size and maturity at any given time, with one follicle being ovulated every 24 to 40 h (Etches, 1990). Immature follicles which do not yet possess large volumes of yolk material contain granulosa cells, a distinct layer of cells releasing a variety of hormones in the more mature follicles (Etches, 1990). The follicular hierarchy of the mature laying hen is composed of 7 to 10 follicles of 10 to 35 mm, 15 to 20 follicles of 1 to 10 mm, and several thousand follicles of less than 1 mm (Williams & Sharp, 1978). The largest, most mature follicle of the hierarchy is referred to as the F1 follicle, and is released into the reproductive tract when maturation is complete. The F1 follicle has the appearance of a fully formed egg yolk, but is still encapsulated in a follicular sack with visible capillaries lining the surface of the follicle, for the purpose of transport and deposition of yolk material (Johnson, 2000). Follicles that are progressively smaller than the F1 follicle and further down the hierarchy of maturity are termed F2, F3, F4, and F5; along with the F1 follicle, these are referred to as the large yellow follicles. Also present are small yellow follicles in which yolk material has begun to deposit, and these move forward in size and volume to become F follicles as more yolk material is carried via the blood stream from the liver into the developing follicle (Johnson, 2000).

3.2. Follicle growth

Maturation and growth of the follicles is divided into three separate phases. First is a slow period of growth which can last over a range of time from a few months up to several years. This slow growth phase is followed by a more rapid period of a few months in which yolk protein is brought into the developing follicle. The last phase of follicle growth is characterized by rapid growth over a period of 6 to 11 days. During these last days before the follicle is released into the reproductive tract a vast amount of yolk material is imported into the follicle (Johnson, 2000). Yolk components are synthesized in the liver and transported via the vascular system to the ova. Precursors for yolk contents, vitellogenin (VTG) and very low density lipoprotein (VLDL) are moved through the granulosa cells by blood capillaries (Johnson, 2000). VTG and VLDL are deposited inside the oocyte and contribute to the observed increase in follicle weight and volume.

3.3. Hormone regulation of the reproductive system

Luteinizing hormone (LH) is a particularly important hormone in the regulation of ovulation in the laying hen. A surge in LH is observed approximately 6 h prior to ovulation of the mature F1 follicle (Wilson & Sharp, 1973). The purpose of LH is to induce ovulation of the largest F follicle in the hierarchy (Etches, 1990). LH also promotes the production of steroids important to the ovulatory cycle of the hen (Etches, 1990). Robinson et al. (1988) demonstrated that androstenedione and estradiol are produced in the small yellow follicles, androstenedione is secreted by the theca layer, and all are stimulated by LH. Luteinizing hormone also serves to stimulate the production of progesterone from granulosa cells within the follicle. Androgens are released from the theca layer of the follicle until approximately 12 to 36 h prior to ovulation, and are stimulated by LH prior to its major surge (Etches, 1990). Although all large F follicles produce steroids and hormones used throughout the ovulatory cycle, the F1 follicle is far more responsive to the action of LH, accounting for the fact that typically only the largest F follicle is released during a particular ovulation (Robinson & Etches, 1986).

Follicle stimulating hormone (FSH) also plays a major role in the ovulatory cycle, but the actions are less well defined than those of LH (Hammond, Burke, & Hertelendy, 1981). Like LH, FSH stimulates the production and release of progesterone from small yellow follicles. The smaller, preovulatory follicles are apparently the major target of FSH (Imai & Nalbandov, 1971). It is also known that FSH is bound most frequently to all follicles 12 to 16 h prior to ovulation (Etches, Croze, & Duke, 1981).

Progesterone is released from the large F1 follicle of the follicular hierarchy, apparently stimulated by relatively low levels of LH (Etches, MacGregor, Morris, & Williams, 1983). Progesterone release in turn stimulates secretion of gonadotropin releasing hormone (GnRH) from the hypothalamus gland. GnRH is known to induce the large surge of LH which precedes ovulation by 4 to 6 h (Wilson & Sharp, 1973). The subsequent surge in LH accelerates the production of progesterone. Both LH and progesterone have the ability to degrade the follicular sack surrounding the F1 follicle and allow it to drop into the infundibulum, the opening to the reproductive tract (Etches, 1990).

3.4. Descent of the egg in the reproductive tract

The ovulated follicle remains in the infundibulum for 15 to 30 min, and this is where the outer layer of the vitelline membrane and the chalazal layer of the albumin are most likely generated (Burley & Vadehra, 1989). The follicle subsequently descends into the albumen-secreting portion of the oviduct, where it remains for about 3 h (Okubo et al., 1997). The albumen-wrapped egg yolk then moves to the isthmus, where the shell membranes are deposited, a process that takes slightly more than an hour (Okubo et al., 1997). The uterus is a very short portion of the oviduct, but the egg is held there for approximately 21 h to complete the process of calcification (Okubo et al., 1997). The egg passes through the last portion of the oviduct, the vagina, towards an external opening known as a vent. The vent is a common opening for both egg laying and waste elimination, but a chicken cannot perform both functions at the same time. An internal flap known as a cloaca keeps the vaginal canal and the intestinal track separate until either an egg or excrement reach the vent; when a chicken is laying an egg, the cloaca descends and blocks the intestinal track (Koch, 1973).

4. Egg defenses against bacterial contamination

Eggs function primarily as a means of reproduction to avian species, and as such the egg must be able to protect a developing embryo for the period of 21 days during which a chick will mature

until hatching (Haines, 1939). Therefore, eggs as a biological system necessitate certain defenses, both chemical and physical, to limit the interference of microbial contaminants on the development of the chick.

4.1. Physical defenses

4.1.1. Cuticle

The cuticle, a protein layer secreted over the shell immediately before oviposition, is the first of the physical defenses that the egg possesses to exclude bacteria, yeasts, and molds from the nutrient rich yolk by clogging the pores of the calcium based shell (Mayes & Takeballi, 1983; Simkiss, 1968). However, the cuticle has only approximately 96 h of effectiveness before it is largely removed by abrasion (Fromm, 1963; Mayes & Takeballi, 1983). Humidity, temperature of the egg, ambient air temperature surrounding the egg directly after oviposition, and washing of the egg can all influence the amount of time the cuticle remains in place to prevent the penetration of bacteria such as *Salmonella* to the interior of the egg (Ball, Logan, & Hill, 1975).

4.1.2. Shell

The egg shell represents one of the more visible physical barriers to external contamination. Shells of chicken eggs have between 7000 and 17,000 pores most of which span from the outside to the inside of the shell (Mayes & Takeballi, 1983). Pores are wider at the top and taper down toward the bottom end along a spiraling path. More pores can be found at the larger end of the egg than in the small end (Walden, Allen, & Trussell, 1956). This is the reason that air cells of eggs are generally found at the broad end of the shell. Some malformed pores are much larger in diameter and can allow easier access to the interior of the eggs for bacteria (North, 1978). Thickness of the shell can also play a role in the admittance of bacteria to the interior of the egg (Taylor & Martin, 1929). As shell thickness increases so does the length of the pore. Pores are not straight and instead wind through the thickness of the shell matter. Longer pores are likely to be more spiraled and therefore provide a more difficult route for bacteria to navigate due to their limited motility (Mayes & Takeballi, 1983).

Moisture on the surface of the egg can aid the process of bacterial penetration as bacterial cells are better able to access the interior of the egg if they are introduced onto the shell surface before the cuticle has sufficiently dried (Humphrey, 1999). Rapid cooling of the egg causes the yolk and albumen to contract while the shell remains fixed, which produces a negative pressure thus pulling bacterial cells from the exterior of the egg through the winding pores of the shell (Lock & Board, 1992). Current USDA regulations mandate that egg wash water must be at least 32.2 °C, or 11.1 °C warmer than the warmest egg entering the processing line (USDA/AMS, 2004).

4.1.3. Shell membranes

Directly under the shell lie the last physical line of defense, two shell membranes, the outer and inner membranes. The two shell membranes are attached at all points except where the respiration of gasses in and out of the cell forms an air cell, usually at the blunt end of the egg shell (Mayes & Takeballi, 1983). The outer membrane is attached directly to the shell of the egg and is composed of three fibrous layers which provide a complex structure that is very difficult for bacteria and other microorganisms to penetrate (Moran & Hale, 1936). The inner shell membrane is closest to the center of the interior of the egg, and is thought to be made up of two layers (Mayes & Takeballi, 1983). It is hypothesized that the shell membranes act somewhat as a filter to potential contaminants through the intricate system of pores and fibers they present. The shell membranes acting jointly are thought to be a better defense against bacterial invasion than the shell (Garibaidi, 1960).

4.2. Chemical defenses

If microorganisms successfully penetrate the physical barriers presented by the cuticle, shell, and shell membranes, they will face a number of chemical barriers in the harsh environment of the albumen (O'Leary & Busta, 1974). One such chemical defense is the enzyme lysozyme (Cuguennec, Nau, Molle, Le Graet, & Brule, 2000). Lysozyme is present in biological fluids including milk, urine and blood, and lyses Gram positive bacteria by cleaving the (1,4) linkage between N-acetylneuramine and N-acetylglucosamine in the cell wall (Cuguennec et al., 2000). Although most pathogens associated with foodborne disease outbreaks are Gram negative and not susceptible to lysozyme, up to 60% of the spoilage organisms isolated from eggs are Gram positive (Lucore, Jones, Anderson, & Curtis, 1997). A more important player in the chemical defense of the egg is the protein ovotransferrin, which functions by chelating the iron of the egg albumen thus making it unavailable to bacteria for growth (Lock & Board, 1992). Ovomucoid is a proteinase inhibitor which denies bacteria the ability to utilize the proteins of the albumen (Baron, Gautier, & Brule, 1997). Egg whites also contain the compound avidin which binds biotin, a B vitamin necessary for cell growth (Baron et al., 1997). Avidin is produced in the oviduct, and is a minor component of egg white (Mine, 2000).

4.3. The vitelline membrane

After penetrating both the physical barriers of the shell and the chemical barriers of the albumen, bacteria are faced with only one more defense before migrating into the yolk. The vitelline membrane surrounds the yolk and is responsible for compartmentalization of the egg (Burley & Vadehra, 1989). Should this membrane fail, yolk and albumen contents can mix, which causes an influx of iron and other compounds into the albumen and the defenses of the egg are weakened if not destroyed (Burley & Vadehra, 1989). Not only is the vitelline membrane responsible for the segregation of yolk and albumen but also plays a role in allowing the penetration of materials involved in fertilization, yet it must exclude the transfer of nutrient molecules and bacterial cells (Debruyne & Stockx, 1978; Mann, 2008).

4.4. Routes of egg contamination by *Salmonella*

There are two possible routes of *Salmonella* contamination of the contents of intact eggs. In horizontal transmission, *Salmonella* penetrates through the eggshell, or in the transovarian route (vertical transmission), the egg is directly contaminated as a result of *Salmonella* infection of the reproductive organs before the eggs are covered by the shell components (Miyamoto et al., 1998). Which route is most important for *Salmonella* contamination, in particular *S. Enteritidis*, of egg contents is not clear.

4.5. Horizontal transmission

After oviposition the egg is potentially exposed to a variety of contaminated areas, and the high level of moist organic matter, including feces, can aid the survival and growth of *Salmonella* by providing protection and a source of nutrients. Eggs artificially contaminated with feces containing *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* or *S. Typhimurum* were stored at 25 °C, and there was an increase of number of all serotypes by 4 to 5 logs after 3 days (Schoeni, Glass, McDermott, & Wong, 1995). However, *Salmonella* can also survive and grow in the absence of fecal contamination, especially if temperatures and relative humidity are kept low (Messens, Grijspeerdt, & Herman, 2006). In spite of the physical and chemical barriers the egg possesses, penetration of *Salmonella* into the egg has been demonstrated (Messens, Grijspeerdt, & Herman, 2005).

Studies of correlation of environmental contamination with contamination of the shell have produced mixed results. In a laying house where *Salmonella* was isolated from 72% of environmental samples, only 7.8% of

shells were found to be contaminated (Jones, Rives, & Carey, 1995). Davies and Breslin (2004) found that 1.0% of shells of eggs of non-vaccinated flocks were contaminated with *S. Enteritidis*, and only 0.18% of shells of eggs from vaccinated hens were contaminated as compared to 25.6% of environmental samples. Time of sampling of the eggs also is a factor in detecting *Salmonella* on shells. Eggshells from hens experimentally orally inoculated with *S. Enteritidis* had over 50% of shells contaminated when examined during the first week post inoculation, with frequencies declining after that to as low as 8% after 8 weeks post inoculation (Bichler, Nagaraja, & Halvorson, 1996; Gast & Beard, 1990).

Researchers have suggested that the eggshell is most easily penetrated by bacteria within the first few minutes after oviposition (Miyamoto et al., 1998; Padron, 1990). In addition, the egg becomes exposed to temperatures cooler than the chicken body temperature (42 °C), perhaps creating a negative pressure that would allow bacteria to more easily penetrate the eggshell and the membranes (Board, 1966). It has been hypothesized that when the warm egg encounters a moist, cool environment, conditions are ideal for penetration of the shell by bacteria (Berrang, Cox, Frank, & Buhr, 1999).

Some researchers have hypothesized that the cuticle is the first line of defense against bacterial penetration of the egg, and as the cuticle dries out and shrinks as eggs age the pores are exposed to bacterial penetration (Mayes & Takeballi, 1983). Some studies have indicated that cuticle deposition is critical, and in the absence of deposition, penetration by bacteria is very likely (De Reu et al., 2006; Messens et al., 2007). However, other research groups have found no correlation between the deposition of the cuticle and penetration of *Salmonella* through the shell (Messens et al., 2005; Nascimento, Cranstoun, & Solomon, 1992).

Quality of the eggshell as defined by shell specific gravity, shell weight or shell thickness has also been hypothesized to have a role in bacterial penetration into the egg. Selecting strains of birds for higher egg production and greater egg weight has tended to result in poorer quality shells (Roberts & Brackpool, 1994) which are more prone to become contaminated, as demonstrated by Jones, Anderson, Curtis, and Jones (2002). The age of the hen is another factor affecting shell quality, and contamination of shells, air cells and contents has been found to be greater in older hens (Jones et al., 2002). Stressors such as movement from floor to cage or vaccination have also been observed to affect shell quality (Roberts & Brackpool, 1994).

Different genera and species of bacteria also seem to possess differing abilities to penetrate the shell of the egg. De Reu et al. (2006) compared the ability of 7 selected species of bacteria isolated from the contents of eggs to penetrate the eggshell. They found that the Gram-negative motile and non-clustering bacteria *Pseudomonas* sp., *S. Enteritidis* and *Alcaligenes* sp. had the greatest potential to penetrate the shell. *S. Enteritidis* followed by *Carnobacterium* sp. and *Serratia marcescens* penetrated into intact eggs and grew most frequently of the 7 species that were compared.

Even though the albumen has several antibacterial chemicals, once bacteria enter the egg there is evidence that they can survive for long periods of time. Howard et al. (2006) demonstrated that *S. Typhimurium* could survive within the egg and even exhibit net growth during 8 weeks of storage, even under refrigeration conditions. In further studies, Howard et al. (2007) inoculated egg components with *S. Enteritidis* and observed the survival and growth of the bacterium as related to refrigerated storage time for 8 weeks. Although they found no evidence of vitelline membrane deterioration leading to yolk contamination during the storage period they did observe survival of *S. Enteritidis* on the vitelline membrane and in the albumen, and in some instances they did note net growth of the pathogen (Howard et al., 2007). This research supports the need for rapid refrigeration and maintenance of the cold chain during storage.

4.6. Vertical transmission

Although most bacteria commonly implicated in foodborne disease outbreaks have the ability to migrate into the egg from

external sources, it would seem that some have an alternative route (Mayes & Takeballi, 1983). In the case of several *Salmonella* serotypes, in particular *S. Enteritidis*, transovarian infection of the laying hen may occur, and eggs laid after infection may contain *Salmonella* (Humphrey, 1999). Evidence suggests that transovarian infection of the hen ovary with *S. Enteritidis* may be similar to the same route of infection found with poultry host specific *Salmonella* disease causing isolates that are monitored in the NPIP program (Benson & Keller, 1999).

4.6.1. Colonization of the ovary

Some researchers believe that contamination of the egg in the reproductive tract of the hen is more likely to occur than penetration of the eggshell, especially since *S. Enteritidis* can be localized in the reproductive tissue when the hen does not experience intestinal colonization by *S. Enteritidis* (Lister, 1988). Additionally, *S. Enteritidis* seems to be able to avoid the immune response of the hen, perhaps by being able to survive within the cells of the reproductive tract (Gast & Holt, 2000).

Numerous experimental studies indicate that the ovary is more often colonized by *S. Enteritidis* than is the oviduct (Gast, Guraya, Guard-Bouldin, Holt, & Moore, 2007). In this case, *S. Enteritidis* must be able to interact with the cells of the follicles before ovulation. Attachment of *S. Enteritidis* to follicular granulosa cells has been observed (Thiagarajan, Saeed, & Asem, 1994), and the organism may be able to invade and multiply in these cells (Thiagarajan, Saeed, Turek, & Asem, 1996). Howard et al. (2005) found that the immature small white follicles were more susceptible to invasion than were the small and large yellow follicles, perhaps leading to continuous infection of eggs throughout the reproductive cycle. Dawoud et al. (2011) used a similar *in vitro* invasion assay to evaluate follicle invasion by different strains of *S. Enteritidis*. They determined that all five strains of *S. Enteritidis* tested were able to invade the follicles after 2 h with a mean percentage of invasion from 0.016 to 0.034% as compared to 0.0003% for *Escherichia coli* K12, the negative control. However, it is not hypothesized that ovarian colonization is the main source of egg contamination since it is believed that degeneration of follicles would result and there is no evidence of reduction of laying in infected hens (Gantois et al., 2009). Other researchers have determined that *S. Enteritidis* is more often associated with the vitelline membrane than the yolk itself (Gast & Beard, 1990; Gast & Holt, 2000). *S. Enteritidis* also apparently possesses some characteristics that other serotypes do not possess; Okamura et al. (2001a,b) found that *S. Enteritidis* colonized ovaries and follicles at a much higher rate than did other serotypes. Similar results were found by Gantois et al. (2008), with the exception that *S. Typhimurium* was equally able to colonize the ovary.

Other research has indicated that the albumen is the most common area for contamination, indicating colonization of the tissues of the oviduct (Keller, Benson, Krotec, & Eckroade, 1995). Contamination of the vagina, isthmus or magnum could lead to *Salmonella* incorporation into the shell, shell membranes or the albumen.

4.6.2. Colonization of the vagina

In hens inoculated intravaginally with *Salmonella*, there was a high rate of contamination on the eggshell (Miyamoto et al., 1997), leading to penetration into the egg due to the cooling of the egg after laying (Miyamoto et al., 1998). It also appears that *S. Enteritidis* has a greater ability to attach to the epithelium of the vagina compared to other serotypes (Miyamoto et al., 1998). Apparently invasiveness of serotypes is linked to lipopolysaccharide type, with type O9 (*S. Enteritidis*) being more invasive than O4 (*S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, and *S. Agona*) and other lipopolysaccharide types (Mizumoto, Sasai, Tani, & Baba, 2005).

4.6.3. Colonization of the isthmus and magnum

S. Enteritidis was shown to be able to invade and multiply within tissue cultures of both isthmus and magnum cells (De Buck, Pasmans, Van Immerseel, Haesebrouck, & Ducatelle, 2004). An *in vivo* loop

model experiment demonstrated that *S. Enteritidis* was more invasive in the isthmus loop than in the magnum loop (De Buck et al., 2004). When laying hens were infected intravenously with *S. Enteritidis*, more bacteria were subsequently isolated from tubular gland cells of the isthmus as compared to the magnum (De Buck et al., 2004). These results are in agreement with the hypothesis that *S. Enteritidis* enters and contaminates eggs through the albumen (Schoeni et al., 1995).

Despite increased research emphasis on this route of contamination, infection of shell eggs with *S. Enteritidis* seems to be somewhat rare. In commercial flocks less than 0.03% of eggs laid are contaminated with *S. Enteritidis* (Gast & Holt, 2001). A risk assessment for *S. Enteritidis* in eggs estimated that in the United States only 1 in 20,000 (0.005%) eggs are contaminated with *S. Enteritidis* (Ebel & Schlosser, 2000). With over 90 billion eggs produced each year in the United States there is a potential for 4.5 million contaminated eggs entering the market each year (USDA/NASS, 2010). Egg production in the EU was 104 billion eggs in 2008. A risk assessment for *S. Enteritidis* conducted in the EU concluded that it is difficult to estimate the number of contaminated eggs per million from currently available data. In one country the number of eggs per million was estimated to range between 14 and 150, but in a second country the number was estimated to be between 2 and 28 (EFSA, 2010).

4.7. Risk factors for *S. Enteritidis* infection of laying hens

4.7.1. Biosecurity

Control of the movements of people and equipment on the farm, as well as limiting hen exposure to rodents, insects, or wild birds and mammals which may carry *Salmonella* reduces the potential for introducing the organism into the flock or transmitting it among existing flocks or from an old flock to a new flock (Crippen, Sheffield, Esquivel, Droleskey, & Esquivel, 2009; Henzler & Opitz, 1992; Olsen & Hammack, 2000). Henzler and Opitz (1992) surveyed 10 mice-infested poultry farms, 5 of which were rated as clean of *S. Enteritidis* and 5 as contaminated as determined by culture results of environmental samples. On the contaminated farms, *S. Enteritidis* was isolated from 24.0% of the mice, but was not detected in mice on clean farms. As much as 10^5 *S. Enteritidis* per mouse fecal pellet was detected and the infection persisted as long as 10 months in the infected mouse population. The lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer), is a serious pest in the laying industry and has been shown to internalize *Salmonella* acquired from external sources and to harbor bacteria in the alimentary canal, and may thus be an active source for spreading *Salmonella* (Crippen et al., 2009). Houseflies collected at caged-layer facilities that had produced eggs implicated as the vehicle in two outbreaks of *S. Enteritidis* were analyzed and tested positive for the pathogen (Olsen & Hammack, 2000).

Differences in housing systems may also affect biosecurity measures. With free range housing the hens are allowed to spend a portion of the time outdoors, increasing interactions with wildlife, and contaminating soil that may serve as a persistent source of *Salmonella* (Holt et al., 2011). However, many conventional cage systems are more than 20 years old and are difficult to clean and disinfect because of the nature of the system with the deep manure pits, stacked cages and belts, which may lead to *Salmonella* being carried from the old flock to the new (Carrique-Mas et al., 2009). A study conducted in Europe, where conventional cage systems will be banned as of 2012, found that risk factors for shedding of *S. Enteritidis* included conventional battery cages, no cleaning in between production rounds and the advent of winter (Van Hoorebeke et al., 2010).

4.8. Feed withdrawal to induce molt

It is natural for adult birds to undergo an annual molt in order to renew their feathers, and at the same time body weight is lost and egg laying stops (Mrosovsky & Sherry, 1980). In some commercial layer

operations in the US, hens are induced to molt before the end of a first laying cycle, which renews the reproductive tract (Brake, 1993), and allows them to enter into a second egg-laying cycle (North & Bell, 1990). The historically common method to force molt was withdrawal of feed for several days, modeled after the natural behavior of birds refusing to eat during the molting period (Bell, 2003; Mrosovsky & Sherry, 1980; Ricke, Dunkley, McReynolds, Dunkley, & Nisbet, 2010). However, feed withdrawal for the purpose of inducing molt is stressful and often leads to increased mortality during the first 2 weeks of the molt (Bell, 2003). Inducing molt by feed withdrawal also leads to an increase in *S. Enteritidis* fecal shedding (Holt, 1993; Holt & Porter, 1992; Holt, Macri, & Porter, 1995), prevalence of *S. Enteritidis* in organs (Holt, 1995), recurrence of a previous infection (Holt & Porter, 1992), and increased susceptibility to infection with *S. Enteritidis* (Holt, 1993) compared with nonmolting controls. When birds are fasting the infectious dose for *S. Enteritidis* decreases (Holt, 1995). Additionally, researchers have noted an increase in *Salmonella* contamination of the environment of molted hens as compared to nonmolted (Murase et al., 2001). Durant, Corrier, Byrd, Stanker, and Ricke (1999) noted that a 9-day feed withdrawal increased colonization of *S. Enteritidis* in both crop and ceca of birds as compared to non-molted birds.

4.8.1. Alternatives to feed withdrawal for molting

Alternative methods to induce molting that do not use fasting have been investigated, most of which involve manipulating the diet of the hens in some manner. According to Ricke (2003) in order for a non-feed withdrawal molting diet to be successful it must be palatable to the hens so they do not refuse to eat, stimulate molt to the point where the reproductive tract regresses, assure that egg production and egg quality of the second cycle are the equivalent of those achieved by feed withdrawal, and ingredients should be readily available and economical.

Methods of inducing molt have included reducing the levels of essential nutrients in the diet, or feeding something that reduces egg production (Bell, 2003; Park, Birkhold, Kubena, Nisbet, & Ricke, 2004). Some successful diets have involved reducing salt or sodium (Naber, Latshaw, & Marsh, 1984), or calcium (Martin, Morris, Gehle, & Harwood, 1973), but these diets have given inconsistent results when tested by other researchers (Berry, 2003). Feeding high concentrations of zinc led to higher egg production and greater egg weights as compared to conventional feed withdrawal (Park et al., 2004). Moore et al. (2004) also found that the use of zinc had the potential to lessen colonization by *S. Enteritidis* during molt. Aluminum or potassium iodide have also proven to halt egg production (Arrington, Santa Cruz, Harms, & Wilson, 1967; Hussein, Cantor, & Johnson, 1989; McCormick & Cunningham, 1987), but these diets yield inconsistent results, cost more, and may induce birds to peck one another (Webster, 2003; Biggs, Persia, Koelkebeck, & Parsons, 2004). Natural products have also been tested. A diet consisting of primarily grape seed pomace with 10 ppm of thyroxine added was as effective as the conventional feed withdrawal method (Keshavarz & Quimby, 2002). Low nutrient grain or high fiber feeds have also been tested successfully. Using 12% jojoba meal in the diet resulted in a successful molt and higher egg production than pre molt (Vermaut et al., 1998). Researchers determined that feeding a diet with 50% ground cottonseed produced a voluntary reduction of feed intake and was as effective as complete feed withdrawal (Davis, Lordelo, & Dale, 2002). Using high levels of wheat middlings have been found to be an effective diet (Seo, Holt, & Gast, 2001), but are not suitable on a large commercial scale because the feed with high wheat middlings hardens in the feed tank and does not flow to the feeders (Shimmura, Eguchi, Uetake, & Tanaka, 2008).

Although these diets successfully induced molt and allowed egg production to return to a high level the researchers did not specifically address colonization by *S. Enteritidis*, plus many of the amendments

tested are waste or processing byproducts and are not necessarily readily available (Dunkley et al., 2009; Park et al., 2004). Alfalfa is a readily available forage material with low metabolizable energy. Landers et al. (2005) determined that alfalfa meal or alfalfa pelleted diets were as effective as feed withdrawal in inducing molt, and egg production and quality post molt were equivalent to that of hens molted by feed withdrawal. A significant reduction in crop colonization was seen with an alfalfa diet as compared to feed deprived birds when challenged orally with *S. Enteritidis* (Woodward et al., 2005). McReynolds et al. (2006) determined that 100% alfalfa diets as well as diets of 70% alfalfa with 30% standard layer ration reduced colonization of the ceca with *S. Enteritidis*. Dunkley et al. (2007c) orally challenged hens on different molting diets and determined that there was a reduction of colonization by *S. Enteritidis* when hens were fed 100% alfalfa crumbles as compared to feed withdrawal. There was also an increase in the expression of the *hilA* gene, a virulence gene of *Salmonella* in the feed withdrawal group as compared to alfalfa crumbles (Dunkley et al., 2007c). Total short chain fatty acids were lower in fecal and cecal contents for hens undergoing feed withdrawal than in groups fed layer ration or 100% alfalfa crumbles, indicating fermentation patterns for alfalfa fed birds as being more similar to fully fed birds than the feed withdrawal group (Dunkley et al., 2007d). Hens fed an alfalfa crumble diet may also experience less stress and less inflammation than birds undergoing feed withdrawal (Dunkley et al., 2007a,b; Landers et al., 2008a,b). The hens on alfalfa crumble exhibited less nonnutritive pecking behavior, head movements, and greater feeding activity than hens on total feed withdrawal (Dunkley et al., 2008a,b). McReynolds et al. (2009) also demonstrated that the use of alfalfa in the molting diet produced an immune response closer to that of fully fed birds than did birds deprived of feed.

4.8.2. Prebiotics

Prebiotics are indigestible food ingredients that stimulate the growth of beneficial bacteria, thus improving the health of the host (Gibson & Roberfroid, 1995). Oligosaccharides fed to poultry have shown the potential to inhibit colonization by *S. Enteritidis* (Bailey, Blankenship, & Cox, 1991; Fernandez, Hinton, & Van Gils, 2002). Colonization by *Salmonella* is limited because the natural flora of the intestine uses the prebiotic in fermentation, increasing levels of volatile fatty acids which leads to a decrease in the pH to levels at which *Salmonella* cannot attach or grow (Cumplings & Macfarlane, 2002; Flickinger, Van Loo, & Fahey, 2003). Adding fructooligosaccharide (FOS) to the alfalfa diet decreased colonization of ovary and liver by *S. Enteritidis*, and in some trials there was significant decrease in *S. Enteritidis* cecal counts (Donalson et al., 2008).

4.9. Vaccination

Another important *Salmonella* prevention tool is vaccination. Two types of *Salmonella* vaccines currently exist, live vaccines and killed vaccines. Live vaccines can be given to an entire flock by water or aerosol, but since they contain a living organism there are issues with storage and viability, and there is also a possibility that an attenuated strain can revert back to a more virulent organism. Additionally, live *S. Enteritidis* vaccines are not permitted in the US. *S. Typhimurium* vaccines are used and growers rely on cross protection between serotypes (Hassan & Curtiss, 1997). Killed vaccines are administered by injection to individual birds, and provide strong immunity and good protection, but are very labor intensive (Gast, Stone, Holt, & Beard, 1992). The United Kingdom mandated vaccination of layer flocks belonging to the British Egg Industry Council in the 1990s, which is considered the main reason for a striking decrease in human salmonellosis in the UK (Cogan & Humphrey, 2003). In 2006 the EU mandated that laying hen flocks with a prevalence of *Salmonella* of 10% or more must be vaccinated (Anonymous, 2006).

4.10. Caged versus non caged systems

In anticipation of the ban of conventional cage systems that will take place in the EU effective in 2012 (Council of the European Union, 1999) several studies have undertaken to discover any connection between conventional cage systems and infection of hens by *S. Enteritidis*. A German study discovered that independent of housing system, 32% of layer flocks had been positive at least once for *Salmonella*. Further analysis revealed that conventional cage systems had more than 46% of flocks positive as compared to 33% on free range organic farms 22% in free range barn systems, and 23% in barn systems that did not have access to the outdoors (Methner, Diller, Reiche, & Boehland, 2006). A study conducted in Belgium determined that the main risk factors for *S. Enteritidis* infection were rearing flocks in cages compared to barns or free-range systems. The results also indicated higher risk for *Salmonella* increase in age and in size of flock (Namata et al., 2008).

4.11. Post harvest intervention methods

In the US no mandatory regulations detail specific requirements for washing and sanitizing shell eggs prior to sale as table eggs, but the Agricultural Marketing Service has a voluntary shell egg grading program that includes specific egg washing and sanitizing requirements. In general, eggs are placed on a conveyor belt that carries them through a wash cycle using recirculated water and brushes. Alkaline detergents are added to wash water to clean the egg surfaces and maintain a high pH for bacterial control, however organic matter accumulates in the recirculated water and lessens the ability of the detergent to kill bacteria (Kinner & Moats, 1981). Immediately following the detergent wash, operations participating in the grading program may sanitize shell eggs with a potable water rinse with a chlorine concentration of 100 to 200 ppm, or quaternary sanitizers compatible with the washing compound. Government agencies and the egg industry are interested in alternative decontamination techniques that could be more effective and cost less, thus benefiting both the public and the industry. Numerous sanitizers and methods have been investigated as post wash sanitation methods.

4.12. Sanitizers

Kuo et al. (1997b) tested the use of a peroxidase-catalyzed compound (PCC) for sanitizing shell eggs. They determined that dipping in the PCC compound reduced *S. Enteritidis* almost 4 logs as compared to less than 1 log for water only, but PCC reduction was not significantly greater than 200 ppm chlorine. Knape, Carey, and Ricke (2001) found that distilled deionized water, an iodine based detergent, and chlorine (200 ppm) all decreased *Salmonella* populations inoculated on eggs as compared to dry egg controls, but the efficacy of egg sanitizers appeared to be dependent on the level of total dissolved solids in the egg wash water.

4.13. UV radiation

Radiation using UV wavelengths has been investigated as a means of sanitizing shell eggs because it leaves the cuticle of the egg intact. Early research demonstrated that UV radiation was capable of killing microorganisms on a variety of surfaces such as contact lenses (Gritz, Lee, McDonnell, Shih, & Baron, 1990), poultry carcasses (Wallner-Pendleton, Sumner, Froning, & Stetson, 1994), fiber or plastic belts, metal or eggshells (Gao, Stewart, Joseph, & Carr, 1997). Kuo, Carey, and Ricke (1997a) determined that UV radiation significantly reduced aerobic bacteria, molds and *S. Typhimurium* inoculated on shell eggs.

A new technology known as pulsed UV light is being tested for the ability to inactivate pathogens on food surfaces, initially approved by the FDA (Federal Register, 1999). The effectiveness of pulsed UV light

for 1 to 30 s was evaluated for the decontamination of eggs inoculated with *S. Enteritidis*; the eggs were placed at a distance of 9.5 and 14.5 cm from the UV lamp. A 20-s treatment at 9.5 cm produced a log reduction of 5.3 CFU/cm² without any visual damage to the egg (Keklik, Demirci, Patterson, & Puri, 2010). Longer exposure times resulted in an increase of the egg temperature.

4.14. Electrolyzed water

Electrolyzed oxidizing (EO) water is generated by combining electrolysis and membrane separation to produce an acidic and an alkaline component from a weak salt water solution.

Studies have demonstrated the effectiveness of EO water for the inactivation of pathogens in suspension solutions (Kim, Hung, & Brackett, 2000), and in foods (Bari, Sabina, Isobe, Uemura, & Isshiki, 2003; Russell, 2003). Bialka, Demirci, Knabel, Patterson, and Puri (2004) compared EO water treatment with a commercial detergent-sanitizer treatment, both *in vitro* and using a pilot-scale egg washer. Eggs treated with EO showed a log reduction of *S. Enteritidis* of 2.3 CFU/g as compared to 2.0 CFU/g for commercial detergent-sanitizer treatments (Bialka et al., 2004). Neither treatment significantly affected albumen height or eggshell strength, but both had significant effects on the cuticle.

4.15. Whole egg pasteurization

A risk assessment of *S. Enteritidis* in shell eggs predicted that pasteurization of shell eggs resulting in a 3 log reduction of *S. Enteritidis* would reduce illness caused by this organism by 70% (USDA/FSIS, 2005). There have been several studies done to evaluate the effects of pasteurization and dry heat treatments on intact shell eggs and *S. Enteritidis*. In one study eggs were inoculated internally with a 5-strain *S. Enteritidis* cocktail, then treated for 25 min at 57 °C in a water bath followed by 57 min at 55 °C in a hot oven (Barbour, Jurdi, Issa, & Tannous, 2001). This treatment resulted in a 6-log reduction of *S. Enteritidis* with no effect on the overall functionality of the eggs (Barbour et al., 2001). James, Lechevalier, and Ketteringham (2002) demonstrated that shell eggs subjected to steam for 2 s at 100 °C yielded significant reductions in bacterial numbers on the shell without increasing the interior temperature of the egg contents, which could result in decreased egg protein functionality. Other methods such as hot water alone, hot air alone, or a combination of, have been used with some success (Jeng, Kaczmarek, Woodworth, & Balasky, 1987; Vanlith, Putrirulan, & Mulder, 1995).

4.16. Ionizing radiation

In 2000, the FDA approved ionizing radiation up to 3 kGy for the reduction of pathogens in fresh eggs (FDA, 2000). However, when Meszaros, Horti, and Farkas (2006) irradiated eggs with doses in the range of 0.5 to 3.0 kGy, changes in the flow behavior of the white, brittleness of yolk membrane, whippability and foam stability of white and sensory changes of raw and soft-boiled eggs were observed. A minimal dose of 1.5 kGy would be required for radiation inactivation of *Salmonella*, making the quality of shell eggs less than fresh shell eggs, but irradiated eggs could still be acceptable for at risk populations or industrial use.

5. Conclusions

The hen egg has both physical barriers and several microbicidal molecules in the egg contents. Under natural conditions, finding microorganisms inside the egg is rare, and usually infection causes so much damage it is obvious that the egg is infected. *S. Enteritidis* seems to be unique in its ability to migrate to the interior of the egg and multiply without inducing noticeable changes. *S. Enteritidis* can

penetrate the eggshell depending on temperature differential, moisture, number of organisms present, and storage conditions, as well as the strain of bacteria. Some researchers now believe that *S. Enteritidis* more commonly enters the egg via the reproductive tract by being incorporated on the vitelline membrane, in the egg white or on the shell membranes. By whatever means *S. Enteritidis* enters the egg, it appears to be there rarely and in very small numbers. These small numbers cannot be ignored however as even refrigerated storage does not prevent growth, and even minimal temperature abuse leads to rapid growth. Risk factors for flock contamination with *S. Enteritidis* include conventional cage rearing, the age and the size of the flock. Although post-harvest interventions exist and are successful, there is need for more research into flock management practices, proper egg storage and education of the public on proper cooking and serving.

Acknowledgments

Preparation of this review was partially supported by a USDA Food Safety Consortium Grant and USDA-NIFSI Grant #2008-51110-04339.

References

- Anonymous (2006). *Reducing Salmonella: Commission sets EU targets for laying hens and adopts new control rules*. Accessed February 10, 2011. Available at: <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/06/1082&format=HTML&aged=1&language=EN&guiLanguage=en>.
- Arrington, L. R., Santa Cruz, R. A., Harms, R. H., & Wilson, H. R. (1967). Effects of excess dietary iodine upon pullets and laying hens. *The Journal of Nutrition*, 92, 325–330.
- Bailey, J. S., Blankenship, L. C., & Cox, N. A. (1991). Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*, 70, 2433–2438.
- Baker, R. C., & Bruce, C. (1994). Effects of processing on the microbiology of eggs. In R. G. Board, & R. Fuller (Eds.), *Microbiology of the avian egg*. London: Chapman and Hall.
- Ball, R. F., Logan, V., & Hill, J. F. (1975). Factors affecting the cuticle of the egg as measured by the intensity of staining. *Poultry Science*, 54, 1479–1484.
- Barbour, E. K., Jurdi, L. E., Issa, C., & Tannous, R. (2001). Preliminary attempts towards production of table eggs free from *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Cleaner Production*, 9, 69–73.
- Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., & Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 66, 542–548.
- Baron, F., Gautier, M., & Brule, G. (1997). Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg white. *Journal of Food Protection*, 60, 1318–1323.
- Bell, D. D. (2003). Historical and current molting practices in the U.S. table egg industry. *Poultry Science*, 82, 965–970.
- Benson, C. E., & Keller, L. H. (1999). Characterization of chicken ovarian infection with *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis. In A. M. Saeed (Ed.), *Salmonella enterica serotype Enteritidis in humans and animals*. Ames: Iowa State University Press.
- Berrang, M. E., Cox, N. A., Frank, J. F., & Buhr, R. J. (1999). Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 8, 499–504.
- Berry, W. D. (2003). The physiology of induced molting. *Poultry Science*, 82, 971–980.
- Bialka, K. L., Demirci, A., Knabel, S. J., Patterson, P. H., & Puri, V. M. (2004). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poultry Science*, 83, 2071–2078.
- Bichler, L. A., Nagaraja, K. V., & Halvorson, D. A. (1996). *Salmonella enteritidis* in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected White Leghorn chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 57, 489–495.
- Biggs, P. E., Persia, M. E., Koelkebeck, K. W., & Parsons, C. M. (2004). Further evaluation of nonfeed removal methods for molting programs. *Poultry Science*, 83, 745–752.
- Board, R. G. (1966). Review: The course of microbial infection of the hen's egg. *The Journal of Applied Bacteriology*, 29, 319–341.
- Braden, C. R. (2006). *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 512–517.
- Brake, J. (1993). Recent advances in induced molting. *Poultry Science*, 72, 929–931.
- Burley, R. W., & Vadehra, D. V. (1989). The vitelline membrane. *The avian egg: Chemistry and biology* (pp. 147–169). New York: John Wiley and Sons.
- Carrique-Mas, J. J., Breslin, M., Snow, L., McLaren, I., Sayers, A. R., & Davies, R. H. (2009). Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137, 837–846.
- CDC (2010a). *PHLIS surveillance data*. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm> #1995 Accessed 17 January 2011
- CDC (2010b). *Investigation update: multistate outbreak of human Salmonella Enteritidis infections associated with shell eggs*. Available at: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/> Accessed 18 January 2011
- Coburn, B., Grassi, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85, 112–118.

- Cogan, T. A., & Humphrey, T. J. (2003). The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 114S–119S (Suppl.).
- Council of the European Union (1999). *Council directive 1999/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens*. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:203:0053:0057:EN:PDF>.
- Crippen, T. L., Sheffield, C. L., Esquivel, S. V., Droleskey, R. E., & Esquivel, J. F. (2009). The acquisition and internalization of *Salmonella* by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9, 65–72.
- Cuguennec, T., Nau, F., Molle, D., Le Graet, Y., & Brule, G. (2000). Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. *Food Chemistry*, 68, 29–35.
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *The British Journal of Nutrition*, 8(Suppl. 2), S145–S151.
- Davies, R., & Breslin, M. (2004). Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathology*, 33, 133–144.
- Davis, A. J., Lordelo, M. M., & Dale, N. (2002). Use of cottonseed meals in molting programs. *Journal of Applied Poultry Research*, 11, 175–178.
- Dawoud, T. M., Hererra, P., Hanning, I., Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. (2011). *In vitro* invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. *Poultry Science*, 90, 1134–1137.
- Debruyne, I., & Stockx, J. (1978). Nucleoside triphosphatase from the hen's egg white and vitelline membrane. *Enzyme*, 23, 361–372.
- De Buck, J., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. (2004). Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poultry Science*, 83, 352–358.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, A., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Herman, L. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 253–260.
- Donalson, L. M., McReynolds, J. L., Kim, W. K., Chalova, V. I., Woodward, C. L., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008). The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection, and intestinal shedding in laying hens. *Poultry Science*, 87, 1253–1262.
- Dunkley, C. S., Friend, T. H., McReynolds, J. L., Kim, W. K., Dunkley, K. D., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008a). Behavior of laying hens on alfalfa crumble molt diets. *Poultry Science*, 87, 815–822.
- Dunkley, C. S., Friend, T. H., McReynolds, J. L., Woodward, C. L., Kim, W. K., Dunkley, K. D., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008b). Behavioral responses of laying hens to different alfalfa-layer ration combinations fed during molting. *Poultry Science*, 87, 1005–1011.
- Dunkley, C. S., McReynolds, J. L., Dunkley, K. D., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2007a). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. III. Blood plasma metabolite response. *Poultry Science*, 86, 2492–2501.
- Dunkley, C. S., McReynolds, J. L., Dunkley, K. D., Njongmeta, L. N., Berghman, L. R., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2007b). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. IV. Immune and stress protein response. *Poultry Science*, 86, 2502–2508.
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2009). Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Aerobe*, 15(Sp. Iss. SI), 26–35.
- Dunkley, K. D., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Callaway, T. R., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2007c). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. I. *Salmonella* Enteritidis colonization and virulence gene *hlyA* response. *Poultry Science*, 86, 1633–1639.
- Dunkley, K. D., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Callaway, T. R., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2007d). Molting in *Salmonella* Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. II. Fermentation and microbial ecology response. *Poultry Science*, 86, 2101–2109.
- Durant, J. A., Corrier, D. E., Byrd, J. A., Stanker, L. H., & Ricke, S. C. (1999). Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enteritidis* colonization and invasion of leghorn hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1919–1923.
- Ebel, E., & Schlosser, W. (2000). Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 51–62.
- EFSA (2009). Community summary report, food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 2009(271), 1–128. doi:10.2903/j.efsa.2009.271r.
- EFSA (2010). Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *The EFSA Journal*, 8, 1546. doi:10.2903/j.efsa.2010.1546.
- Etches, R. J. (1990). The ovulatory cycle of the hen. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2, 293–318.
- Etches, R. J., Croze, F., & Duke, C. E. (1981). Plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, testosterone and estradiol in follicular and peripheral venous plasma during the ovulation cycle of the hen. *Advances in Physiological Science*, 33, 89–98.
- Etches, R. J., MacGregor, H. E., Morris, T. R., & Willams, J. B. (1983). Follicular growth and maturation in the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproductive Fertility*, 67, 351.
- Evans, T. (2009). Good news on global egg consumption. Available at: <http://www.thepoultrysite.com/articles/1575/good-news-on-global-egg-consumption> Accessed 18 January 2011
- FDA (2000). Irradiation in the production, processing and handling of food. *Federal Register*, 65(141), 45280.
- Register, Federal (1999). Pulsed light treatment of food. *Federal Register*, 66, 338829–338830.
- Fernandez, F., Hinton, M., & Van Gils, B. (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathology*, 31, 49–58.
- Flickinger, E. A., Van Loo, J., & Fahey, G. C. (2003). Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 19–60.
- Fromm, D. (1963). Permeability of the hen's egg shell. *Poultry Science*, 42, 1271.
- Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2008). A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology*, 37, 399–406.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 718–738.
- Garibaldi, J. A. (1960). Factors in egg white which control growth of bacteria. *Food Research*, 25, 337–344.
- Gao, F., Stewart, L. E., Joseph, S. W., & Carr, L. E. (1997). Effectiveness of ultraviolet light irradiation in reducing the numbers of *Salmonella* on eggs and egg belt conveyor materials. *Applied Engineering for Agriculture*, 13, 355–359.
- Gast, R. K., & Beard, C. W. (1990). Production of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Diseases*, 34, 438–446.
- Gast, R. K., Guraya, R., Guard-Bouldin, J., Holt, P. S., & Moore, R. W. (2007). Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases*, 51, 40–44.
- Gast, R. K., & Holt, P. S. (2000). Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science*, 79, 559–563.
- Gast, R. K., & Holt, P. S. (2001). Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poultry Science*, 80, 997–1002.
- Gast, R. K., Stone, H. D., Holt, P. S., & Beard, C. W. (1992). Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases*, 36, 992–999.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota — Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- Gritz, D. C., Lee, T. Y., McDonnell, P. J., Shih, K., & Baron, N. (1990). Ultraviolet radiation for the sterilization of contact lenses. *Contact Lens Association of Ophthalmologists Journal*, 16, 294–298.
- Haines, R. B. (1939). *Microbiology in the preservation of hen's eggs*. Food investigation special reports. London: Bd. 47. H.M.S.O.
- Hammond, R. W., Burke, W. H., & Hertelendy, F. (1981). Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotrophins. *Biology of Reproduction*, 24, 1048–1055.
- Hassan, J. O., & Curtiss, R., III (1997). Efficacy of a live avirulent *Salmonella* Typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases*, 41, 783–791.
- Henzler, D. J., & Opitz, H. M. (1992). The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Diseases*, 36, 625–631.
- Holt, P. S. (1993). Effect of induced molting on the susceptibility of White Leghorn hens to a *Salmonella* Enteritidis infection. *Avian Diseases*, 37, 412–417.
- Holt, P. S. (1995). Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted and unmolted laying chickens. *Avian Diseases*, 39, 239–249.
- Holt, P. S., Davies, R. H., Dewulf, J., Gast, R. K., Huwe, J. K., Jones, D. R., Waltman, D., & Willian, K. R. (2011). The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poultry Science*, 90, 251–262.
- Holt, P. S., Macri, N. P., & Porter, R. E., Jr. (1995). Microbiological analysis of the early *Salmonella* Enteritidis infection in molted and unmolted hens. *Avian Diseases*, 39, 55–63.
- Holt, P. S., & Porter, R. E., Jr. (1992). Microbiological and histopathological effects of an induced-molt fasting procedure on a *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Diseases*, 36, 610–618.
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Kim, W. K., Birkhold, S. G., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2006). *In vitro* survival and growth of *Salmonella* Typhimurium inoculated on yolk membrane after long term refrigerated storage of shell eggs. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1, 30–34.
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Kim, W. K., Birkhold, S. G., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2007). Inoculation of a poultry isolate *Salmonella* Enteritidis on egg vitelline membrane: Survival and growth in egg components after different refrigeration storage times. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 2, 123–129.
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Landers, K. L., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., Birkhold, S. G., & Ricke, S. C. (2005). Ovarian laying hen follicular maturation and *in vitro* *Salmonella* internalization. *Veterinary Microbiology*, 108, 95–100.
- Humphrey, T. J. (1999). Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control. Saeed A.M (pp. 183–191). Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Hussein, A. S., Cantor, A. H., & Johnson, T. H. (1989). Comparison of the use of dietary aluminum with the use of feed restriction for force-molting laying hens. *Poultry Science*, 68, 891–896.
- Imai, K., & Nalbandov, A. V. (1971). Changes in FSH activity of anterior pituitary glands and of blood plasma during the laying cycle of the hen. *Endocrinology*, 88, 1465.
- James, C., Lechevalier, V., & Ketteringham, L. (2002). Surface pasteurization of shell eggs. *Journal of Food Engineering*, 53, 193–197.

- Jeng, D. K. H., Kaczmarek, K. A., Woodworth, A. G., & Balasky, G. (1987). Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2133–2137.
- Johnson, A. L. (2000). Reproduction in the female. In G. C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology* (5th edition): Academic Press.
- Jones, D. R., Anderson, K. E., Curtis, P. A., & Jones, F. T. (2002). Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*, 81, 715–720.
- Jones, F. T., Rives, D. V., & Carey, J. B. (1995). *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. *Poultry Science*, 74, 753–757.
- Keklik, N. M., Demirci, A., Patterson, P. H., & Puri, V. M. (2010). Pulsed UV light inactivation of *Salmonella* Enteritidis on eggshells and its effects on egg quality. *Journal of Food Protection*, 73, 1408–1415.
- Keller, L. H., Benson, C. E., Krotec, K., & Eckroade, R. J. (1995). *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*, 63, 2443–2449.
- Keshavarz, K., & Quimby, F. W. (2002). An investigation of different molting techniques with an emphasis on animal welfare. *Journal of Applied Poultry Research*, 11, 54–67.
- Kim, C., Hung, Y. C., & Brackett, R. E. (2000). Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 199–207.
- Kinner, J. A., & Moats, W. A. (1981). Effect of temperature, pH, and detergent on survival of bacteria associated with shell eggs. *Poultry Science*, 60, 761–767.
- Knape, K. D., Carey, J. B., & Ricke, S. C. (2001). Response of foodborne *Salmonella* spp. marker strains inoculated on egg shell surfaces to disinfectants in a commercial egg washer. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 36, 219–227.
- Koch, T. (1973). *Anatomy of the chicken and domestic birds*. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Kuo, F. L., Carey, J. B., & Ricke, S. C. (1997a). UV irradiation of shell eggs: Effect on populations of aerobes, molds, and inoculated *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Protection*, 60, 639–643.
- Kuo, F. L., Kwon, Y. M., Carey, J. B., Hargis, B. M., Krieg, D. P., & Ricke, S. C. (1997b). Reduction of *Salmonella* contamination on chicken egg shells by a peroxidase-catalyzed sanitizer. *Journal of Food Science*, 62, 873–874 884.
- Landers, K. L., Moore, R. W., Dunkley, C. S., Herrera, P., Kim, W. K., Landers, D. A., Howard, Z. R., McReynolds, J. L., Bryd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008a). Immunological cell and serum metabolite response of 60-week-old commercial laying hens to an alfalfa meal molt diet. *Bioresource Technology*, 99, 604–608.
- Landers, K. L., Moore, R. W., Herrera, P., Landers, D. A., Howard, Z. R., McReynolds, J. L., Bry, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2008b). Organ weight and serum triglyceride responses of older (80 week) commercial laying hens fed an alfalfa meal molt diet. *Bioresource Technology*, 99, 6692–6696.
- Landers, K. L., Woodward, C. L., Li, X., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2005). Alfalfa as a single dietary source for molt induction in laying hens. *Bioresource Technology*, 96, 565–570.
- Lister, S. A. (1988). *Salmonella* Enteritidis infection in broilers and broiler breeders. *The Veterinary Record*, 123, 350.
- Lock, J. L., & Board, R. G. (1992). Persistence of contamination of hens' egg albumen *in vitro* with *Salmonella* serotypes. *Epidemiology and Infection*, 108, 389–396.
- Lucore, L. A., Jones, F. T., Anderson, K. E., & Curtis, P. A. (1997). Internal and external bacterial counts from shells of eggs washed in a commercial-type processor at various wash-water temperatures. *Journal of Food Protection*, 60, 1324–1328.
- Mann, K. (2008). Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics*, 8, 2322–2332.
- Martin, G. A., Morris, T. B., Gehle, M. H., & Harwood, D. G. (1973). Force molting by limiting calcium intake. *Poultry Science*, 52, 2058 (Abstr.).
- Mayes, J. F., & Takeballi, M. A. (1983). Microbial contamination of the hen's egg: A review. *Journal of Food Protection*, 46, 1092–1098.
- McCormick, C. C., & Cunningham, D. L. (1987). Performance and physiological profiles of high dietary zinc and fasting as methods of inducing a forced rest: A direct comparison. *Poultry Science*, 66, 1007–1013.
- McReynolds, J. L., Genovese, K. J., He, H., Swaggerty, C. L., Byrd, J. A., Ricke, S. C., Nisbet, D. J., & Kogut, M. H. (2009). Alfalfa as a nutritive modulator in maintaining the innate immune response during the molting process. *Journal of Applied Poultry Research*, 18, 410–417.
- McReynolds, J. L., Moore, R. W., Kubena, L. F., Byrd, J. A., Woodward, C. L., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2006). Effect of various combinations of alfalfa and standard layer diet on susceptibility of laying hens to *Salmonella* Enteritidis during forced molt. *Poultry Science*, 85, 1123–1128.
- Messens, W., Grijspeerd, K., De Reu, K., De Ketelaere, B., Mertens, K., Bamelis, F., Kemps, B., De Baerdemaeker, J., Decuyper, E., & Herman, L. (2007). Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Journal of Food Protection*, 70, 623–628.
- Messens, W., Grijspeerd, K., & Herman, L. (2005). Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science*, 46, 694–700.
- Messens, W., Grijspeerd, K., & Herman, L. (2006). Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science*, 47, 554–560.
- Messens, W., Grijspeerd, K., Herman, L., & Billet, L. (2002). A survey on institutional users of shell eggs and egg products in Flanders. *Journal of Food Safety*, 22, 273–290.
- Meszaros, L., Horti, K., & Farkas, J. (2006). Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments – I. Gamma irradiation of shell eggs. *Acta Alimentaria*, 35, 229–236.
- Methner, U., Diller, R., Reiche, R., & Boehland, K. (2006). Occurrence of salmonellae in laying hens in different housing systems and conclusion for the control. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 119, 467–473.
- Mine, Y. (2000). Avidin. In C. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 253–261). Boca Raton, FL: CRS Press.
- Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T., & Arakawa, A. (1997). *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. *Avian Diseases*, 41, 296–303.
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., & Arakawa, A. (1998). *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, 61, 350–353.
- Mizumoto, N., Sasai, K., Tani, H., & Baba, E. (2005). Specific adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis in the vagina of laying hens. *Veterinary Microbiology*, 111, 99–105.
- Moore, R. W., Park, S. Y., Kubena, L. F., Byrd, J. A., McReynolds, J. L., Burnham, M. R., Hume, M. E., Birkhold, S. G., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2004). Comparison of zinc acetate and propionate addition on gastrointestinal tract fermentation and susceptibility of laying hens to *Salmonella* Enteritidis during forced molt. *Poultry Science*, 83, 1276–1286.
- Moran, T., & Hale, M. P. (1936). Physics of the hen's egg. *The Journal of Experimental Biology*, 13, 35–40.
- Mrosovsky, N., & Sherry, D. F. (1980). Animal anorexias. *Science*, 207, 837–842.
- Murase, T., Senjyu, K., Maeda, T., Tanaka, M., Sakae, H., Matsumoto, Y., Kaneda, Y., Ito, T., & Otsuki, K. (2001). Monitoring of chicken houses and an attached egg-processing facility in a laying farm for *Salmonella* contamination between 1994 and 1998. *Journal of Food Protection*, 64, 1912–1916.
- Naber, E. C., Latshaw, J. D., & Marsh, G. A. (1984). Effectiveness of low sodium diets for recycling of egg production type hens. *Poultry Science*, 63, 2419–2429.
- Namata, H., Meroc, E., Aerts, M., Faes, C., Abrahantes, J. C., Imberechts, H., & Mintiens, K. (2008). *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 83, 323–336.
- Nascimento, V. P., Cranstoun, S., & Solomon, S. E. (1992). Relationship between shell structure and movement of *Salmonella* Enteritidis across the eggshell wall. *British Poultry Science*, 33, 37–48.
- NASS (2009). *Chickens and eggs*. Available at http://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide_to_NASS_Surveys/Chickens_and_Eggs/index.asp Accessed 18 January 2011
- North, M. O. (1978). *Commercial chicken production manual*. Westport, Connecticut: AVI publishing Co. Inc.
- North, M. O., & Bell, D. D. (1990). *Commercial chicken production manual* (4th ed.). New York: Chapman Hall.
- Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., & Baba, E. (2001a). Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*, 45, 61–69.
- Okamura, M., Miyamoto, T., Kamijima, Y., Tani, H., Sasai, K., & Baba, E. (2001b). Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and *in vitro* adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars. *Avian Diseases*, 45, 962–971.
- Okubo, T., Akachi, S., & Hatta, H. (1997). Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, H. Hatta, & M. Kim (Eds.), *Hen eggs, their basic and applied science* (pp. 1–12). New York: CRC Press, Inc.
- O'Leary, J., & Busta, F. F. (1974). Effect of food components on growth of *Bacillus stercorophilus*. *Journal of Food Science*, 39, 1157–1160.
- Olsen, A. R., & Hammack, T. S. (2000). Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aeneascens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. *Journal of Food Protection*, 63, 958–960.
- Padron, M. (1990). *Salmonella* Typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases*, 34, 463–465.
- Park, S. Y., Birkhold, S. G., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2004). Effects of high zinc diets using zinc propionate on molt induction, organs, and postmolt egg production and quality in laying hens. *Poultry Science*, 83, 24–33.
- Patrick, M. E., Adcock, P. M., Gomez, T. M., Altekruze, S. F., Holland, B. H., & Tauxe, R. V. (2004). *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985–1999. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 1–7.
- Ricke, S. C. (2003). The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. *Poultry Science*, 82, 1003–1007.
- Ricke, S. C., Birkhold, S. G., & Gast, R. K. (2001). Eggs and egg products. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 473–482). Washington, D.D.: American Public Health Association.
- Ricke, S. C., Dunkley, C. S., McReynolds, J. L., Dunkley, K. D., & Nisbet, D. J. (2010). Molting in laying hens and *Salmonella* infection. In P. J. van der Aar, & J. Dopperberg (Eds.), *Dynamics in animal nutrition* (pp. 135–146). Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Roberts, J. R., & Brackpool, C. E. (1994). The ultrastructure of the avian egg shells. *Poultry Science Reviews*, 5, 245–272.
- Robinson, F. E., & Etches, R. J. (1986). Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction*, 35, 1096–1105.
- Robinson, F. E., Etches, R. J., Anderson-Langmuir, W. H., Burke, K. W., Cheng, F. J., Cunningham, F. J., Ishii, S., Sharp, P. J., & Talbot, R. T. (1988). Steroidogenic relationships of gonadotrophin hormones in the ovary of the hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 69, 455–466.
- Russell, S. M. (2003). The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poultry Science*, 82, 158–162.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffen, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15.

- Schoeni, J. L., Glass, K. A., McDermott, J. L., & Wong, A. C. L. (1995). Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 385–396.
- Seo, K. H., Holt, P. S., & Gast, R. K. (2001). Comparison of *Salmonella* Enteritidis infection in hens molted via long-term feed withdrawal versus full-fed wheat middling. *Journal of Food Protection*, 64, 1917–1921.
- Shimmura, T., Eguchi, Y., Uetake, K., & Tanaka, T. (2008). Comparison of behavior, physical condition and performance of laying hens in four molting methods. *Animal Science Journal*, 79, 129–138.
- Simkiss, K. (1968). The structure and formation of the shell and shell membranes. In T. C. Carter (Ed.), *Egg quality: A study of the hen's egg* (pp. 3–25). Edinburg: Oliver and Boyd.
- Taylor, L. W., & Martin, J. H. (1929). Factors influencing thickness of egg shell. *Poultry Science*, 8, 39–44.
- Thiagarajan, D., Saeed, A. M., & Asem, E. K. (1994). Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. *Poultry Science*, 73, 89–98.
- Thiagarajan, D., Saeed, M., Turek, J., & Asem, E. (1996). *In vitro* attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella* Enteritidis phage type 8. *Infection and Immunity*, 64, 5015–5021.
- USDA (2009). 2007 census report. Available at: http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2007/Full_Report/index.asp Accessed 18 January 2011
- USDA/AMS (2004). Minimum facility and operating requirements for shell egg grading and packing plants, 7 C.F.R. 56.76. Available at: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004690> Accessed 20 January 2011.
- USDA/FSIS (2005). Risk assessment for *Salmonella* Enteritidis in shell eggs and *Salmonella* spp. in egg products, October 2005. Available at: Washington, DC: USDA-FSIS http://www.fsis.usda.gov/Science/Risk_Assessments/index.asp#eggs Accessed 01 March 2011.
- USDA/NASS (2010). Chickens and eggs 2009 summary. February 2010. Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/ChickEgg/ChickEgg-02-25-2010.pdf> Accessed February 11, 2011
- Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Barco, L., Ricci, A., Theodoropoulos, G., Xylouri, E., De Vylder, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., de Kruif, A., & Dewulf, J. (2010). Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 94, 94–100.
- Vanlith, L. A. J. T., Putrirulan, F. F., & Mulder, R. W. A. W. (1995). Pasteurization of table eggs to eliminate salmonellae. *Archiv Geflügelkunde*, 59, 147–160.
- Vermaut, S., De Coninck, K., Onagbesan, O., Flo, G., Cokelaere, M., & Decuyper, E. (1998). A jojoba-rich diet as a new forced molting method in poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, 7, 239–246.
- Walden, C. C., Allen, I. V. F., & Trussell, P. C. (1956). The role of egg shell membranes in resisting the entry of microorganisms. *Poultry Science*, 35, 1190–1196.
- Wallner-Pendleton, E. A., Sumner, S. S., Froning, G. W., & Stetson, L. E. (1994). The use of ultraviolet-radiation to reduce *Salmonella* and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. *Poultry Science*, 73, 1327–1333.
- Webster, A. B. (2003). Physiology and behavior of the hen during induced molt. *Poultry Science*, 82, 992–1002.
- Williams, J. B., & Sharp, P. J. (1978). Ovarian morphology and rates of ovarian follicular development in laying broiler breeders and commercial egg-producing hens. *Poultry Science*, 63, 786.
- Wilson, S. C., & Sharp, P. J. (1973). Variations in plasma luteinizing hormone levels during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproductive Fertility*, 35, 561–564.
- Woodward, C. L., Kwon, Y. M., Kubena, L. F., Byrd, J. A., Moore, R. W., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. (2005). Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and invasion by an alfalfa diet during molt in leghorn hens. *Poultry Science*, 84, 185–193.

Control of *Salmonella* Contamination of Shell Eggs—Preharvest and Postharvest Methods: A Review

Anca M. Galiş, Christopher Marcq, Didier Marlier, Daniel Portetelle, Ilie Van, Yves Beckers, and André Théwis

Abstract: *Salmonella* Enteritidis is one of the most prevalent foodborne pathogen, its main reservoir being considered the shell egg. As the concerns related to the increasing human salmonellosis cases grow, the need for an application of preventive methods either at the farm level or during the processing steps is crucial for a better control of the foodborne outbreaks due to the consumption of this specific food product. This review focuses on the application of preventive methods at the farm level, on preharvest step, in order to reduce the risk of shell eggs contamination with *Salmonella*, especially *S. Enteritidis*, through a better control of the laying hens' infection with this pathogen. As postharvest methods, a 1st approach is the egg storage conditions and the prevention of *Salmonella* spp. growth and multiplication. In addition, shell eggs may be subjected to eggshell decontamination, to reduce the risk of foodborne outbreaks. Several of these latter mentioned methods are already authorized to be put in place in different countries, as it is the case in the United States of America and Canada. Their efficacy has been proven and their use is regarded by some as mandatory for ensuring shell eggs safety for the consumers.

Introduction

Salmonella genus is a member of the *Enterobacteriaceae* family, comprising Gram-negative rod-shaped nonspore-forming bacteria. Their main reservoir is the intestinal tract of humans and animals (Bhunia 2007).

Among the different serotypes of *Salmonella enterica*, *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium* account for the most nontyphoidal *Salmonella* infections in both developed and developing countries (CDC 2010, 2012; EFSA 2010; Majowicz and others 2010; Scallan and others 2011; Wales and Davies 2011; EFSA 2012). These serotypes are regarded as unrestricted, being able to cause infections in animals as well as in humans (Martelli and Davies 2012). Eggs and egg-based products were frequently associated with salmonellosis outbreaks caused by *S. Enteritidis* in the United States of America (U.S.A.), as well

as in the European Union (E.U.) (Braden 2006; EFSA 2012). This is a potential consequence of the high frequency at which *S. Enteritidis* colonizes the ovaries of laying hens (Gantois and others 2008). Usually this happens without any lesions and furthermore, when egg storage conditions allow it, this foodborne pathogen may be isolated from the shell egg, as it survives in the forming egg (Gast and others 2007; Gantois and others 2009; Raspoet and others 2011; Howard and others 2012). Transmission of this serotype may happen either vertically (Gast and Beard 1990; Galàn 2001; Groisman 2001; Gast and others 2002; Gast and others 2004; Gyles and others 2004; Gast and others 2007; Ibarra and Steele-Mortimer 2009; Li and others 2009; Mastroeni and others 2009; Dawoud and others 2011; De Vylder and others 2011; Desin and others 2011; Linke and Goldman 2011; Shah and others 2011; Howard and others 2012; Kumar 2012) or horizontally (Holt 1995; Holt and others 1998; Jones and others 2002; Davies and Breslin 2003b; De Reu and others 2006; Musgrove and others 2012).

In comparison to *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* is less frequently encountered to be a cause of human salmonellosis due to consumption of shell eggs. However, its ability to colonize the reproductive tract of the laying hens and contaminate the forming eggs has also been determined (Okamura and others 2005; Wales and others 2007; Gantois and others 2008; Okamura and others 2010; Wales and Davies 2011; Martelli and Davies 2012).

Other serotypes of *S. enterica*, such as *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Heidelberg* are very rarely found to be contaminating shell eggs (CDC 2010).

MS 20121075 Submitted 8/6/2012, Accepted 11/30/2012. Authors Galiş and Van are with Univ. of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, Animal Science Unit, Bd. Mărăşti, no. 59, sector 1, Bucharest, 011464, Romania. Authors Marcq, Beckers, and Théwis are with Univ. of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech, Animal Science Unit, Passage des Déportés, 2, B-5030, Gembloux, Belgium. Author Marlier is with Univ. of Liege, Faculty of Veterinary Medicine, Dept. of Clinical Science, Clinic for Birds, Rabbits and Rodents, Boulevard de Colonster 20, B42, Sart-Tilman, B4000, Liege, Belgium. Author Portetelle is with Univ. of Liege, Gembloux Agro-Bio Tech, Animal and Microbial Biology Unit, Passage des Déportés, 2, B-5030, Gembloux, Belgium. Direct inquiries to author Galiş (E-mail: ancagalish@gmail.com).

The preventive methods for reducing the risk of *Salmonella* contamination of shell eggs and human salmonellosis outbreaks due to their consumption can be either applied as preharvest or as postharvest procedures. Furthermore, they can be either serotype-specific or serotype-independent, the latter being considered a more complex approach (Gast 2007). The environment of the laying hen house can act as reservoir for *Salmonella* (Henzler and Optiz 1992; Davies and Wray 1995, 1996; Eriksson de Rezende and others 2001; Davies and Breslin 2003b; Davis and Morishita 2005; Holt and others 2007; Umali and others 2012), along with the feed, that can be already contaminated as it arrives in the farm (Davies and Hinton 2000; Shiota and others 2000; Maciorowski and others 2006; Gast 2007; Davies and Wales 2010). Due to these various sources of infection for the laying hens, preventive methods are already applied or available at the farm level: flock testing, sanitation and biosecurity (Gast and Beard 1990; Davison and others 1996; Hogue and others 1997; Davies and Breslin 2001; Gast 2007; Arnold and others 2010; Gast and Guard 2011; Holt and others 2011); vaccination (Nakamura and others 1994; Liu and others 2001; Goldsby and others 2003; Khan and others 2003; De Buck and others 2004a; Van Immerseel and others 2005b, 2005c; Gantois and others 2006; Toyota-Hanatani and others 2009; Omwandho and Kubota 2010); passive immunization (Gürtler and others 2004; Chalghoumi and others 2008, 2009a, 2009b); the use of natural antimicrobial products such as bacteriophages (Joerger 2003; Toro and others 2005; Borie and others 2009; Monk and others 2010; Waseh and others 2010), protein and fiber sources (Sugita-Konishi and others 2002; Kassaify and Mine 2004a, 2004b, 2005), competitive exclusion flora, probiotics, prebiotics, and organic acids (Schneitz and Mead 2000; Seo and others 2000; Tellez and others 2001; Van Immerseel and other 2002; Schneitz 2005; Van Immerseel and others 2005a; Doyle and Erickson 2006; Lima and others 2007; Sterzo and others 2007; Van Coillie and others 2007; Van Immerseel and others 2007; Donaldson and others 2008b; Vandeplass and others 2010; Tellez and others 2012), essential oils (Chao and others 2000; Lee and others 2004; Johnny and others 2008; O'Bryan and others 2008; Brenes and Roura 2010; Ouwehand and others 2010), and bacteriocins (Cleveland and others 2001; Gordon and other 2007; Heng and others 2007; Dias Paiva and others 2011). For postharvest control of *Salmonella* in shell eggs, the 1st approach is to maintain an adequate temperature during storage (Gast and Holt 2000, 2001; Gast and others 2006; Lublin and Sela 2008; FDA 2009a, 2009b; Gantois and others 2009). However, different surface decontamination methods are already applied in the U.S.A. and new ones make the subject of continuous research: egg washing (Hutchison and others 2003; Jones and others 2005; Caudill and others 2010); electrolyzed water (Huang and others 2008; Howard and others 2012; Mukhopadhyay and Ramaswamy 2012); ozone (Davies and Breslin 2003a; Rodriguez-Romo and others 2007; Perry and others 2008); ultrasounds (Cabeza and others 2011); microwaves (Lakins and others 2008); irradiation (Serrano and others 1997; Wong and Kitts 2003; Cabo Verde and others 2004); gas plasma (Kayes and others 2007; Ragni and others 2010); ultraviolet light (Rodriguez-Romo and Yousef 2005); and pulsed light (Hierro and others 2009). Among all these, the ones authorized in the U.S.A. are the shell washing and irradiation (USDA 2005; FDA 2009b).

The aim of this paper is to review most of the postharvest and preharvest methods for reducing *Salmonella* contamination of shell eggs and furthermore the risk of human salmonellosis outbreaks caused by this food product.

Preharvest Methods for Reducing the Risk of *Salmonella* Contamination of Shell Eggs

Salmonella carrier state in poultry and the genetic control of resistance to salmonellosis

Among the different preventive methods used against *Salmonella* in laying hens, genetic selection may be a promising one in reducing the occurrence of salmonellosis in layers. It has been shown, indeed, that genetic lines of laying hens exhibit different resistance levels against *Salmonella* spp. (Gantois and others 2009).

A genetic correlation between *Salmonella* spp. contamination level in different tissues has been demonstrated. In an investigation concerning the heritability of resistance trait in laying hens, Girard-Santosuosso and others (2002) demonstrated that the genetic correlation (r) between the concentration (\log_{10} CFU/g) of *S. Enteritidis* in the liver and the genital organs was high (0.56). A similar result was found for the concentration of *S. Enteritidis* in the spleen and in the genital organs, with a correlation of 0.79. The authors suggested that the genes controlling the contamination of these organs are the same. Beaumont and others (2009a) estimated that in adult laying hens the genetic correlation between global contamination and ovarian contamination was 0.32, while between global contamination and the other organs it was high: 0.75 for the liver and, 0.85 for the spleen and ceca, with a probability of 100% of being positive.

The assessment of genetically regulated resistance is of high importance for genetic control of resistance to *Salmonella* spp. infection. The studies investigating this subject were all aimed to reduce the disease occurrence and economic losses in laying hens, as well as controlling *Salmonella* spp. colonization of internal organs and the contamination of their products, especially focusing on *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* (Wigley 2004). In a study performed by Sadeyen and others (2006), 2 inbred lines of laying hens known for different resistance traits were orally inoculated with *S. Enteritidis*. Bacterial colonization and the host gene expression were measured in the ceca and the gut-associated lymphoid tissue. The expression of chemokine, of the anti-infectious cytokine, of the bacterial receptor, of the antimicrobial mediator, and, particularly, of the defensin genes were all increased in the line carrying a lower level of bacteria in the ceca. These innate immunity molecules were either constitutively or inductively highly expressed in resistant adult birds, thus being considered candidate genes that could play a role in a host's protection against *Salmonella* colonization. In a previous study, Sadeyen and others (2004) revealed that susceptible lines expressed a lower baseline level of IFN- γ than resistant lines. They concluded that the persistence of *Salmonella* spp. in the digestive tract is caused by an immunodeficiency state.

Considering the systemic phase of infection, Fife and others (2009) showed that resistance is partly determined by genetic strains and that, in resistant lines, the microbial load can reach values of up to 1000 times lower, in comparison with susceptible lines. The identification of genes contributing to resistance against this disease may therefore enhance the genetic selection of the resistant lines. Furthermore, Prévost and others (2008) revealed that in experimental conditions the crossbreeding between different selected lines, for lower or higher propensity to carry *Salmonella* spp., resulted in a reduction by half of the maximal percentage of contaminated animals. Nevertheless, they were unable to accelerate the extinction of disease.

As stated above, the level of resistance differs from one line to another. However, inside a particular line, age has been shown to influence the genetic control of resistance. This may be linked directly to the mechanisms of resistance, chickens being only

protected by the innate immune response, while adult hens may also benefit from the adaptive immune system (Beaumont and others 2009b). The chicken antibody repertoire is generated during the late embryonic stage and for a short period after hatching. As the chick ages, its B cells undergo additional rounds of somatic gene conversion and its antibody repertoire achieves a mature state around the age of 5 to 7 wk. This corresponds to the age the bursa becomes fully mature (Davidson and others 2008).

Resistance to systemic salmonellosis in poultry is encoded by a number of factors, several of them being of genetic nature. The gene *Slc11a1* was 1st identified in mice (Roy and Malo 2002). Its physiological and functional properties support its role in controlling the intracellular replication of foreign microorganisms in phagosomes. *Slc11a1* alleles were shown to be involved in early as well as in late resistance. The effect of the *Slc11a1* locus has been moreover associated with the carrier-state resistance variations in divergent chicken lines (Wigley 2004; Calenge and others 2010).

Another resistance-related factor called Toll-like receptor 4 belongs to a family of innate immune system receptors involved in the recognition of lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria (Calenge and others 2010; Chaussé and others 2011).

Recent mapping has revealed a new locus on chicken chromosome 5, accounting for a major part of the differences in susceptibility between the lines (Fife and others 2009). This novel gene has been named *SAL1* as it seems to play a role in increasing macrophage activity against *Salmonella* spp. The differences in the pathology of infection between the resistant and the susceptible lines indicate that the key to the resistance lies within the mononuclear/phagocytic cell function. *SAL1* locus was assessed by high-density single nucleotide polymorphism (SNP) panels in combination with backcrossing of the resistant and susceptible lines and, after refining, it has been shown that this region spans 14 genes, including 2 striking functional candidates: CD-27 binding protein (Siva-1) and the RAC- α serine/threonine protein kinase homologue AKT1. Siva-1 is an apoptosis-inducing factor, which possesses the ability to activate the process of induced cell death and to downregulate the immune response. AKT-1 activates NF- κ B via regulation of I κ B kinase, resulting in transcription of pro-survival genes, which are directly involved in *Salmonella*-induced apoptosis (Fife and others 2009).

Besides selection, genetic engineering has also been investigated as an alternative strategy to traditional animal crossbreeding. The goal is the enhancement of an animal's ability to develop an appropriate immune response against the pathogen. However, even when the desirable allele for resistance is present in a population, it may be difficult to introduce it into a given genotype due to the simultaneous introduction of many unrelated and unknown traits. Once genetically modified animals exhibit the trait of resistance to *Salmonella* spp. they could be introduced into the breeding stock. Nevertheless, their introduction in the food chain is still controversial (Whitelaw and Sang 2005).

Until now, all the identified genes and loci concerning laying hens' resistance to *Salmonella* spp. represent potential subjects for further investigation on the possibility of selection for this specific trait. The improvement of laying hens' genetic resistance to *Salmonella* spp. carrier-state could represent a complementary way to reduce *Salmonella* spp. propagation, thus enhancing the possibility for other preventive methods to succeed in reducing the rate of contamination with high-risk *Salmonella* serotypes such as *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*.

Before taking into account the possibility to use the result of genetic studies considering the improvement of resistance against

Salmonella in laying hens, it is certainly necessary to confirm the roles of the different investigated genes and resistance factors.

Beaumont and others (2010) suggest that even when choosing an approach by candidate genes, the association observed between the quantitative trait loci region and the character encoded does not allow excluding the possibility of another gene's involvement. The most detailed study was the one investigating *SAL1*, this permitting to reduce the quantitative trait loci presence zone to a region, which contains only 14 genes (Fife and others 2009). If continued, the efforts will lead to an obvious development in the field of SNP methods, to a larger scale, permitting the progress in different rapid applications.

Flock management

The high incidence of human salmonellosis caused specifically by *S. Enteritidis* through the consumption of contaminated shell eggs or egg products derived from such contaminated shell eggs recently determined the development and implementation of multiple *Salmonella* programs. These comprise a series of testing and monitoring methods, as well as several procedures (including cleaning and disinfection, control of pests) considered very efficient in reducing the risk of *Salmonella* presence in the environment of the hen houses.

Gast (2007) considers that a more serotype-independent approach for reducing the risk of shell eggs contamination with *Salmonella* has the advantage of detecting and responding to emerging problems before their impact becomes more severe. The same author concludes that, regarding the preharvest *Salmonella* control programs in poultry flocks, no single type of response (a serotype-specific one or a serotype-independent one) could provide a unilateral solution to the complex public health and economic problems related to this foodborne pathogen.

A series of environmental-related factors may influence the likelihood and outcome of *Salmonella* infections in poultry. These factors are: litter, dust, mice, flies and the different surfaces from the hen houses or the farm, with which the laying hens may come in contact with. Davies and Breslin (2003b) showed that during a 26-mo postdepopulation period, with periodical sampling from the environment of a free-range breeding farm, *S. Enteritidis* Phage Type 4 (PT4) was persistently present in the soil, in the litter, nest boxes, feed troughs and mice droppings.

The levels of *Salmonella* in the litter have been reported to increase with increasing the water-activity levels and the moisture content, mostly due to accidental water leakage (Eriksson de Rezende and others 2001). For this, preventive methods are applied, such as maintaining a litter drying environment through a modest and uniformly distributed ventilation rate (100 to 150 ft/min) over the litter surface. Turnbull and Snoeyenbos (1973) observed that a high pH value of the litter, caused by the ammonia dissolved in the available moisture of the litter, was unfavorable for *Salmonella* growth. Also, Bennett and others (2003) observed that addition of hydrated lime to the litter can markedly reduce *Salmonella* *Enteritidis* recovery in a relatively short time (< 24 h), due to the increase in pH of up to 12.57 at an addition of 20% of lime.

Dust has been associated with a long persistence of *Salmonella* in the poultry houses. Davies and Wray (1996) observed that *S. Enteritidis* was frequently found surviving in small pockets of fan dust, which had been left after cleaning and disinfection of the poultry house. This result came from a study on the survival of *S. Enteritidis* in poultry units carried out over a period of 2 y. Also, it appears that *S. Enteritidis* persists preferentially when

associated with dust particles swept from the floor and the feed troughs, with at least a 26-mo survival in artificially contaminated poultry feed. Davis and Morishita (2005) found that *Salmonella* spp. could be isolated as an airborne pathogen, inside the laying hens' house, and as well in the outside area of the hen house, up to a 40 ft distance (approximately 13 m). Dust could possibly act as a vector for *S. Enteritidis* spread from infected hens to healthy ones, through a potential airborne transmission. Gast and others (1998) studied the mechanism by which *S. Enteritidis* might spread between groups of chicks housed in controlled-environment disease transmission cabinets. The airflow was directed from one group ("upstream") to another ("downstream"). Groups consisting of 25 1-d-old chicks were placed in the upstream ends and orally inoculated with *S. Enteritidis*. One day later, another group of 25 1-d-old chicks was placed in the downstream end. At 3 and 7 d postinoculation, *S. Enteritidis* was found on the feathers of 77% of the downstream chicks, among them 33% already infected with *S. Enteritidis*. The authors suggested that the infection was apparently transmitted through oral ingestion, probably from environmental surfaces contaminated by airborne movement of the pathogen. This led to the conclusion that a reduction of *S. Enteritidis* airborne-movement would limit the spread of infection within flocks, further on reducing the incidence of potentially contaminated eggs.

Due to the wide host range of *Salmonella* spp., different biologic vectors may appear and pose a risk for an infection in poultry, through the dissemination of the pathogen. Mice are considered the main reservoir among the biologic vectors, Henzler and Opitz (1992) revealing that the bacterial count from the feces of one mouse can yield 2.3×10^5 *S. Enteritidis* bacteria/fecal pellet. Moreover, this serotype can persist up to 10 mo in an infected mice population. Persistent *S. Enteritidis* infection in the poultry units are usually a result of a high proportion of mice found to carry this pathogen. Davies and Wray (1995) showed that *S. Enteritidis* determines a systemic infection in mice. At the farm level, 3-wk-old chicken were infected with *S. Enteritidis* through direct contact with droppings from mice experimentally infected 5 mo previously. In addition, wild mice infected artificially or naturally, excreted *S. Enteritidis* intermittently, with up to 10^4 CFU/individual dropping.

Rats, as mice, are considered a reservoir of *Salmonella*, with a high risk of poultry infections. Umali and others (2012) studied the transmission and shedding patterns of *Salmonella* in naturally infected wild rats, through daily observations and sampling. *S. Enteritidis* was more frequently isolated from the spleen and liver at the end of the study, in comparison to the number of positive cultures from the feces. Moreover, the authors isolated another serotype, *S. Infantis*, which determined more likely an enteric type of infection. This was due to a much higher frequency of its isolation from the feces, while absent in the organs.

Insects could also be considered a vector of *Salmonella*, one of the most frequently encountered muscoid flies being *Musca domestica*, also called the housefly. Mian and others (2002) found that among the muscoid flies, at commercial farms subjected to tests for *Salmonella* *Enteritidis* presence, 5 species were encountered, and among these, the housefly was the only one tested positive for *S. Enteritidis*. Further on, Holt and others (2007) demonstrated that flies exposed to an environment containing *S. Enteritidis* can become colonized with the microorganism and might serve as a source for transmission of *S. Enteritidis* within a flock situation. Flies collected at caged-layer facilities were involved in 2 outbreaks of *S. Enteritidis* infections due to contaminated shell eggs. Among

the existing flies, houseflies were *S. Heidelberg* and *S. Enteritidis* carriers (2 out of 15 pooled samples for the latter serotype) and dump flies (*Hydrotaea aeneascens*) were carriers of *S. Infantis* (Olsen and Hammack 2000).

Related to flock management, Holt and others (2011) mention that one of the factors that can affect the prevalence of *Salmonella* on premises is the flock size. A potential connection between the high stocking density of laying hens in conventional cages and the large volume of feces and dust may lead to an increase in the incidence of *Salmonella* infections in this particular type of housing system (Davies and Breslin 2004). In addition, high stocking densities may indirectly interact with *Salmonella* infections because of the caused stress (Van Hoorebeke and others 2011).

Feed management practices and foodborne *Salmonella* spp. contamination of poultry feeds

Feed withdrawal for molting purposes. Molting induced by feed withdrawal, a common practice destined to increase egg productivity and decrease hen mortality (Alodan and Mashaly 1999), has been shown to enhance the risk of vertical transmission of *Salmonella* spp. (Holt 1999; Golden and others 2008). Berry (2003) states that during the induced molting, due to stress, transient reductions in the number of specific lymphocyte classes appear, which may cause an increased susceptibility to infection. The same author states that reduced mortality during and after induced molting suggests that this practice does impair the immune function with respect to avian pathogens, but only to a limited degree. In addition, during the molting periods, *S. Enteritidis* can be transmitted to uninfected layers from infected ones (Holt 1995; Holt and others 1998).

Durant and others (1999) showed during a challenge with *S. Enteritidis* (10^5 organisms) that through feed deprivation, applied as a method for molting, the numbers of lactobacilli and the concentrations of lactate, acetate, propionate and butyrate as well as the total volatile fatty acids (VFA) in the crops decreased, while crop pH increased. As a result, crop and cecal colonization of *S. Enteritidis* increased significantly in molted hens compared to the controls. This suggests that the changes in the crop environment, caused by feed deprivation are important for the regulation of *S. Enteritidis* survival.

For this reason, research has aimed to develop alternative methods for molting, new procedures that would avoid feed removal, but retain at the same time the economic benefits (Maciorowski and others 2006). For molting purposes, Woodward and others (2005) demonstrated that alfalfa could be used as an alternative, resulting in a reduction of *S. Enteritidis* colonization in experimentally challenged laying hens. Furthermore, in order to decrease the population of *Salmonella* spp. in the ceca of laying hens during molting, Willis and others (2008) assessed a combination of alfalfa and an extract of *Lentinus edodes*, also known as the Shiitake mushroom (Leatham 1982). The results showed a high decrease, up to 2.72 log CFU/g from the initial *Salmonella* spp. counts, suggesting that this combination might be successfully used as an alternative to feed removal during molting periods.

Feeding laying hens with wheat middlings caused a cessation of egg production within 3 to 7 d. The comparison of *S. Enteritidis* levels between unmolted group, molted by feed withdrawal group and wheat middlings feeding group resulted in a difference of 3 to 5 log more *S. Enteritidis* in the feed withdrawal group (Seo and others 2001).

Whole cottonseed meal (50% of the diet) can also be used when inducing molting, hens voluntarily reducing their feed intake. This type of molting is believed to be equivalent in effectiveness to the one produced by complete feed withdrawal, and with the same consequences on the egg safety, by increasing the risk of *S. Enteritidis* contamination (Davis and others 2002). Induction of molt by using grape pomace freely for 10, 14, or 18 d resulted in a postmolting performance comparable to that of hens exposed to 10 d of feed removal.

Keshavarz and Quimby (2002) observed that layers on continuous feed removal and grape pomace with added thyroxin went out of production 3 to 4 d after the initiation of molt. Furthermore, egg production for 70 to 98 wk of age or 66 to 98 wk of age, as well as egg mass and feed conversion were similar for feed removal and grape pomace plus thyroxin treatments.

Foodborne *Salmonella* spp. contamination of poultry feeds.

Poultry feed can become contaminated with foodborne *Salmonella* either during harvesting, processing at the feed mill or storage (Maciorowski and others 2006). Poultry feeds can also become contaminated with salmonellae from animal proteins and other ingredients, or even from the dust present in the feed mills (Gast 2007).

Salmonella contamination of complete animal feed seems to be common, as studies from the U.S.A., as well as from several European countries, report *Salmonella* contamination rates in complete animal feed (finished feed) that range from 1.1% to 41.7% (Li and others 2012).

In Japan, Shirota and others (2000) isolated 148 strains of *Salmonella* spp. from 143 out of 4418 feed samples subjected to analysis. The isolated strains consisted of 32 serotypes, including 20 strains of *S. Enteritidis*, mainly originating in samples collected from feed mills. Davies and Wales (2010) investigated 4 commercial feed mills and 4 on-farm poultry feed mixers for the presence of *Salmonella* spp. They revealed that the serotypes (among them none pertaining to *S. Enteritidis*) present in raw feed ingredients on farms were associated with wildlife and/or livestock, whereas those in commercial mill ingredients were associated with home-produced cereals and imported vegetable protein sources. The ingredient contamination, particularly of cereals, may be attributed to wildlife, such as badgers and rodents that defecate in crops or in storage facilities (Davies and Hinton 2000).

Different protein sources and cereals have been identified as contaminated with *Salmonella* spp.: peanut meal, sunflower meal, soybean meal, bran meal, barley, corn, sorghum, and wheat (Maciorowski and others 2006). Sunflower yielded the highest number of positive samples for *Salmonella* spp. presence (MacKenzie and Bains 1976).

Animal protein and byproducts destined for obtaining protein meals for animal feed have always been considered a major source of *Salmonella* spp., one cause being the incomplete decontamination of these ingredients during processing (Davies and others 2004).

Among these animal protein sources, meat meals (Mackenzie and Bains 1975; Hacking and others 1978; Nabbut 1978) and feather meals (Hacking and others 1978) have already been triggered as *Salmonella* sources. In addition, bone meal and fishmeal are apparently also sources of contamination with *Salmonella* (Nabbut 1978). In a study conducted on the Dutch feed industry, mash feeds used for layers were more frequently contaminated than pelleted ones, suggesting the role of the increased temperature during pelleting for a suitable reduction of the foodborne pathogens.

Considering their nature, 31% out of 130 fishmeal samples were contaminated in comparison to 4% out of 83 meat and bone meal samples. Therefore, fishmeals may have the tendency to be more frequently contaminated with *Salmonella* spp. than other types of animal protein sources (Veldman and others 1995).

During the feed processing, due to different processes to which the ingredients are subjected to (grinding, mixing, and pelleting), *Salmonella* spp. contamination can occur, as well as recontamination, once the processing is over.

According to Whyte and others (2003), *Salmonella* may be present in preheat as well as in postheat treatment areas of the poultry feed mills. They recovered the pathogen from samples of feed and dust, with overall percentages of 18.8% and 22.6%, respectively. A percentage of 11.8% of feed samples collected from a preheat area were associated with *Salmonella* presence, while from the same area, 33.3% of the dust samples were also *Salmonella* positive. From the postheat areas, 24.2% of the dust samples were *Salmonella* positive. In addition, the feed delivery area was considered a *Salmonella* recontamination space, therefore, samples were collected from this site too. It appeared that 57.1% of the samples taken from it were *Salmonella* positive.

At the level of primary production of feed, the ingredients obtained from different vegetal sources may become contaminated with *Salmonella* following direct contact with fertilizers. This could be reduced through different measures, as the EFSA report on the microbiological risk assessment of feedingstuffs mentions: storage of the fertilizer more than 2 mo, without any new influx; composting; ploughing in after spreading the fertilizer; increasing the time allowed between spreading of the fertilizer and the animal grazing or crop harvesting; heat treatment of fertilizers before use and treating fertilizers by lime addition. The conditions of transport and storage of the ingredients are considered of high importance, the risk increasing with the poor hygiene and no respect of good practices (EFSA 2008).

Salmonella control principles involve preventing contamination from entering the facility, reducing multiplication within the plant and killing the pathogen. Among the preventive measures to be applied for *Salmonella* feed contamination, the most important are obtaining *Salmonella*-free feed ingredients (Jones 2006), controlling the dust (Whyte and others 2003; Jones and Richardson 2004), restricting the flow of the personnel (EFSA 2008), reduction of fat accumulation, controlling rodents and wild birds and maintaining the sanitation of the transport vehicles (Fedorka-Cray and others 1997).

Maciorowski and others (2007) suggested different methods for controlling *Salmonella* contamination in feed. For feed degradation, shortening storage time to prevent browning and caking of the feed and the supplementation with soybean oil to prevent fat losses would be of 1st importance, before implementing other prevention methods. In addition, rapid drying is widely used to preserve raw feed ingredients (ICMSF 2005). Considering the addition of different antimicrobial agents, disinfectants such as acids (mineral acids, short-chain fatty acids), isopropyl alcohol, aldehydes, and trisodium phosphate may reduce the risk of contamination with *Salmonella*, through inactivation of this pathogen during the storage of feed (Maciorowski and others 2007). However, the same authors conclude that the efficacy of these additives may be reduced, due to the high concentration of organic matter in the feed. Moreover, several of them may act as corrosives and/or are toxic when introduced in high concentrations. Therefore, their use should be limited in processed feed.

Inactivation of *Salmonella* in feeds may involve pelleting (which consists of thermal processing) and/or chemical addition. The pelleting process consists of 3 major steps: mixing steam with mash feed (also called conditioning), pressing conditioned feed through metal dies (pelleting), and removal of heat and moisture via large volumes of air (cooling). During conditioning, it is considered that an amount of 10^3 CFU/100 g is destroyed, with destruction beginning at approximately 71 °C (Jones 2011).

Data presented by Jones and Richardson (2004) indicate that 16 out of 178 samples of mash diets (8.79%) were positive for *Salmonella*, while 19 out of 451 samples of pelleted feed (4.21%) were contaminated. This suggests that the pelleting process reduced the number of *Salmonella* cells isolated from feed by 50%.

Fancher and others (1996) reported that the use of an expander for conditioning step has, among others, the advantage of ensuring lower feed moisture, therefore an increased feed hygiene. The expander is a device that resembles to a single-screw extruder, which, in change, discharges the feed over an annular gap, instead of forcing it through a fixed die. This expander may improve the hygienic quality of feed, through a reduction of bacterial loads by 10^5 to 10^6 CFU/g. This is accomplished through values of temperature of 115 to 125 °C and pressure of up to 1200 psi, maintained for 10 to 20 s (Fancher and others 1996).

Steaming during pelleting process has been shown to eliminate bacteria (Stott and others 1975; Furuta and others 1980a,b). Stott and others (1975) showed that pelleting process reduced up to 1000-fold the numbers of *Enterobacteriaceae* in poultry feed, by sampling before and after this processing stage. Also, they isolated *Salmonella* only from samples of meat and bone meal. Furuta and others (1980a) observed that mash diets treated at 70 to 80 °C for 5 s in order to obtain pellets and crumbles, suffered a reduction of the number of bacterial colonies from 1.9×10^3 to 3.0×10^0 CFU/g.

The success of reducing *Salmonella* colony-forming units in feed may be influenced by different factors, related to the physical quality of the pellets, as they are discussed by Thomas and van der Poel (1996) and Thomas and others (1997, 1998). Apparently, different properties of the ingredients influence directly the binding process, with further influence on the pellet quality, evaluated through hardness and durability. In addition, the equipment plays a very important role in the final quality, with a direct influence on the final hygienic characteristics of the feed.

After conditioning and heat treatment, the cooling step poses a great risk of recontamination with *Salmonella*, in 2 ways. During cooling, condensation may occur if the temperature difference is more than 5 °C between the pelleted feed and the environment. Therefore, the warm pellets will determine condensation and free water in the so-called “clean-side” of the feed manufacturing facility. Condensation droplets, in favorable conditions, may lead to *Salmonella* growth, either on the top of the conveyor or in the silo. To reduce the microbiological risk that this problem may pose, the insulation of the top of the cooler can reduce the risk of condensation (EFSA 2008). Moreover, because pellet coolers pull large volumes of air, dust obtained from the cooler would appear to have a greater likelihood of contamination than dust collected in other areas. In addition, mechanical vibrations and air currents around the pellet mill may result in dust particles being dislodged and falling into the pelleted feed (Jones and Richardson 2004). EFSA (2008) mentions that adequate dust collector systems in the feed manufacturing facilities are important to control dust and to keep the environment in a clean condition.

Flock testing, sanitation, and biosecurity

Testing is a very important part of the *Salmonella* control programs. Testing is however controversial as its efficacy may be sometimes low, due to a continuous reintroduction of many serotypes of *Salmonella* (including *S. Enteritidis*) in the poultry houses and flocks, from environmental sources. Trace-back testing has generally not been an effective control strategy in the U.S.A., through the USDA regulation, between 1990 and 1995 (Hogue and others 1997; Gast and Guard 2011). Due to the fact that *Salmonella* fecal shedding is intermittent, testing this kind of samples does not have reliable results (Gast 2007). Nevertheless, environmental sampling has proven to be relatively easy to perform and the testing sensitivity is high, when the appropriate method is chosen (Arnold and others 2010) although it only indirectly reflects the actual probability of the egg contamination (Gast and Guard 2011). Intensive monitoring for *S. Enteritidis* through the use of drag-swab samples, when sampling from different locations: floors, nest boxes, egg belts, dropping belts, scrapers, fan blades and dust, is considered a very efficient approach and may lead to a high sensitivity detection of *Salmonella* (Davies and Breslin 2001; Kinde and others 2005; Gast 2007). Because many of the *Salmonella* serotypes are invasive, different tissues are often collected and further tested for detecting infected birds (liver, spleen, ovary, oviduct, testes, yolk sac, heart, heart blood, kidney, gall bladder, pancreas, synovia, and eye) (Gast and Beard 1990; Gast 2007). *Salmonella* infections are often a consequence of the pathogen's colonization of the intestinal tract, hence samples of intestinal tissues and contents (ceca and their contents) are often collected for evaluation and in some cases, a low-frequency recovery of *S. Enteritidis* may be possible for long periods of time (Gast and Beard 1990). In the end, egg culturing comes as a confirmatory step in many testing plans, but the detection of *Salmonella* inside eggs is very difficult due to the low incidence at which internal contamination occurs and the very low initial cell densities of salmonellae usually found in freshly laid eggs (Gast 2007). However, in the U.S.A., when an environmental test is positive for *S. Enteritidis*, the FDA Egg Rule (FDA 2009a) requires either continuing the egg testing or diverting eggs to a treatment that will result in at least a 5-log reduction in *S. Enteritidis*. Under the alternative of continuing the egg testing, 4 batches of 1000-egg samples must be tested at 2-wk intervals and if all 4 tests are negative, no further testing is required. Considering the E.U. regulations for laying hens flocks, for all *Salmonella* serotypes with public health significance, in the rearing period, 1-d-old chicks and pullets 2 wk before moving to laying unit must be tested for *Salmonella*, while during laying period, testing must be performed every 15 wk (EC 2003). Furthermore, eggs must not be used for direct human consumption (as table eggs) unless they originate from a commercial flock of laying hens subject to a national *Salmonella* control program.

When a flock has been tested positive for *S. Enteritidis* presence in the environment and the eggs, FDA's egg rule (FDA 2009a) requires that the poultry house in which this flock has resided needs to be cleaned and disinfected through 3 steps: the removal of visible manure, dry cleaning in order to remove dust, feathers and old feed and disinfection with spray, aerosols, fumigation or another appropriate disinfection method (FDA 2009a). During cleaning and disinfection, all the moveable equipment has to be displaced, in order to thoroughly clean all the space. Furthermore, rodent baits have to be placed and removed just prior to cleaning, and in addition, rodent entry sites have to be thoroughly repaired. The sanitation of water lines has to be performed 2 to 3 d prior to

placement of new layers, with water lines filled with an 1870-ppm citric acid solution and a thorough flush of the lines after 2 h. In a 2nd step, the water lines are filled with a 20-ppm chlorine solution and flushed thoroughly after 2 h, without any remaining smell of chlorine (FDA 2009a). The disinfection procedure has to include also an application of the disinfecting solution outside the poultry house, on a 10-foot perimeter.

Poultry facilities are often subjected to disinfection using chemical compounds (especially phenolic and quaternary ammonium ones), following the removal of waste materials and cleaning by high-pressure spraying (Gast 2007). Not only the chemical compounds are different in their efficacy against *Salmonella*. Davison and others (1996) evaluated the differences between 5 classes of disinfectants, with the use of well, stream or pond water, against *S. Enteritidis*. Their results suggested that the inability to remove *S. Enteritidis* from layer houses might in part be associated with the source of water.

Biosecurity is defined as “a program, including the limiting of visitors on the farm and in poultry houses, maintaining personnel and equipment practices that will protect against cross contamination from one poultry house to another, preventing stray poultry, wild birds, cats and other animals from entering the poultry houses, and not allowing employees to keep birds at home, to ensure that there is no introduction or transfer of *S. Enteritidis* onto a farm or among poultry houses” (FDA 2009a).

The current control programs applied in laying hens farms include the following recommendations: (1) to obtain the eggs and chicks only from breeding flocks proven to be *Salmonella* free; (2) to properly disinfect the hatching eggs and that hatching should take place under conditions of stringent sanitation; (3) to clean and disinfect thoroughly the poultry houses between flocks, using recommended procedures; (4) to incorporate rodent- and insect-control measures into the house design and management, and to document their implementation through periodic monitoring; (5) to implement rigidly enforced biosecurity practices, through the restriction of the personnel movement and control of equipment on the poultry-housing premises and between the houses; (6) to ensure that feed is pelleted and does not contain animal proteins; and (7) to ensure the microbiological quality of the water, through treated sources (Gast 2007; FDA 2009a).

The control of people and equipment is considered critical for preventing the introduction of *Salmonella* in the farm, among other pathogens. One of the most effective ways to control human traffic is the use of signs, fences and gates, while buildings should remain locked to the extent possible to ensure that the plans are followed. Nonfarm employees will receive special disposable or reusable clothing or coveralls, after reporting to a central location and signing a logbook before coming on the farm (FDA 2009a).

Sharing equipment is not recommended, but if this happens, it should be ensured that it is clean and disinfected between farms (FDA 2009a). Knape and others (2002) mention 2 general classes of commercial egg processing facilities, in-line and off-line. The in-line type refers to multiple houses connected by a common egg belt, while off-line type refers to eggs coming from houses not connected to the processing plant. Overall, the authors found that aerobic plate counts (APC) of eggs obtained from the in-line type of facility were higher in comparison to those obtained from the off-line one. Also, Musgrove and others (2012) determined the possibility of nest run egg carts to act as reservoir of *Salmonella*, with comparisons between an off-line facility and a mixed-operation one (with in-line processed eggs and supplementation with off-line ones). It appears that *Salmonella* prevalence in the off-line

facility (12%) was significantly different ($P < 0.001$) from the mixed-operations one (36%).

It is also necessary to limit the exposure of laying hens to different vectors of this pathogen, such as mice, insects and wild birds, to reduce the risk of *Salmonella* introduction in the flocks (Henzler and Opitz 1992; Davies and Wray 1995; Olsen and Hammack 2000; Mian and others 2002). The FDA Egg Rule (FDA 2009a) mentions that monitoring is essential in the control program of pests. Visual inspection and monitoring by mechanical traps or glueboards is the method to achieve satisfactory rodent control. As for flies, the use of spot cards, scudder grills or sticky traps will help evaluate the level of fly activity and interfere to achieve satisfactory control over them. Furthermore, the harborage of pests must be avoided through removal of debris within and outside the poultry house (FDA 2009a).

Holt and others (2011) consider that the different housing systems may influence the relative effectiveness of the biosecurity measures and the on-farm levels of potential *Salmonella* vectors, thus affecting the success of remediation and prevention methods. The interaction of laying hens with wildlife is increased in free-range housing systems, compared to aviaries or cage systems. In addition, the already contaminated soil can act as a persistent source of *Salmonella*, as it is very difficult to disinfect.

Vaccination

The control of *Salmonella* spp. infection in hen eggs includes various preventive measures, among the most frequently used being vaccination (Van Immerseel and others 2005b).

Active immunization is achieved by inoculation with microbial pathogens that induce immunity but do not cause disease, or with antigenic components extracted from the pathogens. When it is successful, a subsequent exposure to the pathogenic agent elicits an intensified immune response that will eliminate the pathogen or will prevent the disease mediated by its products (Goldsbey and others 2003). Many of the common vaccines currently used at a commercial level in poultry consist of inactivated (killed) or live, but attenuated, *Salmonella* spp. strains. Live vaccines generally confer better protection than inactivated ones, the former stimulating both cell-mediated and humoral immunities (Van Immerseel and others 2005b). Live vaccines have been successfully used in the E.U., showing their capacity to reduce the reproductive tract colonization and further on the internal egg contamination risk in laying hens. The vaccine strains were not detected in 1575 eggs from the vaccinated group, hence demonstrating the safety of the approach (Gantois and others 2006).

S. Enteritidis vaccines proved to be efficient in decreasing egg contamination and *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* colonization following challenges (Nakamura and others 1994; Cerquetti and Gherardi 2000a, 2000b; Liu and others 2001; Woodward and others 2002; Khan and others 2003; Van Immerseel and others 2005c). Different studies including *Salmonella* challenges on laying hens followed by vaccine administration proved that the risk of infection with *S. Enteritidis* as well as *S. Typhimurium* can be decreased via this approach (Table 1). Toyota-Hanatani and others (2009) assessed *S. Enteritidis* contamination of eggs laid by vaccinated (inactivated vaccine) and nonvaccinated flocks. More than 1600 *S. Enteritidis* cells/100 mL (most probable number—MPN) of liquid egg samples were isolated from the nonvaccinated flock. For the vaccinated flocks, the maximum value for MPN was 8/100 mL, the risk for a foodborne *S. Enteritidis* outbreak being considerably reduced.

Table 1—Different *in vivo* studies of the effects of *S. Enteritidis* vaccines in poultry.

Immunization way and type of vaccine	<i>Salmonella</i> challenge conditions	Observed effects	Reference
Single oral or intramuscular immunization with formalin-inactivated <i>S. Enteritidis</i> encapsulated in biodegradable microspheres	10 ⁹ CFU <i>S. Enteritidis</i> at 6 wk of age	Decrease of fecal shedding and organ colonization	Liu and others (2001)
Intramuscular immunization with <i>S. Enteritidis</i> PT4 bacterin (Salenvac)	5–7.5 × 10 ⁷ CFU <i>S. Enteritidis</i> at 8, 17, 23, 30, and 59 wk	Reduction of the number of tissues and fecal samples that were culture-positive Fewer positive eggs from vaccinated laying hens.	Woodward and others (2002)
Subcutaneous immunization of 9-wk-old chicken with 2 outer membrane proteins of <i>S. Enteritidis</i> , followed by 2 booster immunizations with time intervals of 2 wk	8 × 10 ⁸ CFU of <i>S. Enteritidis</i> virulent strain	~1000-fold decrease in cecal colonization	Khan and others (2003)
Oral immunization with 10 ⁹ CFU of a temperature-sensitive mutant of <i>S. Enteritidis</i> at 1, 2, 3, and 7 d	10 ⁹ CFU of a virulent <i>S. Enteritidis</i> strain at 14 d after the last immunization	Decrease of shedding and colonization of internal organs	Cerquetti and Gherardi (2000a)
Two sets of immunizations, combining oral and intraperitoneal ways with a temperature-sensitive mutant of <i>S. Enteritidis</i>	10 ⁸ CFU of <i>S. Enteritidis</i> and <i>S. Typhimurium</i> at 7 and 14 d after the last vaccination	Fewer bacteria recovered from the cecal contents, liver and spleen 14 d postchallenge	Cerquetti and Gherardi (2000b)
Immunization with oil-emulsion vaccine of a <i>S. Enteritidis</i> PT4 strain at 14 and 18 wk of age	10 ⁶ and 10 ³ cells of homologous <i>S. Enteritidis</i> strain	<i>S. Enteritidis</i> isolated from cecal droppings of fewer vaccinated hens	Nakamura and others (1994)

Atterbury and others (2009) aimed to determine the efficacy of a killed *Salmonella* vaccine and 3 live vaccines in preventing cecal colonization of pullets following a challenge with *Salmonella* Enteritidis PT4. There were no significant differences in the total number of positive birds between the groups given the different vaccines following a *Salmonella* challenge. Despite this, the group vaccinated with the killed vaccine contained the smallest number of birds with directly countable levels of *Salmonella* in their ceca ($\geq 10^2$ CFU/g), compared with the unvaccinated group and followed by the live vaccines' groups. The oral administration of a live vaccine to newly hatched chickens results in extensive gut colonization and strong adaptive immunity. In addition, a large presence of bacteria originating from a live *Salmonella* vaccine in the intestine can induce infiltration of polymorphonuclear cells into intestinal walls, conferring resistance to invasion and systemic spread of virulent *Salmonella* strains (Omwandho and Kubota 2010).

Purified-type1 *S. Enteritidis* fimbriae has been used as an antigen in a vaccine and triggered the presence of IgG and IgA in eggs and sera of immunized birds (De Buck and others 2004b). Intravenous vaccination of chickens with a *fimD* mutant of *S. Enteritidis* led to a lower contamination of eggs (De Buck and others 2004a). Immunization with vaccines containing outer membrane proteins (OMP) of *S. Enteritidis* also led to reduced intestinal mucosa colonization in laying hens (Khan and others 2003).

E.U. legislation provides different requirements for food industry stakeholders to apply, in order to reduce the risk of eggs contamination by *S. Enteritidis*. For this purpose, each E.U. country has implemented its own approved national control program, vaccination being one of the adopted measures. The national control programs aim to reduce the prevalence of the foodborne *Salmonella* serotypes. For all *Salmonella* serotypes with public health significance, sampling must be performed at specific moments during breeding and production phases. If the animals are vaccinated, immunological testing would not be performed. Also, “[. . .] eggs originating from flocks with unknown health status, suspected of being infected or being infected may be used for human consumption only if treated in a manner that guarantees the elimination of *Salmonella* serotypes with public health significance” (EC 2003). Through an amendment that modifies Regulation EC 2160/2003

“the eggs originating from flocks with unknown health status and suspected of or being infected with a serotype of *Salmonella* for which it has already been established a point of reduction or being the cause of a foodborne outbreak” are considered as eggs included automatically in class B (EC 2007b). As defined by the Commission Regulation EC no. 557/2007, class A eggs are those that meet the following characteristics: (a) shell and cuticle: normal shape, clean and undamaged; (b) air space: height not exceeding 6 mm, stationary and 4 mm for eggs marketed as “extra”; (c) yolk: visible on candling as a shadow only, without clearly discernible outline, slightly mobile upon turning the egg and returning to a central position; (d) white: clear translucent; (e) germ: imperceptible development; (f) foreign matter; and (g) foreign smell: not permissible. Class A eggs which no longer have the mentioned characteristics, may be downgraded to class B (EC 2007a)

They are marked as such and their introduction in packaging centers depends on the efficacy of applied methods for the prevention of a potential cross-contamination of the eggs coming from healthy flocks.

Vaccination is a mandatory measure used to fight against *Salmonella* in Austria, Belgium (for *S. Enteritidis*), The Czech Republic, Germany, and Hungary, while allowed and recommended in Bulgaria, Belgium (for *S. Typhimurium*) Cyprus, Estonia, France, Greece, Italy, Latvia, Lithuania, The Netherlands, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, and the United Kingdom (EFSA 2004; EFSA 2011). Denmark, Finland, Sweden, and Ireland have banned vaccination and developed efficient control programs for *Salmonella* spp. They rejected the use of vaccines also due to their potential interference with the results for serological tests (Murchie and others 2007; Kornschöber and others 2009). As an example, in Sweden, the national *Salmonella* spp. control program aims to reduce the prevalence of the bacterium by implementing different measures such as the quarantine of all imported poultry and the destruction of any imported birds that would be tested positive for any *Salmonella* spp. Sweden also uses sampling procedures according to E.U. legislation requirements, and the flocks are rapidly depopulated if positive. Also, any traced products on the market are immediately withdrawn. Additionally, there exists a specific control program for *Salmonella* spp. in feed production (Keery 2010).

Salmonellosis is not caused by *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* in Australia, these serotypes being reported as absent in layer flocks. Therefore, the application of a national control program against *Salmonella* has been considered not necessary.

In the U.S.A. (FDA 2009a) and Canada (Keery 2010) the use of vaccines to increase the resistance of birds against *Salmonella* spp. is encouraged. In Canada, the vaccination of the layer flocks introduced into a new house becomes highly recommended if the former flock was tested *S. Enteritidis*-positive (Health Canada 2011).

Passive immunization

Laying hens immunized with antigens from selected microorganisms (for example, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*) react by producing high quantities of specific antibodies (IgY) which are transported from the blood into the egg yolk. These eggs containing high levels of antigen-specific IgY, called hyperimmune eggs, can be administered as a feed additive (usually in the form of whole yolk powder) to other species to provide them with passive immunity (Chalghoumi and others 2009a). Chalghoumi and others (2008) have shown that it is possible to produce IgY against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* OMP in the same egg with concentrations of 429 ± 20 mg/g. Moreover, they demonstrated (Chalghoumi and others 2009b) that these specific antibodies have a growth inhibitory effect on *Salmonella* spp., in a concentration-dependent manner. They also assessed the ability of preventing adhesion of *Salmonella* spp. to intestinal cells by using human epithelial Caco-2 cell lines. The results demonstrated that specific IgY was able to reduce the decrease in transepithelial electrical resistance of the infected Caco-2 cell monolayers, blocking adhesion of *Salmonella* spp. in a concentration-dependent manner. Another study demonstrated that orally administered egg yolk antibodies induced a reduction of 13.3% of *Salmonella*-positive eggs (in an experimentally infected group), in comparison to 29.4% *Salmonella*-positive eggs in the group that did not receive the egg yolk powder. The antibodies were administered as a feed additive (3 g/hen/day), in the form of whole egg powder (Gürtler and others 2004).

The risk of the development of resistance phenomenon against these antibodies is highly limited (Xu and others 2011). Indeed, these are polyclonal antibodies, targeting multiple epitopes. Nevertheless, it has been pointed out that resistance phenomena can occur concerning vaccines (Sirsat and others 2009) and this is still a possibility concerning passive immunization even if weak, in our opinion. Sirsat and others (2009) also mentioned the risk of developing too specific tools with antibody therapy or vaccination, which could be particularly problematic for *Salmonella* spp. given the wide range of immunogenic serotypes. However, Chalghoumi and others (2008) observed a high cross-reactivity of anti-*S. Enteritidis* IgY with *S. Typhimurium* (ST)-antigen and *vice versa*. In this experiment, they used indeed OMP as vaccinal antigens; and both *Salmonella* spp. share common epitopes on OMP. Using antigens shared between several serotypes allow, thus, to cope with the risk of a too high specificity of the developed antibodies. Moreover, by developing IgY against 2 *Salmonella* serotypes in the same egg yolk, Chalghoumi and others (2008) left the door open for the further development of hyperimmune eggs targeting a diverse set of pathogens.

Natural antimicrobial products

Bacteriophages. Bacteriophages are bacterial viruses with the ability of using the bacterial cell to multiply. The mechanism of

the infectious cycle is used to differentiate the 2 main types of bacteriophages: the virulent ones (that determine lysis and death of the cell in a very short time) and the temperate ones (the latent, using lysogeny in their infectious cycle). Virulent bacteriophages are used in different products destined to reduce foodborne pathogens in foods (Monk and others 2010). Bacteriophages are highly discriminatory, most of them interacting with a specific set of bacteria that express specific binding sites (Joerger 2003).

Using a combination of 3 different *Salmonella*-specific bacteriophages to reduce *S. Enteritidis* colonization in the ceca of laying hens resulted in a significant reduction of the incidence, up to 80%. The cocktail of the 3 bacteriophages was administered via spray at 6 d of age, using a multiplicity of infection of $10^{(3)}$ plaque-forming units. The birds were experimentally infected by oral inoculation with 2.95×10^5 CFU/mL of *S. Enteritidis*, at 7 d of age. At 14 d, *S. Enteritidis* counts in the ceca of control group hens reached 1.56×10^5 CFU/g, while for the bacteriophage-treated group only 9.48×10^3 CFU/g (Borie and others 2009) (Table 2). Additionally, the same study assessed the ability of a combination between a bacteriophage and a competitive exclusion product to reduce cecal colonization by *S. Enteritidis*. The results revealed that this combination treatment was even more efficient (1.6×10^2 CFU/g), compared to the use of bacteriophages alone.

Toro and others (2005) also showed that the use of a “cocktail” of bacteriophages, in a dose of 5.4×10^6 PFU/0.5 mL/bird, on White Leghorn chickens challenged at day 7 with *S. Typhimurium* (suspension of 0.5 mL with 2.4×10^5 CFU/mL) determined a decrease of ileum colonization with this pathogen. The ileum samples collected from bacteriophage-treated chickens showed significantly lower *S. Typhimurium* counts (1.1 CFU/mL) than challenged and untreated ones (81.8 CFU/mL) (Table 2).

Tailspike protein of bacteriophages is a component of the tail apparatus with the role of mediating the specific recognition of its bacterial host by binding to its surface structures. After oral administration to 1-d-old Leghorn chickens, it resulted in a significant delay of *Salmonella* spp. growth and colonization and a significant reduction of *Salmonella* spp. counts at the level of the ceca, liver, and spleen, in comparison with control groups (Waseh and others 2010). According to these authors, their efficacy depends on their degree of resistance to gastrointestinal proteases.

Generally regarded as safe, bacteriophages are considered a highly efficient tool for the biocontrol of pathogens in food products (Garcia and others 2008). Phage therapy can be successfully applied to reduce the *S. Enteritidis* level on poultry carcasses after slaughter (Higgins and others 2005a, 1997). In spite of their high specificity, bacterial resistance has been encountered. Resistance to bacteriophages occurs when losses or modifications of bacterial cell surface molecules (like the LPS, pili, or flagella) take place, those being used usually as receptors (Levin and Bull 2004). However, bacteriophages possess the ability to change rapidly in response to the emergence of bacteria-resistant mutants (Sulakvelidze and others 2001; Carvalho and others 2012). Therefore, the use of different bacteriophages in what is called a “cocktail” has been found necessary even to fight against a single bacterial strain (Joerger 2003).

Protein and fiber sources. Kassaify and Mine (2004a) demonstrated that nonimmunized egg yolk powder could suppress the colonization of *S. Typhimurium* in laying hens (Table 2). The nonimmunized egg yolk powder was prepared as it follows: the eggs were cracked after disinfection of the exterior shell surface and the egg yolks were aseptically separated from the albumen; the pooled yolks were freeze-dried and crushed into a fine

Table 2—Different *in vivo* and *in vitro* studies concerning natural antimicrobials on laying hens and broilers for reduction of *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* colonization in different organs and tissues.

Type of natural antimicrobial used	<i>Salmonella</i> challenge conditions	Observed effects	Reference
A cocktail of 3 bacteriophages administered via spray at 6 d of age, at a dose of 10^3 plaque forming units	Oral inoculation with 2.95×10^5 CFU/mL of <i>S. Enteritidis</i> at 7 d of age	Cecal counts drop to 9.48×10^3 CFU/g, in comparison to 1.56×10^5 CFU/g for the control group	Borie and others (2009)
Oral administration of 3 doses of tailspike proteins of bacteriophages with 10% BSA ^a at 1-d-old age in 2 protocols: at 1 h, 18 h, and 42 h (Protocol 1) and at 18 h, 42 h, and 66 h (Protocol 2)	Oral gavage with 10^4 – 10^7 <i>Salmonella</i> /300 μ L PBS ^b at 2 d of age	Significant reduction of <i>Salmonella</i> in the ceca, liver, and spleen in both protocols	Waseh and others (2010)
A cocktail of bacteriophages in a dose of 5.4×10^5 CFU/mL/bird at the age of 1 d	Oral administration of a suspension containing 2.4×10^5 CFU/mL of <i>S. Typhimurium</i> at day 7	Decrease of <i>S. Typhimurium</i> counts in the ileum	Toro and others (2005)
Feed supplemented with nonimmunized egg yolk powder at 10% concentration (wt/wt) for 4 wk, beginning at the age of 1 d	Oral administration of 1.0 mL of 10^9 CFU/mL <i>S. Typhimurium</i> 2 times at the end of the 4-wk period	No detection of <i>S. Typhimurium</i> in any organs from the egg yolk powder treated group; 3.1 to 4.0 log ₁₀ cfu in the sampled organs (intestine, ovary, and oviduct) of the positive control group.	Kassaify and Mine (2004a)
90% of alfalfa and 10% basal diet (1), 90% alfalfa + 10% basal diet with 0.375% FOS (2) and 90% alfalfa + 10% basal diet with 0.75% FOS (3) at the age of 1 d	Crop gavage on day 4 with 1 mL of inoculum containing 10^5 CFU of <i>S. Enteritidis</i> phage type 13a	Reduction of ovary and spleen colonization by <i>S. Enteritidis</i> for FOS-containing diets' method when compared to feed withdrawal	Donalson and others (2008a)
Product containing 10^{10} viable spores of <i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> (powder feed additive) included at 0, 20 or 100 mg/kg of feed at the age of 1 d	Oral suspension containing 2×10^8 CFU <i>S. Enteritidis</i> /mL administered at day 7	3 wk p.i. 38% of the treated birds positive for <i>S. Enteritidis</i> (63% in the control group)	Vilà and others (2009)
1 g of <i>Saccharomyces boulardii</i> /kg feed (trial 1) and 100 g of the same product/kg feed (trial 2) administered to 1-d-old broiler chickens	Oral gavage on day 4 with 3.3×10^8 <i>S. Typhimurium</i>	Reduction of <i>S. Typhimurium</i> colonization frequency from 70% in the control group to 20% and 5% in trial 1 and trial 2, respectively	Line and others (1998)
Acidifier in a dose of 1.5 kg/t of feed (A) or 3.0 kg/t of feed (B) on 1-d-old chicken	Crop inoculation at 3-d-old with 0.1 mL of <i>S. Enteritidis</i> suspension containing 1.3 – 3.3×10^9 CFU/mL.	Reduction to 3.47 log CFU/g <i>S. Enteritidis</i> in cecal contents for dose B and 4.59 log CFU/g <i>S. Enteritidis</i> for dose A, compared to 5.06 log CFU/g <i>S. Enteritidis</i> in control group	Sterzo and others (2007)
Aromatic product composed of eugenol (250 ppm) in an amorphous SiO ₂ inert carrier, administered as feed additive 1st at 15-wk-old, during a 3-wk period	Inoculation into the crop of 1 mL (single dose), containing 3.2×10^7 CFU <i>S. Enteritidis</i> at 18 wk of age	Isolation of <i>S. Enteritidis</i> after 2 wk p.i. in feces and 3 wk p.i. in eggs; positive results in liver, spleen, and ovary 15 d p.i. but negative at 29 d p.i.	Ordoñez and others (2008)
Dietary capsaicin at doses of 18 ppm (A) and 36 ppm (B) administered in feed, for 28 d, beginning at the age of 1 d	Challenge on day 27 with 10^8 CFU/mL of <i>S. Enteritidis</i>	Reduction of <i>S. Enteritidis</i> colonization in liver and spleen for both groups (A – 56.67%; B – 43.33%); control group (feed without capsaicin) – 76.67%.	Vicente and others (2007)

^aBovine serum albumin.^bPhosphate buffer solution.

p.i. = postinoculation.

powder. Following infection with 10^9 CFU of *S. Typhimurium* per bird, the addition of 5.0, 7.5, and 10.0% (wt/wt) nonimmunized egg yolk powder to the feed rapidly decreased the number of *S. Typhimurium* in feces samples. Indeed, the counts reached 10% of the initial values, after only a week, with a significant difference in comparison to the positive control group (nonsupplemented feed). Moreover, after 2 wk of feeding egg yolk powder at a dose of 10.0%, *Salmonella* was completely undetected.

In another research study, Kassaify and Mine (2004b) demonstrated that at a concentration as low as 5% (wt/wt) in the feed, nonimmunized egg yolk powder eliminated *S. Enteritidis* at the intestinal level after the 1st week, demonstrated by the negative results obtained for the tested fecal samples.

This may be explained by the presence of components such as high-density lipoproteins (Kassaify and others 2005) or sialyloligosaccharides and their derivatives (Sugita-Konishi and others 2002).

Competitive exclusion flora, probiotics, prebiotics, and organic acids. The use of competitive exclusion flora, probiotics, prebiotics, as well as acid-based products, have been widely investigated

worldwide as preventive methods for *Salmonella* spp. colonization in poultry (Seo and others 2000; Van Immerseel and others 2002; Wagner and Cerniglia 2005; Donalson and others 2008b; Dunkley and others 2009).

Competitive exclusion products involve the introduction of intestinal bacteria from mature healthy poultry to newly hatched chickens, the concept being defined as “the early establishment of an adult intestinal microflora to prevent subsequent colonization by enteropathogens.” The mechanism used by the bacterial species from the competitive exclusion products to inhibit the proliferation of other bacteria consists of creation of a restrictive physiological environment (for example, bacteriostatic effect of VFA in the ceca). Added to this are the following: competition for bacterial receptor sites, elaboration of antibiotic-like substances (such as bacteriocins), and depletion of or competition for essential substrates (Schneitz and Mead 2000; van der Wielen and others 2000; Joerger 2003; Callaway and others 2008).

Competitive exclusion products represent a mix of different bacterial species, usually derived from cecal contents and/or wall of healthy domestic fowl. Several products have been evaluated as

competitive exclusion cultures. Schneitz (2005) and Schneitz and Mead (2002) mention a wide variety of such products. Several of them consist of unrefined mixed cultures of whole cecal contents from adult chickens, while others contain selected mixed cultures, with addition of cecal walls scrapings, including identified genera of bacteria, efficient against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* cecal colonization. Because most of them include a mix of not entirely determined bacteria, isolated from the avian gut, and in spite of their proved effectiveness, the uncertainty concerning their composition is reducing the rate of their use in the egg and broiler meat production sector (Van Immerseel and others 2005b).

A probiotic is defined as “a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance” (Fuller 1989). A variety of microbial species have been used as probiotics, including species of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* as well as a variety of yeasts (Patterson and Burkholder 2003). The potential mechanisms that allow the exclusion of pathogenic species, among them *S. Enteritidis*, by the probiotics include competition for adhesion sites and nutrients or production of antimicrobial compounds, such as bacteriocins, VFA, or hydrogen peroxide (Erwing 2009; Vandeplass and others 2010). Besides the inhibition of cecal colonization by pathogens, it has been demonstrated that probiotic bacteria determined an increase of the oxidative burst capacity and degranulation of heterophils isolated from chicks 24 h after probiotic administration. This suggests a possible activation of the innate immune system (Farnell and others 2006).

In poultry (laying hens and broilers), bacteria of the genus *Lactobacillus* have been frequently studied for its effects on reducing or inhibiting *Salmonella* cecal colonization (Gusils and others 1999; Pascual and others 1999; Jin and others 2000; Tellez and others 2001; Ammor and others 2007; Lima and others 2007). It has been suggested that lactobacilli isolated from either cloaca or vagina of laying hens present *in vitro* inhibitory activity against *S. Enteritidis*, with no differences noticed between those isolated from the cloaca and the ones from the vagina (Miyamoto and others 2000). Van Coillie and others (2007) have also demonstrated that lactobacilli isolated from the cloaca and the vagina of laying hens inhibited *Salmonella* growth *in vitro* and decreased *S. Enteritidis* colonization *in vivo*. *Salmonella* inhibition was shown to depend on the species of *Lactobacillus*, correlated to some extent with the production of lactic acid of each.

Another probiotic with potential use in laying hens is based on an active ingredient consisting of *Bacillus cereus* var. *toyoi* spores (EC 2001; Tellez and others 2012). Its efficacy against *S. Enteritidis* has been demonstrated on poultry by Vilà and others (2009) (Table 2). They challenged laying hens with a *S. Enteritidis* suspension containing 2×10^6 CFU/mL for trial 1 and 2×10^8 CFU/mL for trial 2, respectively. The product containing 10^{10} viable spores was administered as feed additive in concentrations of 20 mg/kg (trial 1) and 100 mg/kg (trial 2). The results showed that *S. Enteritidis* was not detected in the probiotic-administered groups, while for the control group, 42% of the birds were positive. These authors suggested that the product encourages the proliferation of *Lactobacillus* spp., improving the balance of the intestinal microflora.

Yeasts were also studied for their potential to act as probiotics in poultry, against pathogens like *Salmonella* spp. Line and others (1998) showed that including *Saccharomyces boulardii* reduced the frequency of cecal colonization from 70% in the positive control broilers to 20% and 5%, respectively (2 trials) (Table 2). The possible mechanism to reduce the cecal colonization of such pathogens could be the possibility for the yeast to act as a pathogen-adherent

microflora, due to the mannose content of *Saccharomyces boulardii*'s cell wall, with potentially successful use in egg production sector. Another mechanism was suggested by Pontier-Bres and others (2012) who revealed that *Saccharomyces boulardii* was able to modify *S. Typhimurium* motility and trajectory, registering a decrease in its invasion properties.

Another option as a preventive method is the use of prebiotics. They can be regarded as an integrated approach to an improvement of food safety, starting with the maintenance of a healthy intestinal ecosystem (Gaggia and others 2011). Among the beneficial effects of prebiotics these can be mentioned: stimulation of the immune system, reduction of inflammatory reactions, toxin inactivation, modification of the intestinal microbiota, increased production of VFA, and prevention of pathogen colonization (Patterson and Burkholder 2003; Revollo and others 2006; Salminen and others 2010).

Prebiotics are not digested or metabolized, or they are metabolized very little, during their passage through the upper portion of the gastrointestinal tract (GIT). Therefore, they enter the ceca without any change to structure, being fermented by the colonic flora. Through the stimulation of bifidobacteria, they may have the ability to inhibit pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. (Grizard and Barthelemy 1999; Doyle and Erickson 2006; Vandeplass and others 2010). Lactose (Ziprin and others 1993), fructooligosaccharides (FOS) (Fukata and others 1999), mannanoligosaccharides (MOS) (Fernandez and others 2002), and isomaltoligosaccharides (Chung and Day 2004) are highly effective prebiotics already applied in the broiler chicken industry for the inhibition of *Salmonella* spp. cecal colonization. It has been shown that FOS are highly effective in reducing chicken intestinal colonization by *Salmonella* spp., by exerting a preferential stimulatory effect on several bacteria of 2 health-promoting genera (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.), while maintaining populations of potential pathogens at relatively low levels (Xu and others 2003). During an *in vitro* fermentation test, cecal contents collected from laying hens were diluted to a 1:3000 concentration with an anaerobic dilution solution and added to serum tubes filled with ground alfalfa or a layer ration with or without FOS, the latter as a prebiotic. The concentrations of VFA and lactic acid were quantified at 6 and 24 h of substrate fermentation. The results showed a greater production of VFA and lactic acid compared with the layer ration. The amendment of FOS to both alfalfa and the layer ration appeared to further increase fermentation, with a more pronounced effect after 24 h of fermentation (Donalson and others 2008a).

Kaplan and Hutkins (2000) also showed that different species of *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*) as well as *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*) were able to use FOS in a FOS-MRS broth. Fernandez and others (2002) showed that laying hens' diets supplemented with MOS resulted in a decrease in *S. Enteritidis* hen cecal contents over time, by increasing the *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. levels.

However, more recent studies have focused on investigating prebiotics' efficacy during the molting period, as this practice has been proven to increase to some extent laying hens' susceptibility to *Salmonella* infections (Donalson and others 2008b) (Table 2). Adding FOS to a combination of 90% alfalfa and 10% layer ration, in 2 levels (0.750% and 0.375%) resulted in a reduced ovary and liver colonization by *S. Enteritidis*, while the counts decreased significantly. It appears that between the 2 doses used for FOS administration, the authors consider as sufficient the lower one.

Due to the ability of prebiotics to stimulate some beneficial microflora populations such as bifidobacteria (Šušković and others 2001; Vandeplass and others 2010) another approach was developed. Synbiotics are combinations of probiotic strains and prebiotic substrates, their use being regarded as a way of stabilization and/or improvement of the probiotic effect. The combination is thought to be able to improve the survival of the probiotic microorganism, because its specific substrate is readily available for its fermentation (Collins and Gibson 1999). Nisbet and others (1993) showed that by using a combination of mixed cecal microflora continuous flow culture a reduction of $1.75 \log_{10}$ *S. Typhimurium* colonization in chicken was observed; by using 5% dietary lactose as a prebiotic, the decrease was $2.98 \log_{10}$. A combination of the 2 succeeded in reducing the cecal colonization by $4.27 \log_{10}$, suggesting the success of these combined approaches.

It is also possible to decrease egg contamination risk by adding organic acids to the feed or drinking water at an appropriate time (Thompson and Hinton 1997). Van Immerseel and others (2007) have extensively described the mechanisms involved in organic acids' activity. The effect of feed with added organic acids (commercial blend) in a quantity of 3 kg/ton of feed represented an efficacious and cheap prevention method for cecal colonization by *S. Enteritidis* in a challenge experiment with laying hens (Sterzo and others 2007) (Table 2).

Butyric acid is the most frequently used organic acid as a feed or drinking water additive. The efficacy of butyrate in powdered form and sodium salt of n-butyric acid (30%) in microencapsulated (coated) form was assessed 3 d after inoculation with *S. Enteritidis*, during 2 trials that included young layer chickens and broilers. The studied parameters were cecal and internal organ colonizations. The results showed that coated butyric acid was superior to uncoated butyric acid in reducing *S. Enteritidis* colonization on both trials (Van Immerseel and others 2005a, 2007). Foster (2001) showed *in vitro* that organic acids determine acid resistance in *Salmonella* spp. through a complex process of pH homeostasis induction. Indeed, it had already been shown that for *S. Typhimurium* the exposure to short-chain fatty acids (SCFA) increased to some extent the virulence of this pathogen by increasing its acid resistance (Kwon and Ricke 1998; Sirsat and others 2009). The induction of an acid tolerance response involves growth of the acid-sensitive microorganisms in a moderately low pH environment. This subsequently leads to survival when the species is suddenly exposed to what would normally be considered lethal acidic conditions, thus protecting *Salmonella* spp. against the effects of organic acids (Ricke 2003). Van Immerseel and others (2006) also showed that SCFA can regulate the invasive phenotype of *Salmonella* spp., and that preincubation of *Salmonella* with SCFA increased acid resistance and survival in macrophages. The same authors mentioned that medium-chain fatty acids possess even greater bacterial activity against *Salmonella* spp. than the SCFA. Considering the latter, Durant and others (2000) assessed the expression of 2 transcriptional regulators of SPI-1, *hilA*, and *invF*, needed for host tissue invasions. Growth rates of *Salmonella* spp. were reduced by increasing the SCFA concentrations at pH 6, but not the same happened at pH 7. The pH-dependent manner of induction suggested that entry of SCFA into the host cells is necessary; these fatty acids possibly serve as an environmental signal that triggers the expression of invasion genes in poultry GIT.

Essential oils. Many studies performed until now on the possibility of using essential oil (EO) as active antimicrobial ingredient in animal feed *in vivo* or *in vitro*, showed high variability in the

results obtained. An overview on the potential of EOs in poultry production and their possible modes of action, among them antimicrobial activity, has recently been published by Brenes and Roura (2010).

An EO is "a mixture of fragrant, volatile compounds, named after the aromatic characteristics of plant materials from which they can be isolated" (Lee and others 2004). Being already known that EOs are more active against Gram-positive bacteria, in comparison to Gram-negative ones, it has been shown *in vitro* that cinnamaldehyde (obtained from cinnamon) moderately inhibits *L. acidophilus* and *B. longum* (Lee and Ahn 1998). This could suggest the existence of an undesired effect on the gastrointestinal microflora. However, Lee and others (2004) suggested that the selective inhibition shown by the cinnamaldehyde on pathogenic intestinal bacteria may have a pharmacological role in balancing the intestinal microflora. In addition, Ouwehand and others (2010) showed that potentially beneficial bacteria (such as *Bifidobacterium* spp.) are resistant or only a little susceptible to the majority of EOs tested *in vitro*. On the contrary, these authors proved that *L. fermentum* or *B. breve* were stimulated in their growth by several EOs (Ouwehand and others 2010).

Helander and others (1998), and afterwards Cosentino and others (1999), evaluated the minimum inhibitory concentrations (ppm) for 3 different EOs against *S. Typhimurium* during *in vitro* studies. Carvacrol (obtained from oregano and thyme) showed values of 150 and 225 ppm, respectively, cinnamaldehyde showed a level of 396 ppm (with no value offered by Cosentino and others 1999) and thymol (obtained from common thyme) showed values of 150 and 56 ppm, respectively. O'Bryan and others (2008) reported the antimicrobial activity of orange EOs against *Salmonella* spp. (including *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*), using the disc diffusion assay. The most effective orange EOs were composed mainly of d-limonene (94%) and myrcene (about 3%). Moreover, Johny and others (2008) have shown *in vitro* efficacy of trans-cinnamaldehyde, a safe ingredient obtained from cinnamon, against *S. Enteritidis* that could possibly be added to chicken drinking water. Chao and others (2000) showed that the essential oils extracted from cinnamon were effective against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Ouwehand and others (2010) showed the same. They evaluated 13 different essential oils for the ability to inhibit the growth *in vitro* of several bacteria species, among them *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium*. All 3 serotypes were significantly inhibited when using the maximum level of EOs (500 mg/L). The most effective EOs against these were carvacrol, cinnamaldehyde, citral, and thymol.

Ordóñez and others (2008) concluded that, in commercial production layers, eugenol (obtained from clove) seems to aid in the cleaning of intestinal and systemic infections, thus playing an important role in the control of *S. Enteritidis* cross-contamination of table eggs. Finally, Vicente and others (2007) observed in laying hens the prophylactic effect of capsaicin (obtained from chili peppers) in an experimental *S. Enteritidis* infection (Table 2).

The efficacy of EOs against foodborne pathogens depends on the active molecule, on the targeted pathogen, but it must be mentioned that the chemical composition of EOs can greatly vary for a particular plant species. This depends on the part of the plant, the geographic origin, and the harvesting period in a year or even in a day. This may be a possible explanation for the variability of the results obtained from one experiment to another. Moreover, whole EOs can have greater antimicrobial activity than their major isolated constituents can. As an example, antimicrobial activity of allyl sulfur compounds of garlic oil was shown to increase with

each additional sulfur atom, suggesting that the effect is a result of synergy among the different compounds. Therefore, the antimicrobial activity of garlic oil may be more powerful than the activity of its main compounds individually (Calsamiglia and others 2007).

The possibility for a foodborne pathogen to develop resistance to EOs exists. Ultee and others (2000) observed a decrease of sensitivity of *B. cereus* toward carvacrol. The cause of this decrease was believed to be the growth of this pathogen in the presence of nonlethal carvacrol concentrations. However, the risk of resistance development against EOs is still extremely rare (Sirsat and others 2009).

Considering the possibility of a change in odor and palatability of the EO-supplemented rations, Windisch and others (2008) suggested that the use of phytochemical feed additives, a series of botanicals already containing EOs, improved feed flavor and enhanced hen production performance. This leads to a potential conclusion that EOs may modify in a positive way the organoleptic characteristics of feed, therefore no decreases in ingestion should occur.

Bacteriocins. Bacteriocins are proteins, produced by some bacteria, that act against other closely related bacteria. The family of bacteriocins includes a large diversity of proteins differing in size, the microbial target, and mode of action. Two main groups can be distinguished: those produced by Gram-positive bacteria and the ones produced by Gram-negative bacteria (Gordon and others 2007; Heng and others 2007).

Most of the bacteriocins differ from classical antibiotics through their ribosomal origin and their great specificity (Riley and Wertz 2002a, 2002b). Bacteriocins may possess a bactericidal or bacteriostatic mode of action on sensitive pathogens, depending on the dose and degree of purification, physiological state of pathogen (growth phase), and experimental conditions. The majority of bacteriocins uses membrane permeabilization or interferes with essential enzymes to cause cell death (Peschel and Sahl 2006; Pithva and others 2011). For example, nisin forms a complex with ultimate cell wall precursor lipid II, a hydrophobic carrier of peptidoglycan monomers (Dias Paiva and others 2011). Further, it uses this compound as a docking molecule for its pore-forming activity, leading to the inhibition of bacterial cell wall biosynthesis. In addition, nisin is able to induce a rapid efflux of ions or cytoplasmic solutes such as amino acids and nucleotides. The concomitant depolarization of the cytoplasmic membrane determines an instant termination of all biosynthetic processes (Wiedemann and others 2001).

As antimicrobials, bacteriocins may be used as food preservatives or feed additives. Hereafter, we will develop only the feed additive aspects.

Bacteriocins are often considered more natural in contrast to antibiotics, as they are thought to have been present in many of the foods eaten since ancient times (Cleveland and others 2001). Also, bacteriocins are produced by lactic acid bacteria, which have been demonstrated to be beneficial for human health (Joerger 2003). Therefore, they can be used without risk in food-producing animals, their application being consistent with consumer demand for natural food products.

Gram-negative bacteria are less sensitive to bacteriocins than the Gram-positives. However, microcins—bacteriocins produced by *Escherichia coli* strains—which are smaller than colicins possess the capacity to inhibit Gram-negative bacteria (Diez-Gonzalez 2007). Microcin J25, for example, is active against *Salmonella* spp., including *S. Enteritidis* (Portrait and others 1999). Microcin J25 is highly resistant to digestive proteases and could affect the gastrointestinal microbiota, when ingested in feed (Galvez and others 2010). On

the other hand, a chymotrypsin-susceptible microcin J25 variant may be used as a food preservative (Pomares and others 2009) in combination with other hurdles. Line and others (2008) demonstrated *in vitro* (the spot test) strong antibacterial properties of a bacteriocin produced by enterococci (an enterocin)—E-760—against a broad spectrum of foodborne Gram-negative or Gram-positive pathogens, including *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. Svetoch and others (2008) observed that oral administration of bacteriocins E 50–52 in chicken feed resulted in a significant reduction of *S. Enteritidis*, at the cecal level, but also in the liver and the spleen, while enumeration of lactic acid bacteria was not significantly different in the ceca of both treated and untreated groups. Therefore, it is expected that the results obtained for chickens could be applied to laying hens also.

The modes of action of bacteriocins are complex and not fully understood. Most of them act in different ways to inhibit or kill sensitive bacteria (Rossi and others 2008). It is the reason why development of pathogen strains which manifest resistance to antimicrobial peptides has been considered difficult, if not impossible (Hancock and Chapple 1999; van't Hof and others 2001). However, Lin (2009) and Sirsat and others (2009) mentioned the factual resistance to bacteriocins (nisin) through the altering of target bacterial cell surface receptors.

In order to reduce the cost of bacteriocins to a price that any producer could afford, Lin (2009) considers necessary an improvement in the production process. In addition, Gaggia and others (2011) suggested that the use of bacteriocins-producing lactic acid bacteria would have more advantages, considering the cost also, than using purified bacteriocins alone. The application of pure bacteriocins in food may present reduced efficacy, as they could bind to food components.

Despite the promising results obtained with the use of bacteriocins, more research on combinations of bacteriocins or on associations between bacteriocins and other treatments is needed.

Postharvest Methods for Reducing the Risk of Salmonellosis Due to Contaminated Shell Eggs Consumption

Shell eggs storage and prevention of growth and multiplication of *Salmonella*

Prompt refrigeration to temperatures capable of restricting microbial growth has been recommended as an approach to reducing the likelihood that contaminated eggs will transmit *S. Enteritidis* to humans (Gast and Holt 2000).

In 2000, FDA published a final rule in the Federal Register (65 FR 76092), which states that a proposed maximum ambient temperature of 7.2 °C (45 °F) would extend the effectiveness of the egg's natural defenses against *S. Enteritidis* and would slow the growth rate of this foodborne pathogen (FDA 2000). In the Final Egg Rule (FDA 2009a), this proposition is maintained, as it is specified that this maximum value needs to be applied not only during storage, but also during transport, beginning 36 h after the time of lay. As an exception, shell eggs may be stored at ambient temperature values (above 7.2° C) if they are directed to a following step of processing, but not for more than 36 h. However, refrigeration must be kept even when using ionizing radiation (which results in only 2 to 3 logs reduction of *S. Enteritidis*), as this procedure is not regarded as efficient as the use of pasteurization (which ensures a 5 log reduction of *S. Enteritidis*) (FDA 2009b).

In Canada, shell eggs and those sent to a processing station must be kept under refrigeration, or stored for a maximum of 6 d at storage temperatures of 20 °C or less, or stored for a maximum

of 2 d at temperatures between 20 °C and 30 °C (Health Canada 2011).

Concerning cold storage of eggs in the E.U., EC Commission Regulation 589/2008 specifies that “[...] eggs should be stored and transported at a constant temperature, and should in general not be refrigerated before sale to the final consumer [...]” (EC 2008). Nevertheless, it has been shown that *Salmonella* spp. growth inside the egg is influenced by storage temperature.

Research in this field has proved that ambient temperatures are not proper for the storage of shell eggs, especially since the risk of *S. Enteritidis* horizontal transmission has increased, and further on, due to its capacity of growth and multiplication inside the shell eggs. Martelli and Davies (2012) suggested that the temperature values for shell eggs storage should not exceed 20 °C. In egg albumen, *Salmonella* spp. can grow at 20 °C, while unable to grow at temperatures below 10 °C, therefore showing that a temperature value for optimal storage of eggs should not exceed this last value.

Foodborne pathogens such as *S. Enteritidis* can grow in the contents of naturally contaminated eggs at room temperature (20 °C) and it does not lead to changes in the color, smell and consistency of the egg contents. However, the multiplication of *S. Enteritidis* in the stored eggs appears to be associated with alteration of the yolk membrane, which allowed the bacterium to either invade the yolk or obtain nutrients from it (Humphrey and Whitehead 1993).

Cogan and others (2001) reported *S. Enteritidis* growth after 8 d at 20 °C in 7% of the whole eggs inoculated in the albumen near the shell with as few as 2 CFU. If the inoculum equaled or exceeded 25 CFU/egg when eggs were subsequently stored at 20 °C, or 250 CFU/egg when eggs were stored at 30 °C, high levels of growth of *Salmonella* in the egg occurred significantly more frequently than when the inoculum dose was smaller (Cogan and others 2001).

Chen and others (2005) compared the storage of table eggs at 4 °C, 10 °C, and 22 °C. The albumen was inoculated with 10^2 , 10^4 , and 10^6 *S. Enteritidis* cells. At 22 °C, for all examined concentrations of inoculum, *S. Enteritidis* was able to grow, while at 4 °C and 10 °C, its growth was inhibited, regardless of the initial concentrations used. The authors believe that storage at 4 °C and 10 °C postponed the aging process of the eggs, preserving the antimicrobial agents of the albumen, and maintaining the integrity of the vitelline membrane.

Gast and Holt (2000) determined the extent to which small numbers of *S. Enteritidis* could grow to more dangerous levels at different temperatures over a period up to 3 d. Their intention was to stimulate the potential opportunities for *S. Enteritidis* multiplication following oviposition and prior to the achievement of internal temperatures able to prevent further microbial growth in eggs. Their results showed that extensive multiplication of *S. Enteritidis* was less frequently observed at lower inoculum dose (0.1 mL containing 15 CFU of *S. Enteritidis*), shorter storage time (1 d) and lower temperatures (10 °C and 17.5 °C). At 25 °C, with higher inoculum dose (0.1 mL containing 150 CFU of *S. Enteritidis*) and longer storage time (2 and 3 d), a rapid and substantial multiplication of the foodborne pathogen occurred. The inoculation site influenced in a great extent *S. Enteritidis* multiplication, since they used 4 types of samples: yolks (internally inoculated), albumens, whole egg, inoculated at the albumen edge and whole eggs inoculated at the yolk surface. In the yolk, multiplication occurred rapidly, with *S. Enteritidis* numbers reaching $8.7 \log_{10}/\text{mL}$, at 25 °C, after only 2 d of storage. On the contrary, it was confirmed that the albumen is not a good growth medium for bacteria, since the *S. Enteritidis* levels suffered only a slight

change during storage. The whole eggs inoculated at the yolk surface presented increasing levels of *S. Enteritidis*, during storage (no matter the dose and the storage time and temperature), while the other category of whole eggs (inoculated on the albumen edge) revealed only a slight change in these levels (Gast and Holt 2000).

It is believed that *Salmonella* cells that are deposited in the albumen are able to migrate to and penetrate through the vitelline membrane, in the egg, postlay, in order to reach the yolk and thus gain access to a pool of nutrients that are necessary for its survival and growth (Baron and others 1997; Gantois and others 2009).

Braun and Fehlhaber (1995) studied the migration of *S. Enteritidis* from the albumen into the egg yolk. Different doses of *S. Enteritidis* PT 4 were inoculated on the albumen (10 to 200 bacterial cells/albumen). Storage took place at 7, 12, 20, and 30 °C for 4 wk. The results showed that *S. Enteritidis* was able to migrate from the albumen into the egg yolk during storage. The risk of egg yolk penetration was relatively low at 7 and 12 °C. However, after 14 d, at 7 °C, the 1st positive egg yolk was found. At 20 and 30 °C, the 1st positive egg yolks were already present after 1 or 2 d. Schoeni and others (1995) also observed that the temperature values of < 10 °C will not allow but a sporadic growth of *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* and *S. Typhimurium* in the inoculated eggs, no matter the inoculum size.

Earlier, Hammack and others (1993) showed that the growth of *S. Enteritidis* on artificially inoculated shell eggs was negligible in eggs refrigerated up to 16 d. On the contrary, the population level of this food borne pathogen increased by more than $8 \log_{10}$ units in unrefrigerated eggs stored for the same amount of time. Lock and Board (1992) observed that when inoculating different *Salmonella* serotypes, among them *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Infantis*, on egg albumen, their persistence *in vitro* was different during storage at 3 different temperatures: 4, 20, and 30 °C. The majority of serotypes remained viable but did not increase in numbers at 20 and 30 °C, for 42 d. At 4 °C, many of the serotypes died. At 20 °C, upon inoculation with $39 \text{ CFU}/\text{mL}^{-1}$ albumen, both *S. Enteritidis* and non-*S. Enteritidis* strains were able to grow in separated fresh albumen samples up to $> 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}^{-1}$, during a storage period of 3 wk (Messens and others 2004; Clavijo and others 2006). It appears that the survival of *S. Enteritidis* in egg albumen is regulated by nucleic acid and aminoacid metabolism, and furthermore is related to genes involved in cell wall structural and functional integrity (Clavijo and others 2006). When extending the incubation time and increasing the storage temperature, the numbers of samples with pronounced growth increases further. Moreover, near room temperature (approximately 20 °C), the probability that an outgrowth takes place is much higher when the albumen of a fresh rather than a stored whole egg becomes contaminated with *Salmonella*. Even in the presence of a small number of *S. Enteritidis* cells present in the egg contents, cooling practices should be applied shortly after lay, to prevent *Salmonella* from growing in eggs (Messens and others 2004).

The egg yolk is a very important source of high quality nutrients, therefore fast growth of *Salmonella* is expected to occur in this site, when temperature will allow it. Experimentally infected laying hens often deposit *S. Enteritidis* on the vitelline membrane (Gast and Holt 2001; Gast and others 2007). The fast growth of *S. Enteritidis* occurs after a certain delay, during this period the integrity of the vitelline membrane being lost and finally resulting in a leakage of nutrients into the albumen. This enhances further migration and multiplication of *S. Enteritidis* in the yolk (Humphrey and Whitehead 1993). The initial growth phase potentially involves the use of iron

reserves. This appears to be sufficient to support 4 generations, but once these reserves are depleted, *Salmonella* cells would enter in a lag phase, further on translated as a stagnation in the number of bacterial cells (Gantois and others 2009). The site of deposition of *S. Enteritidis* in the shell egg could influence the extent to which this pathogen multiplies before the refrigeration would achieve growth-inhibiting internal temperature values (Gast and Holt 2001). When 10^2 CFU of *S. Enteritidis* was inoculated onto the exterior surface of intact egg yolk (the vitelline membrane), multiplication within the interior egg yolk contents occurred in 10% of the samples after 6 h of incubation, in 75% of the samples after 24 h at 25 °C (reaching mean levels of 10^4 CFU/mL) and in only 20% of the samples incubated for 72 h at 15 °C (Gast and others 2001). Further on, Gast and others (2006) tested the effect of refrigeration on the frequency of *in vitro* *S. Enteritidis* penetration of the egg yolk membrane. After inoculating intact exterior surface of the egg yolks with a suspension of 0.1 mL containing approximately 100 CFU, samples were held 5 min at room temperature (24 °C) to facilitate bacterial attachment to the vitelline membrane. Further on, these samples were kept at 30 °C for different periods of time (2 h, 6 h, and 24 h), followed by refrigeration at 7 °C for 18 to 22 h. *S. Enteritidis* penetrated inside the egg yolk contents in 4% of contaminated egg samples refrigerated after 2 h at 30 °C, 15% of samples refrigerated after 6 h of storage at 30 °C and 40% of samples stored at 30 °C for 24 h, followed by refrigeration. Lublin and Sela (2008) showed that from an initial concentration of 3.65 log CFU of *S. Enteritidis* inoculated into the egg yolk, the concentration increased by 1 log during the 1st 2 wk postinoculation at 6 °C, after which it remained constant, at around 4 logs, for up to 8 wk. At 25 °C, the bacterial concentrations increased to 5 logs by week 4 postinoculation and remained at 8 to 9 logs until the end.

In different European countries, cold storage of eggs is banned on the market place. The reason is related to the concept that the eggs kept in cold storage can no longer be regarded as “fresh.” On the other hand, consumers are advised to keep purchased table eggs in the refrigerator until consumption (FDA 2009b). The practical aspects of this situation are different from one country to another. However, the scientific data clearly prove that refrigeration reduces in a great extent the risk of contaminated table eggs to become a vehicle for *S. Enteritidis*, a main worldwide cause of foodborne human salmonellosis.

Decontamination methods for reducing the risk of *Salmonella* spp. penetration through the eggshell and further contamination of the egg content

In the last decades, different methods have been studied for microbial decontamination of shell eggs, with a focus on *Salmonella*. We can distinguish the procedures tested for on shell decontamination from those, more limited, also active inside the shell. Moreover, concerning the 1st category, the procedures can be classified into 3 classes: the chemical, the physical and the biological procedures (Table 3).

Several procedures are currently approved by the FDA or USDA in the U.S.A. and also, commercially available for shell eggs processing facilities. As none of them is perfect, they are continuously improved, as new procedures may emerge as well. However, the need for improvement is continuous, and research should focus more on the effects on sensory, rheological, and functional properties of eggs and their acceptability by the consumers, once the decontamination was performed. Moreover, when a new method emerges, research will still be a necessity before

Table 3—Methods of shell eggs surface decontamination as postharvest control procedures for reducing the risk of salmonellosis due to *Salmonella* contaminated eggs.

Chemical methods
Washing (use of sanitizers)
Hydrogen peroxide
Electrolyzed water
Ozone
Physical methods
Irradiation
Microwave technology
Ultraviolet light technology
Pulsed light technology
Gas plasma technology
Ultrasounds
Biological methods
Plant extracts

an efficient application on a full-scale production would take place.

Egg washing. In the E.U., egg washing is currently banned (with some exceptions—see further on) but this subject is always under a rigorous debate (Nys and Van Immerseel 2009). In this chapter, we will review different procedures that have the main objective of reducing or eliminating *Salmonella* spp. In order to be considered efficient, a decontamination procedure must lead to a reduction of at least 5 log CFU/eggshell⁻¹, otherwise the resulting shell eggs being regarded as inappropriate for egg safety point of view (FDA 2009b).

Egg washing is currently used in the U.S.A., Canada, Australia, and Japan, in order to reduce the bacterial contamination and to prevent the penetration of bacteria in the egg contents. Moreover, in the U.S.A., egg washing is followed by cold storage.

Washing of class A-table eggs is banned in the E.U., but still under discussion following the increase in noncage egg production. Moreover, Member States which, on June 2003 authorized packing centers to wash eggs, may continue to authorize these packing centers to wash eggs, but the eggs may only be marketed in the Member States in which such an authorization has been issued (EC 2007). For example, in Sweden, several providers are allowed to perform it, as the washing practice has been used for the last 40 y and the consumers prefer washed eggs (Hutchison and others 2003).

In the U.S.A., there are not specific guidelines provided by the FDA to the specific process of egg washing. However, FDA provides general information for the Food Service and Inspection Service (FSIS) to provide to companies and local producers, as to what types of chemicals are allowed to be used during cleaning and destaining of shell eggs. Usually, the compounds included in the list of Generally Regarded As Safe (GRAS) ones can be used without any specific limits when cleaning shell eggs. These are mentioned and described in the Code of Federal Regulations (CFR), Title 21, parts 178 to 186 under the general term of “food additives.” However, for several of these so-called “food additives,” limits are mentioned, and maximum allowable concentrations are described and recommended to be followed, as allowed by the food additive regulations, especially for the indirect food substances affirmed as GRAS (CFR 2012a)

In the CFR Title 7, section 56.76, there are described the minimum facility and operating requirements for shell egg grading and packing plants, point (f) clearly specifying the shell egg cleaning operations. It is stated that the temperature of the wash water shall be maintained at 90 °F (32.2 °C) or higher, and shall be at least 20 °F (6.7 °C) warmer than the internal temperature of the eggs to be washed. These values shall be maintained throughout the

entire cleaning cycle. For safety reasons, the wash water has to be changed approximately every 4 h or more often if needed, in order to maintain the sanitary conditions, and mandatory at the end of each shift. In addition, special measures have to be taken in order to avoid foaming during the egg washing operation. During the cleaning cycle, the addition of replacement water it is mandatory and has to be performed continuously. The replacement water may contain residues of chlorine or quaternary compounds, provided they are compatible with the compound used for washing. The use of iodine sanitizing water for rinse is forbidden (CFR 2012b).

Also for safety purposes, only potable water may be used during the shell eggs cleaning cycle, and it is mandatory the analysis of the iron concentration of the water supply. When the iron content exceeds 2 ppm, it has to be reduced to the maximum allowed level, and each time the water source is changed, new tests are required.

Wastewater is directly discarded, through its piping directly to the drains. Considering the type of washing procedure and equipment used, it is specified that eggs shall not be allowed to stand or soak in the water, therefore the use of immersion-type washers is forbidden. The washed eggs may be rinsed through spraying, with water having a temperature equal to, or warmer than the temperature of the wash water. It is specified that the rinse water should contain a sanitizer, approved by the national supervisor.

The main advantages of egg washing procedure are:

- the reduction of microbial load on the shell surface, minimizing the risk associated with the presence of foodborne pathogens, especially *Salmonella* spp.
- further reduction occurring after washing, since different chemicals may still be present after the washing step, continuing to exert their antibacterial effect;
- reduced risk of cross-contamination of other foods;
- reduced risk of contamination of the egg content, provided that the shell itself is not damaged.

The main disadvantage comes from the potential damage that this practice can cause to the physical barrier of the egg, especially to the cuticle (EFSA 2005). It is well known that the cuticle is the 1st defense against bacterial contamination (Board and Halls 1973).

Egg washing procedure uses water or solutions that involve chemicals (sanitizers) to determine an efficient decontamination. It is believed that different chemicals used to decontaminate the eggshell may interact with its physical barrier components. Depending on the types of chemicals used in the wash water, different microstructural changes may occur in the eggshell surfaces, and the more damaged eggshell surfaces are, the more they may allow bacterial penetration (Kim and Slavik 1996). In a study performed to investigate the abilities of different solutions, a quaternary ammonium compound (pH 7.5) and NaOCl (same pH value) succeeded in reducing bacterial penetration, without any changes to the eggshell, while Na₂CO₃ (pH 12) altered the eggshell surface which allowed bacterial recontamination (Wang and Slavik 1998). However, without using sanitizers in the washing water, it has been proven that spray washing of eggs in 15.5 °C water does not appear to increase internal shell bacterial counts (Lucore and others 1997).

Due to the concern that using a high temperature during egg washing may determine changes in egg quality, several studies have aimed to this point, evaluating as well the reduction of microbial load. Caudill and others (2010) concluded that wash water temperature did not significantly affect average Haugh Unit values, albumen height, vitelline membrane strength or aerobic bacteria in the shell matrix, but did affect average numbers of aerobic mi-

croorganisms on the exterior shell surfaces. In fact, a treatment with cool water, maintained at a pH of 10 to 12, has the potential of reducing also the internal egg temperature during and after processing, enhancing the physical qualities of the eggs, and improving their microbial quality. Using different schemes of temperature, Caudill and others (2010) obtained a reduction from 2.98 to 3.12 log CFU/mL.

Another study performed by Jones and others (2005), using 6 temperature schemes, with an exposure time of 60 s, maintaining the pH between 10.5 and 11.5, a postwashing treatment consisting of spraying a 200 ppm chlorine solution at 48.9 °C and a period of 9 wk of storage and continuous sampling, resulted in an aerobic bacterial load from 2.3 log CFU/mL to 2.87 log CFU/mL on shells and membranes, while between 53.33% and 61.8% of the samples inoculated experimentally with *S. Enteritidis* were negative. The conclusion is that washing shell eggs initially at 48.9 °C followed by a 2nd washing temperature of 23.9 °C or 15.6 °C led to a fewer aerobic bacteria present on the shell surface, than eggs washed in a combination of 23.9 °C and 15.6 °C.

Several years ago, Hutchison and others (2004) had undertaken a study on the effects of spray washing under various processing conditions to shell surface counts of *Salmonella* spp. and the presence of bacteria in egg contents. Experiments mimicked the natural conditions: they were carried out over a complete laying cycle, the eggs were contaminated with *S. Enteritidis* PT4 and *S. Typhimurium* DT104 before cuticle hardening. They used a standardized set of best washing guidelines as recommended by the equipment manufacturer and within the ranges discussed by Hutchison and others (2003). They used 2 different wash chemicals a chlorine based sanitizing agent in a concentration of 3 g/L and a quaternary ammonium based sanitizing agent in a concentration of 25mL/L, with 3 different steps in the egg washing process: prewash at 44 °C, with water flow pressure of 138 kPa; wash at 44 °C and water flow pressure of 262 kPa and rinse at 48 °C, with a water flow pressure of 262 kPa, followed by a final step consisting of air drying at 42 °C for 2 min. The used water was soft, potable and had an iron concentration of 1.4 ppb. In addition, the belt speed was 111 cm/min.

In another study that aimed to investigate the effects of different chemicals used in solution as egg disinfectants, a 1st commercial disinfecting product (pH 6.6) was used in water at 43.3 °C for 5 min, determining a 4.27 log reduction of microbial aerobic flora on eggshell. A 2nd one (pH 7.56) was used in the water at 25 °C for 10 min, determining a 3.11 log reduction. A 3rd solution of sodium hypochlorite (containing 100 ppm free chlorine, pH 8.74) used at 25 °C for 10 min, determined a log reduction of 3.08. A combination of sodium hypochlorite and 2nd solution (pH 8.4) used at 25 °C for 10 min resulted in a log reduction of 2.38. Considering side effects, the 1st compound determined a cuticle erosion, showing also an increased pore size, while in the case of the 2nd, the inside layer of the shell presented a great number of fissures and pores (Favier and others 2000).

In order to assess the food safety implications of washing table eggs under a deviation from the standard set of procedures for washing, several parameters have been modified. The results of their study have shown that when undertaken according to a strictly controlled set of best practices conditions, washing eggs that have been contaminated with *Salmonella* spp. resulted in a reduction of more than 5 log of *Salmonella* spp. counts from the shell surface. In addition, this does not lead to contamination of egg contents with the foodborne pathogen.

The concentration of the washing chemical compounds, the length of the washing period, the lowered pressure of the water

flow and the age of the laying hens do not appear to influence the contamination of the egg contents. However, if the wash and rinse water temperatures are allowed to drop under 34 °C, the risk of content contamination is increased.

In commercial processing, eggs are most frequently rinsed with chlorine and chlorine-containing compounds that act as antimicrobial agents. In addition, they are widely available, have a relatively low cost and a high efficacy. Zeidler (2001a) observed that under optimal parameters, commercial egg washing can lead to a reduction of the bacterial load on the shell of 2 to 3 log₁₀. A high level of chlorine can be detrimental for the quality of eggs (Bialka and others 2004) due to remaining residues deposited on the eggshell.

Hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide (H₂O₂) is responsible for bactericidal effects in biological systems. Its toxicity is apparently due to its capacity to generate more reactive and cytotoxic oxygen species such as the radical hydroxyl (-OH), that can initiate biomolecules' oxidation. The conversion of the H₂O₂ into these toxic compounds may be potentiated by reducing agents and by peroxydases (Juven and Pierson 1996).

Padron (1995) successfully used H₂O₂ for the decontamination of hatching eggs in a challenge involving *S. Typhimurium*. The eggs were treated by double dipping in H₂O₂ at a concentration of 6%.

Cox and others (2000) reported that *S. Typhimurium* contaminated shell eggs were treated with H₂O₂ (1.4%) by immersion in a solution containing a surfactant and submitted further on to a vacuum of 12 to 13 in Hg (0.4 bar) applied for 4 min. This treatment maximized the elimination of salmonellae on fertile hatching eggs, without adversely affecting the hatchability or the early chick mortality. These results demonstrated the difficulty in killing salmonellae that had already penetrated the shell egg.

Such a treatment could be extended to table eggs, with the difference considering the immersion. This latter process should be replaced by spray washing to enhance the practicability at industrial scale.

Electrolyzed water. Water electrolysis technology was 1st used around 1900 in the soda industry, including in the production of sodium hypochlorite, being now applied in various fields and regarded as a promising nonthermal treatment for hygiene control (Al-Haq and others 2005). Electrolyzed oxidizing water (EOW) is produced by passing a diluted salt solution through an electrolytic cell, within which the anode and cathode are separated by a membrane, obtaining an acidic and an alkaline component (Huang and others 2008; Howard and others 2012). The acidic EOW may have a pH of 2 to 3, an oxidation reduction potential (ORP) of 1.150 mV and a free available chlorine concentration of up to 50 ppm, while the alkaline EOW may reach a pH of 6.8 to 11.6 and an ORP of 795 mV at the maximum value of pH (Mukhopadhyay and Ramaswamy 2012). Many studies conducted for the evaluation of the bactericidal activity of EOW have proved that it possesses antimicrobial activity on a variety of microorganisms: *Staphylococcus aureus* (Park and others 2002b), *E. coli* O157:H7 (Kim and others 2000a, 2000b), *Salmonella* Enteritidis (Venkitanarayanan and others 1999), *S. Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* (Fabrizio and Cutter 2003), *Campylobacter jejuni* (Park and others 2002a) and others.

The antimicrobial effect of EOW is attributed mainly to pH, ORP, and HOCl (Mukhopadhyay and Ramaswamy 2012). Aerobic bacteria grow mostly at ORP range of +200 to 800 mV, while anaerobic bacteria grow well at -700 to +200 mV. The high ORP in the EOW could cause the modification of metabolic fluxes and

ATP production, probably due to the change in the electron flow in cells. In general, bacteria grow in a pH range of 4 to 9. A low pH may sensitize the outer membrane of bacterial cells to the entry of HOCl, the most active of chlorine compounds. The latter appears to kill the microbial cell through inhibiting glucose oxidation by chlorine-oxidizing sulfhydryl groups of certain enzymes important in carbohydrate metabolism. Other modes of chlorine action that have been proposed are: disruption of protein synthesis; oxidative decarboxylation of amino acids to nitrites and aldehydes; reactions with nucleic acids, purines, and pyrimidines; unbalanced metabolism after the destruction of key enzymes; induction of deoxyribonucleic acid (DNA) lesions with the accompanying loss of DNA-transforming ability; inhibition of oxygen uptake and oxidative phosphorylation, coupled with leakage of some macromolecules; formation of toxic N-chlor derivatives of cytosine; and creation of chromosomal aberrations (Marriott and Gravani 2006; Huang and others 2008).

Considering shell eggs alone, a study was undertaken to compare EOW treatment with a commercial detergent-sanitizer treatment, both *in vitro*, for the decontamination of shell eggs, artificially inoculated with *S. Enteritidis*. For this *in vitro* study, eggs were soaked in alkaline EOW followed by soaking in acidic EOW at various temperatures. Treated eggs showed a reduction in population between ≥ 0.6 and ≥ 2.6 log₁₀ CFU/g of shell *S. Enteritidis*. The log₁₀ reduction of 1.7 for *S. Enteritidis* was observed for typical commercial detergent-sanitizer treatments, whereas log₁₀ reduction of ≥ 2.1 for *S. Enteritidis* was achieved using the EOW treatment (Bialka and others 2004).

In a study conducted on shell eggs, performed in order to determine the effect of EOW applied using electrostatic spraying (in 4 different repetitions) on *S. Typhimurium* and other pathogenic bacterial species after applying the inoculum onto the shell eggs and allowed the bacteria to attach for 1 h, EOW completely eliminated all *S. Typhimurium* on 3, 7, 1, and 8 out of 15 eggs in 4 different treatment repetitions, respectively, even when high inoculations were used (Russell 2003).

In another study, the authors (Cao and others 2009) observed that acidic EOW is effective in reducing the populations of pathogenic microorganisms on the surface of shell eggs (aiming at *S. Enteritidis*), but its use is limited when low pH values are observed (≤ 2.7), because dissolved Cl₂ gas can be rapidly lost due to volatilization, decreasing the bactericidal activity of the solution with time. On the other side, slightly acidic electrolyzed water (produced by electrolysis of a dilute hydrochloric acid in a chamber without a membrane), minimizes the safety issues for human health, regarding Cl₂ off-gassing. At the same time, slightly EOW reduces the corrosion of the surfaces, and because at a pH of 5.0 to 6.5, its effective form of chlorine is the HOCl, this type of EOW may result in a stronger antimicrobial activity, in comparison to acidic EOW. The same authors proved that the bactericidal efficiency of slightly acidic EOW increases with temperature, the reduction for log₁₀ CFU/mL at 45 °C, after 1 min reaching less than 1.0, after an initial value of 8.0 to 8.4 log₁₀ CFU/mL. After 2 min, using temperatures of 4 °C, 20 °C, and 45 °C, *S. Enteritidis* was killed (Cao and others 2009). In conclusion, the last study shows that slightly acidic oxidized water can efficiently act as a promising disinfectant agent for the shell egg washing process and the reduction or inactivation of *S. Enteritidis* inoculated on the surface of shell eggs, without environmental damages.

On the other side, Bialka and others (2004) have shown that acidic electrolyzed water did not significantly affect albumen height or eggshell strength but there were significant effects

on cuticle presence. It must be mentioned that the processing parameters of their study has much more severe effects in comparison to the slightly acidic oxidizing water processing parameters, mentioned above.

Ozone. Ozone is one of the most potent sanitizers known, active against all forms of microorganisms at relatively low concentrations (Khadre and others 2001). Due to its low stability, ozone cannot be stored, being produced on demand. At commercial level, corona discharge method is usually used. In corona discharge, 2 electrodes, one of which is the high-tension electrode and the other one the low-tension electrode (ground electrode) are separated by a ceramic dielectric medium, providing a narrow discharge gap. When the electrons have sufficient kinetic energy to dissociate the oxygen molecule, a certain fraction of these collisions occurs and a molecule of ozone is formed from each oxygen atom (Guzel-Seydim and others 2004a). Ozone destruction of bacteria is accomplished by attacking on the bacterial membrane glycoproteins and/or glycolipids, resulting in cellular components leakage and followed by cell death, through the progressive oxidation of vital cellular components, reaching the nucleic material and causing DNA-strand breaks (Guzel-Seydim and others 2004b; Perry and Yousef 2011). In addition to its bactericidal effectiveness, ozone decomposes spontaneously to O₂, hence having the advantage of being a nonpolluting sanitizer for shell eggs.

Ozone is a strong microbial agent that effectively inactivates *Salmonella* in shell eggs, its efficacy in aqueous phase being demonstrated. *Salmonella* Enteritidis was effectively inactivated ≥ 5 log units on the surfaces of shell eggs by high ozone concentrations (12% to 14% wt/wt O₃ in O₂ mix) (Rodriguez-Romo and others 2007). In another study involving the same serotype of *S. enterica*, ozone treatment of shell eggs, at atmospheric pressure for 3 min significantly ($P < 0.05$) reduced *S. Enteritidis* on eggshell by 3.1 log units compared with the untreated control, while longer times (up to 8 min) did not cause additional inactivation. Application of pressurized gaseous ozone for up to 20 min resulted in nonlinear inactivation of the microorganism, a trend similar to that observed when ozone was applied at atmospheric pressure. Populations of *Salmonella* Enteritidis decreased significantly ($P < 0.05$) on shell eggs treated with pressurized ozone. The 10-min treatment inactivated 4.5 and 5.9 log units or more, and the 20-min treatment inactivated 3.7 and 5.7 log units or more compared with the untreated controls (Rodriguez-Romo and Yousef 2005). On the same subject, Perry and others (2008) applied sequentially and in combination heat and ozone to shell eggs, in order to assess the log reduction of *Salmonella* Enteritidis on eggshells. *Salmonella* was recovered from all eggs treated with ozone alone and heat alone, but only 10 of 18 combination-treated eggs tested positive, indicating *Salmonella* reduction in a many of the samples. Heating shell eggs increased permeability of their membranes to ozone gas, therefore application of ozone was effective against internal *Salmonella* only when shell eggs were subjected to heat prior to ozone treatment. Also, in an attempt to differentiate the various treatments involving ozone on table eggs, Davies and Breslin (2003a) used dry and moist ozonated air, the results showing that 23 of 24 (95.8%) eggs remained contaminated after treatment compared with 11 of 12 (91.7%) controls, for the 1st one, and 4 of 12 treated eggs were contaminated compared with 9 of 12 (75.0%) control eggs for the 2nd. Therefore, the application of ozone in either type of environment was only partially effective.

Irradiation. For food irradiation, currently there are 3 types of ionizing radiation that are allowed to be used for sanitation:

radiation from high-energy gamma rays, X-rays and accelerated electrons (Codex Alimentarius Commission 2003).

Gamma rays are produced by radioactive substances, called radioisotopes, among them the allowed ones being: cobalt-60 (⁶⁰Co) and cesium-137 (¹³⁷Cs). Their energy content arrives up to 1.17 to 1.33 mega-electronvolts (MeV) (⁶⁰Co) and 0.662 MeV (¹³⁷Cs). The accelerated electrons (or the electron beams) have a maximum quantum energy that does not exceed 10 MeV, being produced in linear accelerators at nearly the speed of light. X-rays, called also decelerating rays, are also produced in accelerators, their quantum energy of the electrons not exceeding 5 MeV (Riganakos 2010). The mechanism of microorganisms' inactivation is explained by the fact that ionizing rays (gamma rays) are picking electrons from the atoms of the treated product, therefore the free electrons can take part further on in the chemical reactions, also being able to destroy the DNA molecules from the living microorganisms (Riganakos 2010).

In comparison to the latter, electron beams (ionizing electrons) are more often easily accepted because there are no radioactive substances in the process (Riganakos 2010). By the acceleration to the speed of light, the electron beam gun subsequently passes the high-energy electrons onto the product, resulting in microbial inactivation. Electron-beam processing does not alter the temperature of the processed food and permits the application of high dose rates (10³ to 10⁵ Gy/s in comparison to only 0.01 to 1 Gy/s for gamma radiation) (Tahergerabi and others 2012). However, the depth of penetration is only 8 to 10 cm, for typical food products, therefore before irradiation of food products, the size has to be considered prior processing (Jaczynsky and Park 2003).

The X-rays are generated by interposing a metal target between the electron beam and the food product. This way, the high-energy electrons produced by the accelerator will impinge upon the metal target and produce the X-ray. The energy level is lower than in the case of electron beams, but the depth of penetration is higher (Tahergerabi and others 2012).

The scientific literature shows different attempts on shell eggs, in order to prove the efficacy of the *Salmonella* spp. inactivation.

Fresh shell eggs were inoculated with 10⁸ CFU of *S. Enteritidis* with the aim of testing the effect of 3 doses of gamma-irradiation (1, 2, and 3 kGy). After the irradiation treatment, the eggs were kept at 4 °C for 42 h. The irradiation dose of 1 kGy determined a reduction of 3.9 logCFU for detectable *S. Enteritidis* on the shell. Further on, the higher used doses determined a reduction of bacterial contamination to nondetectable levels on the shell, proving the efficacy of this treatment for shell eggs surface decontamination (Tellez and others 1995).

Serrano and others (1997) tested the irradiation sensitivity of 5 *S. Enteritidis* isolates inoculated either on the surface (a level of 10⁶ CFU/mL) or inside the shell eggs (by injecting 1 mL of 10⁸ cells/mL). The inoculated samples were subjected to irradiation doses of 0, 0.5, 1.0, and 1.5 kGy. A minimal dose of 0.5 kGy was considered sufficient for the elimination of all the isolates from the surface. However, the same isolates showed a greater resistance when inoculated in the contents, and in this case, only the maximum dose included in the test was able to reduce *S. Enteritidis* counts by approximately 4 log₁₀ in the contents.

In 2003, Wong and Kitts used low doses of electron beam irradiation (2, 3, and 4 kGy) to examine the antimicrobial effects on shell eggs inoculated with a 0.5 mL suspension of *L. monocytogenes*, *E. coli*, and *S. Typhimurium*, at a dose of 10⁹ cells/mL⁻¹. After holding the inoculated samples at 20 °C for 24 h, the irradiation treatment was conducted, using the doses mentioned above. The

doses of electron beam irradiation of 3 and 4 kGy determined the reduction of the 3 pathogens to undetectable levels, with *S. Typhimurium* showing a higher resistance to irradiation, the counts decreasing slower than on the case of the other 2 species.

Using an inoculum of 10^7 to 10^8 CFU/egg, shell eggs were artificially contaminated with reference strains of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Campylobacter coli*, and *C. jejuni*. The range of irradiation doses for the determination of D values (the values of heat resistance for microorganisms) was 0.2 to 1 kGy for *Salmonella* spp. and 0.2 to 0.7 kGy for *Campylobacter* spp. The gamma irradiation doses were included in the range 0.5 to 5 kGy. The D values varied between 0.31 and 0.26 and 0.20 and 0.19 kGy for *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, respectively, and between 0.21 and 0.18 kGy and 0.07 and 0.09 kGy for *C. coli* and *C. jejuni* for the eggshell (Cabo Verde and others 2004).

Al-Bachir and Zeinou (2006) performed another study on the irradiation of shell eggs. Using a suspension of 10^7 CFU/mL of *Salmonella* spp. the shell eggs were inoculated and subjected further on to doses of gamma irradiation from 500 to 3000 Gy, with the estimation of survival curves. The radiation dose required to reduce the *Salmonella* spp. load one log cycle (D_{10}) was 448 Gy.

Yun and others (2012) suggested another approach. They aimed to predict the optimal conditions to minimize quality deterioration while maximizing safety and functional properties of irradiated eggs, by combining different concentrations of chitosan coatings and different ionizing radiation doses. In a 1st step, eggs were coated with chitosan, using concentrations of: 0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, and 2.0%. The 2nd step consisted in the inoculation of the shell eggs, through dipping, with *S. Typhimurium* and further on subjected to an irradiation treatment, using doses of: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 kGy. The results showed that using doses of more than 0.5 kGy, in combination with concentrations of more than 1% chitosan, *S. Typhimurium* was successfully removed from the eggshell. Moreover, foam stability, foaming capacity and Haugh units are not negatively affected when using a 0.45 kGy irradiation dose and a concentration of 0.525% chitosan coating.

Microwave technology. Microwaves are oscillating electromagnetic waves with frequencies in the 300 MHz to 300 GHz range.

The effects of microwaves on pathogens can be generally expressed in 2 forms: thermal and nonthermal. Thermal inactivation is caused by heating during the microwave application process, involving changes such as denaturation of enzymes, proteins, nucleic acids or other vital components as well as disruption of membranes. Nonthermal effects have been classified in 4 categories:

- (a) selective heating, explained by the fact that microwaves heat solid microorganisms more effectively than by the surrounding medium, causing a more rapid killing of the organism;
- (b) electroporation, caused when an electrical potential crosses the membrane of the microorganism, determining the formation of pores in the membrane, and a further leakage of cellular components;
- (c) cell membrane rupture, due to the voltage drop across a membrane;
- (d) magnetic field coupling, caused by a disruption in internal components of the cell, leading further on to cell lysis (Datta and Davidson 2000; Leonelli and Mason 2010).

Microwaves can be used to reduce the load of different bacteria found on the eggshell, among them *S. Enteritidis*, as Lakins and others (2008) already showed. Using a new directional microwave technology (ITACA New Tech, Brescia, Italy), the eggs were ex-

posed to 2.45 GHz, corresponding to 12.2 cm wavelength, for 20 s. A CO₂ treatment for 30 s was performed at the end of the microwave processing. The maximum reduction of *S. Enteritidis* on the eggshell was of approximately 2 log cycles, this value being considered by the authors as appropriate to eliminate *S. Enteritidis* in most naturally contaminated eggs. However, further studies are required to reach a minimum reduction of 3 to 4 log₁₀.

Ultraviolet light technology. Ultraviolet (UV) light occupies a wide band of wavelengths in the nonionizing region of the electromagnetic spectrum between X-rays (200 nm) and visible light (400 nm), but only UV in the range of 250 to 260 nm (short-wave UV radiation, or UVC) may be lethal to most microorganisms. Among its practical applications may be mentioned: inhibition of microorganisms on surfaces, destruction of microorganisms in the air and sterilization of liquids (Bintsis and others 2000). UV radiation inactivates microorganisms by inducing a cross-linking between pyrimidine nucleotide bases in the DNA, this resulting in inhibition of DNA transcription and replication mechanisms, leading eventually to microbial cell death. In addition, it has been demonstrated that UV radiation affects cell membrane integrity, inducing protein modifications and inhibiting oxidative phosphorylation (Rodriguez-Romo and Yousef 2005).

Using UV pulsed light (3 times per second, each pulse's duration 360 μ s) of 3800 V input voltage, Keklik and others (2009) generated 1.27 J/cm²/pulse of radiant energy at 1.5 cm below the lamp surface. Samples consisting of shell-eggs artificially contaminated with *S. Enteritidis* were subjected to different treatment periods and different distances were also used (1, 3, 5, 10, 15, 20, and 30 s at 9.5 and 14.5 cm). Results showed that at a treatment distance of 9.5 cm from the UV-strobe, the reduction was between 2.0 and 5.3 CFU/cm² and the visual appearance of samples did not show any difference after treatments. Treatments for 3, 5, and 10 s were not significantly different ($P < 0.05$), while 10 s treatment was not significantly different from 15 s treatment ($P > 0.05$). The results for 20 s and 30 s were significantly different from other treatments ($P < 0.05$), and considering the distances, the treatments at 9.5 and 14.5 cm were not significantly different ($P > 0.05$) regardless of the treatment times. The treatment with the shortest time that resulted in negative enrichments was the one comprising the distance of 9.5 cm.

Treatment of *Salmonella*-contaminated shell eggs with UV radiation (100 μ W/cm²) for 2 and 4 min significantly ($P < 0.05$) decreased *S. Enteritidis* population by 2.6 and 2.0 log units, respectively, compared with the untreated controls. In the same study, but another trial, *Salmonella*-contaminated shell eggs were treated with higher UV radiation intensity (1500 to 2500 μ W/cm²) for up to 5 min; this treatment resulted in significant ($P < 0.05$) microbial reductions; UV treatments for 1, 3, and 5 min decreased *Salmonella* populations by 3.4, 3.0, and 4.3 log units, respectively, compared with the untreated controls; no significant difference ($P > 0.05$) was observed when reductions in *Salmonella* populations after 1, 3, and 5 min of irradiation were compared (Rodriguez-Romo and Yousef 2005).

Using a hand-operated egg roller, an UV treatment consisting of 254 nm light, at 7.35 mW/cm², for 0, 15, 30 and 60 s, was applied to shell eggs, finally assessing APC, in order to observe the reduction of microbial load on the eggshells. In all 30-s UV exposure trials, there was a significant reduction of 1 to 2 log₁₀ CFU/egg, compared to the controls. Eggs rotated for 60 s had significantly greater reductions of APC than the other time intervals of exposure (a 2 to 3 log₁₀ CFU/egg of aerobic microorganism

compared to controls was observed after 60 s of exposure to UV radiation) (Chavez and others 2002).

Using an UVC (254 nm) dose rate of 10 mW/cm²/s at a 20 cm distance from the bulbs and irradiation by 90° rotation 4 times during exposure, Sommers and others (2010) obtained different log reduction per J/cm² of *Salmonella* spp. on shell eggs: 0.43 ± 0.21 at 0.5 J/cm²; 0.31 ± 0.2 at 1 J/cm²; 0.53 ± 0.52 at 2 J/cm² and 0.98 ± 0.55 at 4 J/cm².

Pulsed light technology. Pulsed light (PL) treatment is a non-thermal technology that consists of the application of short duration pulses of an intense broad spectrum light (200 to 1000 nm). This part of the spectrum is mainly responsible for the lethal effect of the PL, through photochemical and/or photothermal mechanisms. The photochemical damage produced on the bacteria is induced mainly on DNA, by the UV-C region of the spectrum (200 to 290 nm), while photothermal damage is due by the absorption of light by microorganisms, which causes a temporary overheating leading to the vaporization of water inside the cell and the rupture of the membrane (Wekhof and others 2001; Woodling and Moraru 2005). Hierro and others (2009) showed that the inactivation of *S. Enteritidis* by using PL delivered in 100 μs, with 30% of the spectral output corresponding to UV light, is possible. For this, they used washed and unwashed eggs, in order to observe also the effect of the absence/presence of the cuticle. Dipping unwashed eggs into the culture provided an initial contamination of 4.5 log units in the shell. For this category, the PL treatment determined a reduction of 3.6 logCFU/egg in 24% to 80% of the eggs. For washed eggs, the inoculation determined an initial contamination of 6.3 log units, while the maximum reduction obtained was of only 1.8 logCFU/egg. This method does not pose any risk for the egg quality, as the maximum temperature increase recorded in the eggs was 3 °C when 12 J/cm² were applied. The lower contamination obtained in washed eggs supports the hypothesis that the state of the cuticle influences the utility of the treatment. Therefore, any circumstance that causes the loss of integrity of the cuticle reduces the efficacy of PL treatment.

Using also unwashed eggs, by inoculation with *S. Enteritidis* and treatment with 8 flashes of 0.5 J/cm², an 8 log reduction was observed on the surface of the shell eggs. The same author observed that when using an inoculum solution colder than the egg, a deeper penetration of the microorganisms into the shell was enhanced, while the inactivation yielded 2 to 4 folds lower log reductions, in comparison to the 1st experiment (Dunn 1996).

Gas plasma technology. Plasma is constituted by particles in permanent interaction: photons, electrons, positive and negative ions, atoms, free radicals and excited and nonexcited molecules. Based on the conditions in which they were created, plasma can be thermal and nonthermal. Thermal plasmas are obtained at high pressure and need substantial power to be conserved, while non-thermal ones are obtained at lower pressure, use less power and are characterized by an electron temperature which is much higher than that of gas (Moisan and others 2001; Moreau and others 2008).

During plasma treatment, microorganisms are exposed to an intense bombardment by the radicals of OH and NO, but the mechanism of their inactivation is not entirely known. The treatment probably provokes surface lesions that the living bacterial cell cannot repair sufficiently quickly. The process involved in microorganism destruction can also be represented by the absorption of the plasma components onto the surface of microorganisms, forming volatile compounds that are then eliminated from the cells. Also, plasma induces perforations in the membranes of mi-

croorganisms and provokes a marked acidification of the medium (Laroussi and others 2003; Laroussi and Leipold 2004).

Gas plasma can represent a good opportunity for the decontamination of foods as an alternative method for those products that cannot be sanitized by conventional methods. In the European Union, washing or cleaning of shell eggs before or after grading is banned; therefore the need for alternative methods is rising. Ragni and others (2010) studied the possibility of using a nonthermal gas plasma device to decontaminate the surface of shell eggs. The device was represented by a resistive barrier discharge system, which comprises 2 electrodes. One or both of them are covered by a high resistive material, which would prevent arcing. The efficacy of the prototype for superficial decontamination was evaluated by exposing shell eggs artificially inoculated with *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* to gas plasma for different times: 0, 10, 20, 30, 45, 60, and 90 min. For *S. Enteritidis*, an exposure of 10 to 20 min resulted in a decrease of 1.0 to 1.6 log CFU/eggshell, in comparison to untreated samples. A maximum reduction of 2.2 to 2.5 log CFU/eggshell were observed following 60 to 90 min, at a relative humidity (RH) of 35%, while at RH 65%, the effectiveness of the treatments was enhanced. The efficacy of the gas plasma generator increased by increasing the treatment time, this showing a quasi-linear trend. For *S. Typhimurium*, a higher sensitivity was observed when using 65% RH. Also, a significant reduction of 3.5 log CFU/eggshell was observed when treated for 90 min.

Kayes and others (2007) studied the efficacy of another gas plasma generator device using one atmosphere uniform glow discharge for inactivation of foodborne pathogens, showed that the microbial load of different bacterial species (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*) was strongly reduced during an initial exposure time of 30 to 90 s. However, no appreciable differences between Gram-positive and Gram-negative pathogens were observed, although the spore-forming *B. cereus* was more resistant to plasma than the non-spore-forming species (Kayes and others 2007).

Ultrasounds. Ultrasound treatment of food products is a useful tool to minimal processing, due to the fact that the transfer of acoustic energy is instantaneous and distributed throughout the whole volume of the products (Ulusoy and others 2007). The mechanism of microbial killing by ultrasonic waves is mainly due to the thinning of cell membranes, localized heating and production of free radicals (Piyasena and others 2003). Micro-mechanical shock waves are created by making and breaking microscopic bubbles induced by fluctuating pressures under the ultrasonication process; these shock waves disrupt cellular structural and functional components and lead to cell lysis (Ulusoy and others 2007). The sonication process determines microbial destruction as it follows: by creating regions of alternating compression and expansion, the longitudinal waves cause cavitation to occur, and bubbles are formed; by expansion, they reach a point where the ultrasonic energy provided is not sufficient to retain a vapour phase, and therefore, rapid condensation occurs. The condensed molecules collide violently, creating shock waves; these waves create regions of very high temperature and pressure, reaching up to 5500 °C and 50 MPa. Different combinations of this technology with other treatments have been proposed: thermosonic (heat plus sonication), manosonic (pressure plus sonication), and manothermosonic (heat plus pressure plus sonication), all of them representing highly efficient methods to inactivate microbes, as they are more energy-efficient and effective in killing microorganisms

(Dolatowski and others 2007). Ultrasonic method was applied efficiently on *Salmonella* Enteritidis, by shell eggs treatment, in combination with thermal treatment. The parameters used were: 54 °C for 5 min, 24 kHz and 400 W at 60 μm . *S. Enteritidis* count was reduced ($P < 0.05$), from 7.78 log CFU/eggshell to 2.95 log CFU/eggshell. There was a negligible effect of thermoultrasonic treatment on the eggshell morphology and structures, while the cuticle suffered some changes in its morphology, but without effect on storage conditions and bacterial growth detected in the content of eggs (Cabeza and others 2011).

The use of plant extracts. The consumers' demand for organic and nonprocessed food products is increasing; therefore the use of plant extracts for table eggs decontamination may be considered a suitable option, from this point of view.

Recently Krittika and Gi-Hyong (2012) have published a review on the inhibitory effects of several plant extracts on *Salmonella* spp. According to these authors, the phenolic compounds are responsible for their bactericidal effects as they interact by permeabilizing the membrane. Their biological activity seems to depend also on the solvent used for extraction.

Currently, very few studies provided published results on this subject, especially on shell eggs. Davies and Breslin (2003a) mentioned a natural herb extract that has an inhibitory effect on *Salmonella* and other harmful bacteria. When eggs previously contaminated with *Salmonella* Enteritidis were dipped in a 2% Proctect II (Bavaria Corp. Intl., Apopka, Fla., U.S.A.) and further on air-dried at room temperature, the authors did not observe a difference in the number of eggs that remained contaminated (8/20), compared with the distilled water control (8/20).

Recently, Pohanung and others (2009) have tested the effect of an ethanolic extract of *Punica granatum* L. against *Salmonella* Enteritidis on eggshells and eggshell membranes. Using a concentration of 1.25% and one of 2.5% (w/v) of this alcoholic plant extract applied for 10 min did not lead to a complete elimination of *S. Enteritidis* on both eggshells and eggshell membranes.

The effectiveness of these plant extracts has not been fully demonstrated until now.

Conclusions

The use of different preventive methods has the effect of reducing the likelihood that eggs become contaminated with *Salmonella* spp., especially with *S. Enteritidis*. On the farm level, the different preharvest methods may reduce the risk of egg contamination by interfering in the infection process and reducing the likelihood of this foodborne pathogen penetration in the forming egg. Further on, postharvest methods may reduce the risk of human salmonellosis, by respecting the refrigeration step and by different procedures, either chemical or physical. These latter reduce the existing bacterial counts, especially on the eggshell and ensure the microbiological quality of the shell eggs marketed in different parts of the world. However, these postharvest chemical or physical procedures are not worldwide accepted and implemented, as research is still needed on this topic, to ensure that the nutritional quality and properties of shell eggs are maintained, no matter the processing methods applied.

Acknowledgments

The preparation of this paper was funded through the project POS-DRU/88/1.5/S/52614, implemented with the support of the European Social Fund.

References

- Al-Bachir M, Zeinou B. 2006. Effect of gamma irradiation on some characteristics of shell eggs and mayonnaise prepared from irradiated eggs. *J Food Safety* 26(4):348–60.
- Al-Haq MI, Sugiyama J, Isobe S. 2005. Applications of electrolyzed water in agriculture and food industries. *Food Sci Technol Res* 11(2):135–50.
- Alodan MA, Mashaly MM. 1999. Effect of induced molting in laying hens on production and immune parameters. *Poult Sci* 78(2):171–7.
- Ammor MS, Florez BA, Mayo B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 24(6):559–70.
- Arnold ME, Carrique-Mas JJ, Davies RH. 2010. Sensitivity of environmental sampling methods for detecting *Salmonella* Enteritidis in commercial laying flocks relative to the within-flock prevalence. *Epidemiol Infect* 138(3):330–9.
- Atterbury RJ, Carrique-Mas JJ, Davies RH, Allen VM. 2009. *Salmonella* colonization of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial *Salmonella* vaccines. *Vet Rec* 165(7):493–6.
- Baron F, Gautier M, Brule G. 1997. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg white. *J Food Prot* 60(11):1318–23.
- Beaumont C, Chapuis H, Protais J, Sellier N, Menanteau P, Fravalo P, Velge P. 2009a. Resistance to *Salmonella* carrier state: selection may be efficient but response depends on animal's age. *Genet Res (Camb)* 91(3):161–9.
- Beaumont C, Chapuis H, Sellier N, Calenge F, Zongo P, Velge P, Protais J. 2009b. Selection for increased resistance to *Salmonella* carrier-state. *World's Poult Sci J* 66(2):251–60.
- Beaumont C, Calenge F, Chapuis H, Fablet J, Miniville F, Tixier-Boichard M. 2010. Génétique de la qualité de l'œuf. *INRA Prod Anim* 23(2):123–32.
- Bennett DD, Higgins SE, Moore RW, Beltran R, Caldwell DJ, Byrd II JA, Hargis BM. 2003. Effects of lime on *Salmonella* Enteritidis survival in vitro. *J Appl Poult Res* 12(1):65–8.
- Berry WD. 2003. The physiology of induced molting. *Poult Sci* 82(6):971–80.
- Bhunias AK. 2007. Foodborne microbial pathogens. 1st ed. New York, N.Y.: Springer Science and Business Media. p 276.
- Bialka KL, Demirci A, Knabel SJ, Patterson PH, Puri VM. 2004. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poult Sci* 83(12):2071–8.
- Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *J Sci Food Agric* 80(6):637–45.
- Board RG, Halls NA. 1973. The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *Br Poult Sci* 14(1):69–97.
- Borie C, Sánchez ML, Navarro C, Ramírez S, Morales MA, Retamales J, Robeson J. 2009. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. *Avian Dis* 53(2):250–4.
- Braden C. 2006. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis* 43(4):512–7.
- Braun P, Fehllhaber K. 1995. Short communication. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. *Int J Food Microbiol* 25(1):95–9.
- Brenes A, Roura E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim Feed Sci Technol* 158(1–2):1–14.
- Cabeza MC, Cambero MI, De la Hoz L, Garcia ML, Ordóñez JA. 2011. Effect of thermoultrasonic treatment on the eggshell integrity and their impact on the microbial quality. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 12(2):111–117.
- Cabo Verde S, Tenreiro R, Botelho ML. 2004. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies. *Radiat Phys Chem* 71(1–2):27–31.
- Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C. 2010. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol* 42(11):1–11.
- Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J Anim Sci* 86(suppl. E):E163–72.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 90(6):2580–95.

- Cao W, Zhu ZH, Shi ZX, Wang CY, Li BM. 2009. Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella* Enteritidis and its contaminated shell eggs. *Int J Food Microbiol* 130(2):88–93.
- Carvalho CM, Santos SB, Kropinski AM, Ferreira EC, Azeredo J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. In: Kurtboke I, editor. *Bacteriophages*. Croatia: InTech. p 179–215.
- Caudill AB, Curtis PA, Anderson KE, Kerth LK, Oyarazabal O, Jones DR, Musgrove MT. 2010. The effects of commercial cool water washing of shell eggs on Haugh unit, vitelline membrane strength, aerobic microorganisms and fungi. *Poult Sci* 89(1):160–8.
- CDC. 2010. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2008 (Final Report). Atlanta, Ga.: US Dept. of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. Div. of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases. Natl. Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Available from: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/SalmonellaAnnualSummaryTables2009.pdf>. Accessed June 13, 2012.
- CDC. 2012. Centers for Disease Control and Prevention. Div. of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases. Natl. Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Available from: <http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html#salmonella>. Accessed Feb 1, 2012.
- Cerquetti MC, Gherardi MM. 2000a. Orally administered attenuated *Salmonella* Enteritidis reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol* 76(2):185–92.
- Cerquetti MC, Gherardi MM. 2000b. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 18(11–12):1140–5.
- CFR. 2012a. Code of Federal Regulations, Title 21, parts 172–186 (21 CFR 172–186). Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>. Accessed Oct 22, 2012.
- CFR. 2012b. Code of Federal Regulations, Title 7, part 56, section 76. Minimum facility and operating requirements for shell eggs grading and packing plants. (7 CFR 56.76). Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2001-title7-vol3/pdf/CFR-2001-title7-vol3-sec56--76.pdf>. Accessed Oct 22, 2012.
- Chao SC, Young DG, Oberg CJ. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res* 12(5):639–49.
- Chalghoumi R, Théwis A, Portetelle D, Beckers Y. 2008. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in the same egg yolk. *Poult Sci* 87(1):32–40.
- Chalghoumi R, Théwis A, Beckers Y, Marcq C, Portetelle D, Schneider YJ. 2009a. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium *in vitro*. *Foodborne Pathog Dis* 6(5):593–604.
- Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. 2009b. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 13(2):295–308.
- Chaussé AM, Grépinet O, Bottaire E, Le Vern Y, Menanteau P, Trottereau J, Robert V, Wu Z, Kerboeuf D, Beaumont C, Velge P. 2011. Expression of Toll-like Receptor 4 and downstream effectors in selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to *Salmonella* carrier state. *Infect Immun* 79(8):3445–54.
- Chavez C, Knapc KD, Coufal CD, Carey JB. 2002. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult Sci* 81(8):1132–5.
- Chen J, Shallo Thesmar H, Kerr WL. 2005. Outgrowth of *Salmonellae* and the physical property of the albumen and vitelline membrane as influenced by egg storage conditions. *J Food Prot* 68(12):2553–8.
- Chung CH, Day DF. 2004. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry probiotic. *Poult Sci* 83(8):1302–6.
- Clavijo RI, Luoi C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. 2006. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Appl Environ Microbiol* 72(2):1055–64.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71(1):1–20.
- Codex Alimentarius Commission. 2003. Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of foods. Code of practice for radiation processing of food (CAC/RCP 19–1979). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. p 6.
- Cogan TA, Domingue G, Lappin-Scott HM, Benson CE, Woodward MJ, Humphrey TJ. 2001. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *Int J Food Microbiol* 70(1–2):131–41.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69(Suppl.):1052S–7S.
- Cosentino S, Tüberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Ardezi E, Plasmas F. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymes essential oils. *Lett Appl Microbiol* 29(2):130–5.
- Cox NA, Berrang ME, Buhr RJ, Bailey JS. 2000. Bactericidal treatment of hatching eggs IV. Hydrogen peroxide applied with vacuum and a surfactant to eliminate *Salmonella* from hatching eggs. *J Appl Poult Res* 9(4):530–4.
- Datta AK, Davidson PM. 2000. Microwave and radio frequency processing. *J Food Sci* 65(s8):32–41.
- Davidson F, Kaspers B, Schat KA. 2008. *Avian immunology*. 1st ed. Oxford: Elsevier's Science and Technology. p 481.
- Davies RH, Breslin M. 2001. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in laying flocks. *Vet Rec* 149(23):699–704.
- Davies RH, Breslin M. 2003a. Investigations into possible alternative decontamination methods for *Salmonella* Enteritidis on the surface of table eggs. *J Vet Med B* 50(1):38–41.
- Davies RH, Breslin M. 2003b. Persistence of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ Microbiol* 5(2):79–84.
- Davies RH, Breslin M. 2004. Observations on *Salmonella* contamination of eggs from infected commercial laying flocks where vaccination for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis had been used. *Avian Pathol* 33(2):133–44.
- Davies RH, Hinton MH. 2000. *Salmonella* in animal feed. In: Wray C, Wray W, editors. *Salmonella in domestic animals*. Oxon: CABI Publishing, CAB Intl. p 285–300.
- Davies RH, Wales AD. 2010. Investigations into *Salmonella* contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *J Appl Microbiol* 109(4):1430–40.
- Davies RH, Wray C. 1995. Mice as carriers of *Salmonella* Enteritidis on persistently infected poultry units. *Vet Rec* 137(14):337–41.
- Davies RH, Wray C. 1996. Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *Br Poult Sci* 37(3):589–96.
- Davies PR, Scott Hurd H, Funk JA, Fedorka-Cray PJ, Jones FT. 2004. The role of contaminated feed in the epidemiology and control of *Salmonella enterica* in pork production. *Foodborne Pathog Dis* 1(4):202–15.
- Davis M, Morishita TY. 2005. Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of *Salmonella* species and *Escherichia coli* inside and outside commercial layer facilities. *Avian Dis* 49(1):30–5.
- Davis AJ, Lordelo MM, Dale N. 2002. The use of cottonseed meal with or without added soapstock in laying hen diets. *J Appl Poult Res* 11(2):127–33.
- Davison S, Benson CE, Eckroade RJ. 1996. Evaluation of disinfectants against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 40(2):272–7.
- Dawoud TM, Herrera P, Hanning I, Kwou YM, Ricke SC. 2011. *In vitro* invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. *Poult Sci* 90(5):1134–7.
- De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004a. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol* 97(2):233–45.
- De Buck J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004b. Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathol* 33(3):314–20.
- De Reu K, Grijspeerd K, Messens W, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, Herman L. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 112(3):253–60.
- De Vylder J, Dewulf J, Van Hoorebeke S, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2011. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poult Sci* 90(7):1391–6.
- Desin TS, Wisner ALS, Lam PKS, Berberov E, Mickael CS, Potter AA, Koster W. 2011. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island-1 proteins as vaccine candidates against *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. *Vet Microbiol* 148(2–4):298–307.

- Dias Paiva A, Breukink E, Mantovani HC. 2011. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. *Antimicrob Agents Chemother* 55(11):5284–93.
- Diez-Gonzalez F. 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr Issues Intest Microbiol* 8:15–24.
- Dolatowski ZJ, Stadnik J, Stasiak D. 2007. Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 6(3):89–99.
- Donalson LM, Kim WK, Chalova VI, Herrera P, McReynolds JL, Gotcheva VG, Vidanovic D, Woodward CL, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. 2008a. In vitro fermentation response of laying hen cecal bacteria to combinations of fructooligosaccharide prebiotics with alfalfa or a layer ration. *Poult Sci* 87(7):1263–75.
- Donalson LM, McReynolds JL, Kim WK, Chalova VI, Woodward CL, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. 2008b. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal shedding in laying hens. *Poult Sci* 87(7):1253–62.
- Doyle MP, Erickson MC. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci* 85:960–73.
- Dunkley KD, Callaway IR, Chalova VI, McReynolds JL, Hume ME, Dunkley CS, Kubena LF, Nisbet DJ, Ricke SC. 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe* 15(1–2): 26–35.
- Dunn J. 1996. Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs. *Poult Sci* 75(9):1133–6.
- Durant JA, Corrier DE, Byrd JA, Stanker LH, Ricke SC. 1999. Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella* Enteritidis colonization and invasion of Leghorn hens. *Appl Environ Microbiol* 65(5):1919–23.
- Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. 2000. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella* Typhimurium. *J Food Prot* 63(5):573–8.
- EC. 2001. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on product Toyocerin® for use as feed additive, DG SANCO, p. 1–13. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out72_en.pdf. Posted on and accessed Dec 5, 2001.
- EC 2003. Regulation no. 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. *Off J European Union*. 12.12.2003. L325/1–15. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0001:0015:EN:PDF>. Accessed Nov 1, 2012.
- EC. 2007a. Commission Regulation (EC) No. 557/2007 of 23 May 2007, laying down rules for implementing Council Regulation (EC) No. 1028/2006 on marketing standards for eggs. *Official Journal of the European Union* L 132/5–9. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:32:0005:0020:EN:PDF>. Accessed Nov 5, 2012.
- EC. 2007b. Commission Regulation (EC) No. 1237/2007 of October 2007 amending Regulation (EC) No. 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and Decision 2006/696/EC as regards the placing on the market of eggs from *Salmonella*-infected flocks of laying hens. *Official Journal of the European Union* L280/5:3–5. Available from: http://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Legislation_Update/Reg1237_2007.pdf. Posted Oct 24, 2007. Accessed March 14, 2012.
- EC. 2008. Commission Regulation (EC) No 589/2008 of 23 June 2008 laying down detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 1237/2007 as regards marketing standards for eggs. *Official Journal of the European Union* L163/6:6. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:163:0006:0023:EN:PDF>. Posted June 24, 2008. Accessed Oct 1, 2012.
- EFSA. 2004. Opinion on the scientific panel on biological hazards on the requests from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *EFSA J* 114:1–74. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/114.pdf>. Posted Dec 2, 2004. Accessed March 14, 2012.
- EFSA. 2005. Opinion of the Scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to microbiological risks on washing of table eggs. *EFSA J* 269:1–39.
- EFSA. 2008. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA J* 720:1–84.
- EFSA. 2010. Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *EFSA J* 8(4):42–9.
- EFSA. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J* 9(3):378.
- EFSA. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J* 10:442.
- Eriksson de Rezende CL, Mallinson ET, Tablant NL, Morales R, Park A, Carr LE, Joseph SW. 2001. Effect of dry litter and airflow in reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* populations in the broiler production environment. *J Appl Poult Res* 10(3):245–51.
- Erwing WN. 2009. *The living gut*. 2nd ed. Thrumpton, UK: Nottingham Univ. Press. p 192.
- Fabrizio KA, Cutter CN. 2003. Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 66(8):1379–84.
- Fancher BI, Rollins D, Trimbee B. 1996. Feed processing using the annular gap expander and its impact on poultry performance. *J Appl Poult Res* 5(4):386–94.
- Farnell MB, Donoghue AM, Solis de los Santos F, Blore PJ, Hargis BM, Tellez G, Donoghue DJ. 2006. Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poult Sci* 85(11):1900–6.
- Favier GI, Escudero ME, Velazquez L, De Guzman AMS. 2000. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria in eggshell by washing with surfactants and their effect on the shell microstructure. *Food Microbiol* 17(1):73–81.
- FDA. 2000. Food labeling, safe handling statements, labeling of shell eggs; refrigeration of shell eggs held for retail distribution. Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2000-12-05/pdf/00-30761.pdf>. Accessed Oct 28, 2012.
- FDA. 2009a. Code of Federal Regulations, title 21, parts 16 and 118. Federal Register Final Rule: Guidance for industry. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production, storage and transportation. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodSafety/UCM285137.pdf>. Accessed Oct 28, 2012.
- FDA. 2009b. Food Code. Recommendations of the United States Public Health Service Food and Drug Administration. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2009/UCM189448.pdf>. Accessed Nov 5, 2012.
- Fedorka-Cray PJ, Hogg A, Gray TJ, Lorenzen K, Velasquez J, Von Behren P. 1997. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. *Swine Health Prod* 5(5):189–93.
- Fernandez F, Hinton M, Van Gils B. 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathol* 31(1):49–58.
- Fife MS, Salmon N, Hocking PM, Kaiser P. 2009. Fine mapping of the chicken salmonellosis resistance locus (SAL1). *Anim Genet* 40(6):871–7.
- Foster JW. 2001. Acid stress responses of *Salmonella* and *E. coli*: survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *J Microbiol* 39(2):89–94.
- Fukata TK, Sasai Y, Miyamoto T, Baba E. 1999. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly or in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. *J Food Prot* 62(3):229–33.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66(5):365–78.
- Furuta K, Shigeichi M, Shizuo S. 1980a. Bacterial contamination in feed ingredients, formulated chicken feed and reduction of viable bacteria by pelleting. *Lab Anim* 14(3):221–24.
- Furuta K, Iwao O, Shigeichi M. 1980b. Effect of steam temperature in the pelleting process of chicken food on the viability of contaminating bacteria. *Lab Anim* 14(4):293–96.
- Gaggia F, Di Gioia D, Baffoni L, Biavati B. 2011. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends Food Sci Technol* 22(Suppl. 1):S58–66.
- Galán JE. 2001. *Salmonella*. interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol*(17):53–86.
- Galvez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R. 2010. Microbial antagonists to foodborne pathogens and biocontrol. *Curr Opin Biotechnol* 21(2):142–8.
- Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F, Pasmans F, Van Immerseel F. 2006. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac E and TAD *Salmonella* vac T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 24(37–39):6250–5.

- Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2008. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol* 37(4):399–406.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 33(4):718–38.
- Garcia P, Martinez B, Obeso JM, Rodriguez A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* 47(6):479–85.
- Gast RK. 2007. Serotype-specific and Serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis* 51(4):817–28.
- Gast RK, Beard CW. 1990. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis* 34(4):991–3.
- Gast RK, Guard JY. 2011. Controlling egg contamination with *Salmonella* Enteritidis by understanding its pathobiology. XXII Latin American Poultry Congress, 6–9 September 2011, Buenos Aires, Argentina. Available from: <http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/health/forums/controlling-egg-contamination-salmonella-t5344/165-p0.htm>. Accessed Oct 26, 2012.
- Gast RK, Holt PS. 2000. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poult Sci* 79(4):559–63.
- Gast RK, Holt PS. 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. *Poult Sci* 80(7):997–1002.
- Gast RK, Guard-Petter J, Holt PS. 2002. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Dis* 46(3):629–35.
- Gast RK, Guard-Bouldin J, Holt PS. 2004. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis* 48(4):863–9.
- Gast RK, Holt PS, Guraya R. 2006. Effect of refrigeration on in vitro penetration of *Salmonella* Enteritidis through the egg yolk membrane. *J Food Prot* 69(6):1426–9.
- Gast RK, Guraya R, Guard-Bouldin J, Holt PS, Moore RW. 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis of *Salmonella* Heidelberg. *Avian Dis* 51(1):40–4.
- Girard-Santosuosso O, Lantier F, Lantier I, Bumstead N, Elsen JM, Beaumont C. 2002. Heritability of susceptibility to *Salmonella* Enteritidis infection in fowls and test of the role of the chromosome carrying the NRAMP1 gene. *Genet Sel Evol* 34(2):211–9.
- Golden NJ, Marks HH, Coleman ME, Schroeder CM, Bauer NE, Schlosser WD. 2008. Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet Microbiol* 131(3–4):215–28.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2003. Immunology, 6th ed. New York, N.Y., W.H. Freeman and Co. p 574.
- Gordon DM, Oliver E, Littlefield-Wyer J. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. 1st ed. Berlin, Springer. p 5–18.
- Grizard D, Barthelemy C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reprod Nutr Dev* 39(5–6):563–88.
- Groisman EA. 2001. Principles of bacterial pathogenesis. London: Academic Press. p 826.
- Gürtler M, Methner U, Kobilke H, Fehllhaber K. 2004. Effect of orally administered egg yolk antibodies on *Salmonella* Enteritidis contamination of hen's eggs. *J Vet Med* 51(3):129–34.
- Gusils C, Gonzalez SN, Oliver G. 1999. Some probiotic properties of chicken lactobacilli. *Can J Microbiol* 45(12):981–7.
- Guzel-Seydim Z, Bever Jr PI, Greene AK. 2004a. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiol* 21(4):475–9.
- Guzel-Seydim Z, Greene AK, Seydim AC. 2004b. Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Sci Technol* 37(4):453–60.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2004. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. p 456.
- Hacking WC, Mitchell WR, Carlson HC. 1978. *Salmonella* investigation in an Ontario fed mill. *Can J Comp Med* 42(4):400–6.
- Hammack TS, Sherrod PS, Bruce VR, June GA, Satchell FB, Andrews WH. 1993. Research note: growth of *Salmonella* Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poult Sci* 72(2):373–7.
- Hancock REW, Chapple DS. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43(6):1317–23.
- Health Canada. 2011. Guidance for industry on reducing the risk of *Salmonella* Enteritidis in Canadian shell eggs. Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca/fin-an/consult/salmonella-egg-aeuf/redu-salmonella-egg-aeuf-eng.php>. Accessed Nov 5, 2012.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EH, Gorris LGM, Von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* 46(9):3590–5.
- Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin: Springer. p 45–92.
- Henzler DJ, Opitz HM. 1992. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis* 36(3):625–31.
- Hierro E, Manzano S, Ordóñez JA, De la Hoz L, Fernandez M. 2009. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *Int J Food Microbiol* 135(2):125–30.
- Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM. 2005a. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult Sci* 84(7):1141–5.
- Hogue A, White P, Guard-Petter J, Schlosser W, Gast R, Ebel E, Farrar J, Gomez T, Madden J, Madison M, McNamara AM, Morales R, Parham D, Sparling P, Sutherland W, Swerdlow D. 1997. Epidemiology and control of egg-associated *Salmonella* Enteritidis in the United States of America. *Rev Sci Tech* 16(2):542–53.
- Holt PS. 1995. Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted and unmolted laying chickens. *Avian Dis* 39(2):239–49.
- Holt PS. 1999. Impact of induced molting on immunity and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in laying hens. In: Saeed AM, Gast RK, Potter ME, Wall PG, editors. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis, and control. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p367–75.
- Holt PS, Mitchell BW, Gast RK. 1998. Airborne horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in molted laying chickens. *Avian Dis* 42(1):45–52.
- Holt PS, Geden CJ, Moore RW, Gast RK. 2007. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. *Appl Env Microbiol* 73(19):6030–5.
- Holt PS, Davies RH, Dewulf J, Gast RK, Huwe JK, Jones DR, Waltman D, Willian KR. 2011. The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poult Sci* 90(1):251–62.
- Howard ZR, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC. 2012. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: current issues and prospects for control. *Food Res Int* 45(2):755–64.
- Huang Y-R, Hung Y-C, Hsu S-Y, Huang Y-W, Hwang D-F. 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19(4):329–45.
- Humphrey TJ, Whitehead A. 1993. Egg age and the growth of *Salmonella* Enteritidis PT4 in egg contents. *Epidemiol Infect* 111(2):209–19.
- Hutchison ML, Gittins J, Walker A, Moore A, Burton C, Sparks N. 2003. Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. *World Poult Sci J* 59(2):233–48.
- Hutchison ML, Gittins J, Walker A, Sparks N, Humphrey TJ, Burton C, Moore A. 2004. An assessment of the microbiological risks involved with egg washing under commercial conditions. *J Food Prot* 67(1):4–11.
- Ibarra JA, Steele-Mortimer O. 2009. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* 11(11):1579–86.
- ICMSF Intl. Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2005. Feeds and pet foods. In: *Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*. New York, N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 250–70.
- Jaczynski J, Park JW. 2003. Microbial inactivation and electron penetration in *Surimi* seafood during electron beam processing. *J Food Sci* 68(5):1788–92.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poult Sci* 79(6):886–91.

- Joerges RD. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci* 82(4):640–7.
- Johny AK, Darre MJ, Hoagland TA, Schreiber DT, Donoghue AM, Donoghue DJ, Venkitanarayanan K. 2008. Antibacterial effect of *trans*-cinnamaldehyde on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken drinking water. *J Appl Poult Res* 17(4):490–7.
- Jones FT. 2006. Control of toxic substances. *Feedstuffs* 80(38):77–81.
- Jones FT. 2011. A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. *J Appl Poult Res* 20(1):102–13.
- Jones FT, Richardson KE. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult Sci* 83(3):384–94.
- Jones DR, Anderson KE, Curtis PA, Jones FT. 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: effects of layer strain and hen age. *Poult Sci* 81(5):715–20.
- Jones DR, Musgrove MT, Caudill AB, Curtis PA, Northcutt JK. 2005. Microbial quality of cool water washed shell eggs. *Int J Poult Sci* 4(12):938–43.
- Juven BJ, Pierson MD. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J Food Prot* 59(11):1233–41.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2682–4.
- Kassaify ZG, Mine Y. 2004a. Nonimmunized egg yolk powder can suppress the colonization of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* in laying hens. *Poult Sci* 83(9):1497–506.
- Kassaify ZG, Mine Y. 2004b. Effect of food protein supplements on *Salmonella* Enteritidis infection and prevention in laying hens. *Poult Sci* 83(5):753–60.
- Kassaify ZG, Li EW, Mine Y. 2005. Identification of antiadhesive fraction(s) in nonimmunized egg yolk powder: *in vitro* study. *J Agric Food Chem* 53(11):4607–14.
- Kayes MM, Critzer FJ, Kelly-Wintenberg K, Reece Roth J, Montie TC, Golden DA. 2007. Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Foodborne Pathog Dis* 4(1):50–9.
- Keery I. 2010. *Salmonella* Enteritidis control programs in the Canadian Poultry Industry, Surveillance and Epidemiology Advisory Committee. 43–69. Available from: http://www.agf.gov.bc.ca/lhmr/pubs/se_control_programs0910.pdf. Accessed September 2010.
- Keklik NM, Demirci A, Patterson PH, Puri VM. 2009. Decontamination of shell-eggs with pulsed UV-light, ASABE Annual Intl. Meeting, Reno, Nevada, June 2009, 1–10.
- Keshavarz K, Quimby FW. 2002. An investigation of different molting techniques with an emphasis on animal welfare. *J Appl Poult Res* 11(1):54–67.
- Khadre MA, Yousef AE, Kim J-G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J Food Sci* 66(9):1242–52.
- Khan MI, Fadl AA, Venkitanarayanan KS. 2003. Reducing colonization of *Salmonella* Enteritidis in chicken by targeting outer membrane proteins. *J Appl Microbiol* 95(1):142–5.
- Kim J-W, Slavik MF. 1996. Changes in eggshell surface microstructure after washing with cetylpyridinium chloride or trisodium phosphate. *J Food Prot* 59(8):859–63.
- Kim C, Hung YC, Brachett RE. 2000a. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 61(2–3):199–207.
- Kim C, Hun YC, Brachett RE. 2000b. Roles of oxidation–reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for inactivation of food-related pathogens. *J Food Prot* 63(1):19–24.
- Kinde H, Castellán DM, Kerr D, Campbell J, Breitmeyer R, Ardans A. 2005. Longitudinal monitoring of two commercial layer flocks and their environments for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and other salmonellae. *Avian Dis* 49(2):189–94.
- Knappe KD, Chavez C, Burgess RP, Coufal CD, Carey JB. 2002. Comparison of eggshell surface microbial populations for in-line and off-line commercial egg processing facilities. *Poult Sci* 81(5):695–98.
- Kornschober C, Mikula C, Springer B. 2009. Salmonellosis in Austria: situation and trends. *Wien Klin Wochenschr* 121(3–4):96–102.
- Krittika N, Gi-Hyung R. 2012. Inhibitory effect of plant extracts on *Salmonella* spp. *Salmonella* – a dangerous foodborne pathogen. Barakat DD, Mahmoud SM, editors. Croatia: InTech. Available from: http://cdn.intechopen.com/pdfs/26434/InTech-Inhibitory_effect_of_plant_extracts_on_salmonella_spp_.pdf. Accessed Nov 18, 2012.
- Kumar Y. 2012. *Salmonella* – a diversified superbug, Croatia, Croatia: InTech. p 562.
- Kwon YM, Ricke SC. 1998. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. *Appl Environ Microbiol* 64(9):3458–63.
- Lakins DG, Alvarado CZ, Thompson LD, Brashears MT, Brooks JC, Brashears MM. 2008. Reduction of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs using directional microwave technology. *Poult Sci* 87(5):985–91.
- Laroussi M, Leipold F. 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int J Mass Spectrometry* 233(1–3):81–6.
- Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. 2003. Plasma interaction with microbes. *New J Phys* 5(1):41.1–41.10.
- Leatham GF. 1982. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. *Forest Prod J* 32(8):29–35.
- Lee HS, Ahn YN. 1998. Growth-inhibiting effects of Cinnamomum cassia bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem* 46(1):8–12.
- Lee KW, Everts H, Beynen AC. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Int J Poult Sci* 3(12):738–52.
- Leonelli C, Mason TJ. 2010. Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry. *Chem Eng Proc* 49(9):885–900.
- Levin BR, Bull JJ. 2004. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol* 2(2):166–73.
- Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S. 2009. Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. *Avian Pathol* 38(2):97–106.
- Li X, Bethune LA, Jia Y, Lovell RA, Proescholdt TA, Benz SA, Schell TC, Kaplan G, McChesney DG. 2012. Surveillance of *Salmonella* prevalence in animal feeds and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. *Foodborne Pathog Dis* 9(8):692–8.
- Lima ET, Andreatti Filho RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. 2007. Evaluation *in vitro* of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Can J Vet Res* 71(2):103–7.
- Lin J. 2009. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathog Dis* 6(7):755–65.
- Line JE, Bailey JS, Cox NA, Stern NJ, Tompkins T. 1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poult Sci* 77(3):405–10.
- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 52(3):1094–100.
- Linke D, Goldman A. 2011. Bacterial adhesion – chemistry, biology and physics. 1st ed. New York, N.Y.: Springer Science and Business Media BV. p 368.
- Liu W, Yang Y, Kwang J. 2001. Induction of humoral immune responses and protective immunity in chickens against *Salmonella* Enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. *Avian Dis* 45(4):797–806.
- Lock JL, Board RG. 1992. Persistence of contamination in hens' egg albumen *in vitro* with *Salmonella* serotypes. *Epidemiol Infect* 108(3):389–96.
- Lublin A, Sela S. 2008. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the eggs. *Poult Sci* 87(11):2208–14.
- Lucore LA, Jones FT, Anderson KE, Curtis PA. 1997. Internal and external bacterial counts from shells of eggs washed in a commercial-type processor at various wash-water temperatures. *J Food Prot* 60(11): 1324–8.
- Maciorowski KG, Herrera P, Kundiger MM, Ricke SC. 2006. Animal feed production and contamination by foodborne *Salmonella*. *J Verbr Lebensm* 1(3):197–209.
- Maciorowski KG, Herrera P, Jones FT, Pillai SD, Ricke SC. 2007. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Anim Feed Sci Tech* 133(1–2):109–36.
- MacKenzie MA, Bains BS. 1976. Dissemination of *Salmonella* serotypes from raw feed ingredients to chicken carcasses. *Poult Sci* 55(3):957–60.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50(6):882–9.

- Marriott NG, Gravani RB. 2006. Principles of food sanitation. 5th ed. New York, N.Y.: Springer Science and Business Media. p 413.
- Martelli F, Davies RH. 2012. Salmonella serovars isolated from table eggs: an overview. *Food Res Int* 45(2):745–54.
- Mastroeni P, Grant A, Restif O, Maskell D. 2009. A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat Rev Microbiol* 7(1):73–80.
- Messens W, Dubocage L, Grijspeerdt K, Heyndrickx M, Herman L. 2004. Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected to storage prior to inoculation. *Food Microbiol* 21(1):25–32.
- Mian LS, Maag H, Tacal JV. 2002. Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. *J Vector Ecol* 27(1):82–5.
- Miyamoto T, Horie T, Fujiwara T, Sasai K, Baba E. 2000. *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. *Poult Sci* 79(1):7–11.
- Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. 2001. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 226(1–2): 1–21.
- Monk AB, Rees CD, Barrow P, Hagens S, Harper DR. 2010. Bacteriophage applications: where are we now? *Lett Appl Microbiol* 51(4):363–9.
- Moreau M, Orange N, Feuilloley MGJ. 2008. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol Adv* 26(6):610–7.
- Mukhopadhyay S, Ramaswamy R. 2012. Application of emerging technologies to control Salmonella in foods: a review. *Food Res Int* 46(2):666–77.
- Murchie L, Whyte P, Xia B, Horrigan S, Louise K, Madden RH. 2007. Prevalence of *Salmonella* in Grade A whole shell eggs in the island of Ireland. *J Food Prot* 70(5):1238–43.
- Musgrove MT, Shaw JD, Harrison MA. 2012. Salmonella collected from nest run cart shelves in commercial shell egg processing facilities. *Poult Sci* 91(9):2386–9.
- Nabbut NH. 1978. Salmonella serotypes encountered in animal feed additives in Lebanon. *Amer J vet Res* 39(5):893–95.
- Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, Sato S. 1994. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis* 38(4):717–24.
- Nisbet DJ, Corrier DE, DeLoach JR. 1993. Effect of a mixed cecal microflora maintained in continuous culture and of dietary lactose on *Salmonella* Typhimurium colonization in broiler chicks. *Avian Dis* 37(2):528–35.
- Nys Y, Van Immerseel F. 2009. SAFEHOUSE et RESCAPE: deux projets Européens pour contrôler la contamination liée à *Salmonella* dans les systèmes alternatifs de production d'œufs. Available from: http://www.international.inra.fr/partnerships/with_he_private_sector/live_from_the_labs/safehouse_and_rescape. Accessed Nov 12, 2012.
- O'Bryan CA, Crandall PG, Chalova VI, Ricke SC. 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *J Food Sci* 73(6):264–7.
- Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA, Tani H, Sasai K, Baba E, Lillehoj EP. 2005. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 107(3–4):327–35.
- Okamura M, Sonobe M, Obara S, Kubo R, Nagai R, Noguchi M, Takehara K, Nakamura M. 2010. Potential egg contamination by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 following experimental infection of pullets at the onset of lay. *Poult Sci* 89(8):1629–34.
- Olsen AR, Hammack TS. 2000. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aeneascens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. *J Food Prot* 63(7):958–60.
- Omwantho COA, Kubota T. 2010. Salmonella enterica serovar Enteritidis: a mini-review of contamination routes and limitations to effective control. *Jpn Agric Res Q* 44(1):7–16.
- Ordóñez G, Llopis N, Penalver P. 2008. Efficacy of eugenol against a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in commercial layers in production. *J Appl Poult Res* 17(3):376–82.
- Ouweland AC, Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H, Rautonen N. 2010. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Vet Med* 55(2):71–8.
- Padron M. 1995. Salmonella Typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis* 34(2):463–5.
- Park CM, Hung YC, Brackett RE. 2002a. Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int J Food Microbiol* 72(1–2):77–83.
- Park H, Hung YC, Kim C. 2002b. Effectiveness of electrolyzed water as a sanitizer for treating different surfaces. *J Food Prot* 65(8):1276–80.
- Pascual M, Hugas M, Badiola JI, Monfort JM, Garriga M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4981–6.
- Patterson JA, Burkholder KM. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci* 82(4):627–31.
- Perry JJ, Rodriguez-Romo LA, Yousef AE. 2008. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in shell eggs by sequential application of heat and ozone. *Lett Appl Microbiol* 46(6):620–5.
- Perry JJ, Yousef AE. 2011. Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques. *Annu Rev Food Sci Technol* 2:281–98.
- Peschel A, Sahl HG. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529–36.
- Pithva S, Ambalam P, Dave JM, Vyas BRM. 2011. Antimicrobial peptides of probiotic *Lactobacillus* strains. In: Mendez-Vilas A, editor. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Vol. 1. Badajoz, Spain: FORMATEX. p 987–91.
- Piyasena P, Mohareb E, McKellar RC. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol* 87(3):207–16.
- Pohuang T, Chuachan K, Sarachu K. 2009. Effect of *Punica granatum* L. rind extract against *Salmonella* Enteritidis on eggshells and eggshell membranes. *KKU Vet J* 19(1):38–47.
- Pomares MF, Salomon RA, Pavlova O, Severinov K, Farias R, Vincent PA. 2009. Potential applicability of cymotrypsin-susceptible microcin J25 derivatives to food preservation. *Appl Environ Microbiol* 75(17):5734–8.
- Pontier-Bres R, Prodon F, Munro P, Rampal P, Lemichez E, Peyron JF, Czerucka D. 2012. Modification of *Salmonella* Typhimurium motility by the probiotic yeast strain *Saccharomyces boulardii*. *PLoS One* 7:e33796. Available from: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033796>. Accessed July 30, 2012.
- Portrait V, Gendron-Gaillard S, Cotteceau G, Pons AM. 1999. Inhibition of pathogenic *Salmonella* Enteritidis growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Rev Can de Microbiol* 45(12):988–94.
- Prévost K, Magal P, Protais J, Beaumont C. 2008. Effect of genetic resistance of the hen to *Salmonella* carrier-state on incidence of bacterial contamination: synergy with vaccination. *Vet Res* 39(2):20.
- Ragni L, Berardinella A, Vannini L, Montanari C, Sirri F, Guerzoni ME, Guarneri A. 2010. Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *J Food Eng* 100:125–32.
- Raspoet R, Gantois I, Devloo R, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2011. *Salmonella* Enteritidis universal stress protein (*usp*) gene expression is stimulated by egg white and supports oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Vet Microbiol* 153(1–2):186–90.
- Revolledo L, Ferreira AJP, Mead GD. 2006. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics and enhancement of avian intestinal immunity. *J Appl Poult Res* 15(2):341–51.
- Ricke SC. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 82(4):632–9.
- Riganakos KA. 2010. Food irradiation techniques. In: Arvanitoyannis IS, editor. Irradiation of food commodities. New York, N.Y.: Elsevier Inc. p 710.
- Riley MA, Wertz JE. 2002a. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84(5–6):357–64.
- Riley MA, Wertz JE. 2002b. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu Rev Microbiol* 56:117–37.
- Rodriguez-Romo LA, Yousef AE. 2005. Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *J Food Prot* 68(4):711–7.
- Rodriguez-Romo LA, Vurma M, Lee K, Yousef AE. 2007. Research note: penetration of ozone across the shell of hen eggs. *Ozone Sci Eng* 29(2):147–50.
- Rossi LM, Rangasamy P, Zhang J, Qiu XQ, Wu GY. 2008. Research advanced in the development of peptide antibiotics. *J Pharm Sci* 97(3):1060–70.
- Roy MF, Malo D. 2002. Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice. *Genes Immun* 3:381–93.

- Russell SM. 2003. The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poult Sci* 82(1):158–62.
- Sadeyen JR, Trotureau J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow PA, Bumstead N, Lalmanach AC. 2004. Salmonella carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes Infect* 6(14):1278–86.
- Sadeyen JR, Trotureau J, Protais J, Beaumont C, Sellier N, Salvat G, Velge P, Lalmanach AC. 2006. Salmonella carrier state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. *Microbes Infect* 8(5):1308–14.
- Salminen SJ, Nyborn S, Meriluoto J, Collado MS, Vertswerlung S, El-Nezami H. 2010. Interaction of probiotics and pathogens – benefits to human health? *Curr Opin Biotechnol* 21(2):157–67.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infect Dis* 17(1):7–15.
- Schneitz C. 2005. Competitive exclusion in poultry – 30 years of research. *Food Control* 16(8):657–67.
- Schneitz C, Mead GC. 2000. Competitive exclusion. In: Wray C, Wray W, editors. *Salmonella in domestic animals*. Oxon: CABI Publishing, CAB Intl. p 301–22.
- Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wang AC. 1995. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol* 24(3):385–93.
- Seo KH, Holt PS, Gast RK, Hofacre CL. 2000. Combined effect of antibiotic and competitive exclusion treatment on *Salmonella* Enteritidis fecal shedding in molted laying hens. *J Food Prot* 63(4):545–8.
- Seo KH, Holt PS, Gast RK. 2001. Comparison of *Salmonella* Enteritidis infection in hens molted via long-term feed withdrawal versus full-fed wheat middling. *J Food Prot* 64(12):1917–21.
- Serrano LE, Murano EA, Shenoy K, Olson DG. 1997. D values of *Salmonella* Enteritidis isolates and quality attributes of shell eggs and liquid whole eggs treated with irradiation. *Poult Sci* 76(1):202–5.
- Shah DH, Zhou X, Addwebi T, Davis MA, Call DR. 2011. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis clinical strains isolated from North America. *Arch Microbiol* 193(11):811–21.
- Shirota K, Katoh H, Ito T, Otsuki K. 2000. Salmonella contamination in commercial layer feed in Japan. *J Vet Med Sci* 62(7):789–91.
- Sirsat SA, Muthaiyan A, Ricke SC. 2009. Antimicrobials for foodborne pathogen reduction in organic and natural poultry production. *J Appl Poult Res* 18(2):379–88.
- Sommers CH, Sites JE, Musgrove M. 2010. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of pathogens on foods and stainless steel surfaces. *J Food Saf* 30(2):470–79.
- Sterzo EV, Paiva JB, Mesquita AL, Freitas Neto OC, Berchieri A. 2007. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis experimental infection in chickens. *Braz J Poult Sci* 9(1):69–73.
- Stott JA, Hodgson JE, Chaney JC. 1975. Incidence of *Salmonellae* in animal feed and the effect of pelleting on content of enterobacteriaceae. *J Appl Bacteriol* 39(1):41–6.
- Sugita-Konichi Y, Sakanaka S, Sasaki K, Juneja LR, Noda T, Amano F. 2002. Inhibition of bacterial adhesion and *Salmonella* infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. *J Agric Food Chem* 50(12):3607–13.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris Jr J. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):649–59.
- Šušková J, Kos B, Goretá J, Matošić S. 2001. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol Biotechnol* 39(3):227–35.
- Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, Levchuk VP, Svetoch OE, Kovalev YN, Stepanshin YG, Siragusa GR, Seal BS, Stern NJ. 2008. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E50–52 bacteriocin. *J Agric Food Chem* 56:1942–8.
- Tahergorabi R, Matak KE, Jaczynski J. 2012. Application of electron beam to inactivate *Salmonella* in food: Recent developments. *Food Res Int* 45(2):685–94.
- Tellez IG, Trejo RM, Sanchez RE, Cenicerós RM, Luna QP, Zazua P, Hargis BM. 1995. Effect of gamma irradiation on commercial eggs experimentally inoculated with *Salmonella* Enteritidis. *Radiat Phys Chem* 46(4):789–92.
- Tellez G, Petrone VM, Escorcía M, Morishita TY, Cobb CW, Villasenor L, Promsopone B. 2001. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* Enteritidis-, *Salmonella* Typhimurium- and *Salmonella* Heidelberg-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* Enteritidis in broilers. *J Food Prot* 64(3):287–91.
- Tellez G, Pixley C, Wolfenden RE, Layton SL, Hargis BM. 2012. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* in poultry. *Food Res Int* 45(2):628–33.
- Thomas M, van der Poel AFB. 1996. Physical quality of pelleted animal feed. 1. Criteria for pellet quality. *Anim Feed Sci Technol* 61(1–4):89–112.
- Thomas M, van Zuilichem DJ, van der Poel AFB. 1997. Physical quality of pelleted animal feed. 2. Contribution of processes and its conditions. *Anim Feed Sci Technol* 64(2–4):173–92.
- Thomas M, van Vliet T, van der Poel AFB. 1998. Physical quality of pelleted animal feed. 3. Contribution of feedstuff components. *Anim Feed Sci Technol* 70(1–2):59–78.
- Thompson JL, Hinton M. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop. *Br Poult Sci* 38(1):59–65.
- Toro H, Price SB, McKee S, Hoerr FJ, Krehling J, Perdue M, Bauermeister L. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis* 49(1):118–24.
- Toyota-Hanataki Y, Ekawa T, Ohta H, Igimi S, Hara-Kudo Y, Sasai H, Baba E. 2009. Public health assessment of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis inactivated-vaccine treatment in layer flocks. *Appl Environ Microbiol* 75(4):1005–10.
- Turnbull PCB, Snoeyenbos GH. 1973. The roles of ammonia, water activity and pH in the salmonellacid effect of long-used poultry litter. *Avian Dis* 17(1):72–86.
- Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol* 174(4):233–8.
- Ulusoy BH, Colak H, Hampikyan H. 2007. The use of ultrasonic waves in food technology. *Res J Biol Sci* 2(4):491–7.
- Umali DV, Lapuz RR, Suzuki T, Shirota K, Katoh H. 2012. Transmission and shedding patterns of *Salmonella* in naturally infected captive wild roof rats (*Rattus rattus*) from a *Salmonella*-contaminated layer farm. *Avian Dis* 56(2):288–94.
- USDA 2005. Code of Federal Regulations. 21 CFR 179.26(b) Ionizing radiation for the treatment of food. Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2005-title21-vol3/xml/CFR-2005-title21-vol3-sec179-26.xml>. Accessed Nov 16, 2012.
- Van Coillie E, Goris J, Cleenwerck I, Grijspeerd K, Botteldoorn N, Van Immerseel F, De Buck J, Vancanneyt M, Swings J, Herman L, Heyndrickx M. 2007. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. *J Appl Environ* 102(4):1095–106.
- Van der Wielen PWJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Uurlings BAP, van Knipen P. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broilers chickens during growth. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2536–40.
- Van Hoorebeke S, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Dewulf J. 2011. The influence of the housing system on *Salmonella* infections in laying hens: a review. *Zoonoses Public Hlth* 58(5):304–11.
- Van Immerseel F, Cauwerts K, Devirese LA, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2002. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World's Poult Sci J* 58(4):501–13.
- Van Immerseel F, Boyen F, Gantois I, Timmermont L, Bohez L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2005a. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult Sci* 84(12):1851–6.
- Van Immerseel F, De Buck J, Boyen F, Pasmans F, Bertrand S, Collard JM, Saegerman C, Hooyberghs J, Haesebrouck D, Ducatelle R. 2005b. *Salmonella* dans la viande de volaille et dans les oeufs: un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace. *Ann Med Vet* 149:34–48.
- Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. 2005c. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect* 133(6):959–78.
- Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timmermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol* 35(3):182–8.

- Van Immerseel F, Eeckhaut V, Teirlynck E, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2007. Mechanisms of action of nutritional tools to control intestinal zoonotic pathogens. Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition, August 26–30, 2007, Strasbourg, France: World Poultry Science Assn.
- Van't Hof W, Veernan ECI, Helmerhorst EJ, Amerongen AVN. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 382(4):597–619.
- Vandeplas S, Dubois Dauphin R, Beckers Y, Thonart P, Théwis A. 2010. Salmonella in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *J Food Prot* 73(4):774–85.
- Veldman A, Vahl HA, Borggreve GJ, Fuller DC. 1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and *Enterobacteriaceae* in poultry feeds and feed components. *Vet Record* 136(7):169–172.
- Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle M. 1999. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Appl Env Microbiol* 65(9):4276–9.
- Vicente JL, Lopez C, Avila E, Morales E, Hargis BM, Tellez G. 2007. Effect of dietary natural capsaicin on experimental *Salmonella* Enteritidis infection and yolk pigmentation in laying hens. *Int J Poult Sci* 6(6):393–6.
- Vilà B, Fontgibell A, Badiola I, Esteve-Garcia E, Jimenez G, Castillo M, Brufau J. 2009. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var toyoi inclusion in poultry feeds. *Poult Sci* 88(5):975–9.
- Wagner RD, Cerniglia CE. 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of competitive exclusion bacteria applied to newly hatched chickens. *Int J Food Microbiol* 102(3):349–53.
- Wales A, Davies R. 2011. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. *Avian Pathol* 40(5):429–36.
- Wales A, Breslin M, Carter B, Sayers R, Davies R. 2007. A longitudinal study of environmental *Salmonella* contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathol* 36(3):187–97.
- Wang H., Slavik M.F. 1998. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *J Food Prot* 61(3):276–9.
- Waseh S, Hanifi-Moghaddam P, Coleman R, Masotti M, Ryan S, Foss M, MacKenzie R, Henry M, Szymanski CM, Tanha J. 2010. Orally administered P22 phage tailspike protein reduces *Salmonella* colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. *PlosOne* 5(11):e13904.
- Wekhof A, Trompeter F-J, Franken O. 2001. Pulsed UV disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications. The 1st Intl. Conference on Ultraviolet Technologies, June 14–16, Washington, D.C., USA, 1–15.
- Whitelaw CBA, Sang HM. 2005. Disease-resistant genetically modified animals. *Bull Off Int Epizoot* 24(1):275–83.
- Whyte P, McGill K, Collins JD. 2003. A survey of the prevalence of *Salmonella* and other enteric pathogens in a commercial poultry feed mill. *J Food Safety* 23(1):13–24.
- Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, De Kruijff B, Sahl HS. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 276(11):1772–9.
- Wigley P. 2004. Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. *Res Vet Sci* 76(3):165–9.
- Willis WL, Goktepe I, Isikhuemhen OS, Reed M, King K, Murray C. 2008. The effect of mushroom and pokeweed extract on *Salmonella*, egg production and weight loss in molting hens. *Poult Sci* 87(12):2451–7.
- Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim Sci* 86(E suppl.):E140–8.
- Wong PYY, Kitts DD. 2003. Physicochemical and functional properties of shell eggs following electron beam irradiation. *J Sci Food Agric* 83(1):44–52.
- Woodling SE, Moraru CI. 2005. Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. *J Food Sci* 70(7):M345–51.
- Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S. 2002. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol* 31(4):383–92.
- Woodward CL, Kwon YM, Kubena LF, Byrd JA, Moore RW, Nisbet DJ, Ricke SC. 2005. Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and invasion by an alfalfa diet during molt in Leghorn hens. *Poult Sci* 84(2):185–193.
- Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci* 82(6):1030–6.
- Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. 2011. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnol Adv* 29(6):860–8.
- Yun H, Jung Y, Lee KH, Song HP, Kim K, Jo C. 2012. Predicting optimal conditions to minimize quality deterioration while maximizing safety and functional properties of irradiated egg. *Rad Phys Chem* 81(8):1163–5.
- Zeidler G. 2001a. Processing and packaging shell eggs. In: Bell DD, Weaver Jr D, editors. Commercial chicken meat and egg production. Norwell, Mass.: Kluwer Academic Publishers. p 1129–61.
- Ziprin RL, Deloach JR. 1993. Comparison of probiotics maintained by *in vivo* passage through laying hens and broilers. *Poult Sci* 72(4):628–35.