

## ***Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum* için qPCR Tanı Kitinin Geliştirilmesi**

**Özlem Kardoğan<sup>1</sup>, Özlem Şahan Yapıcıer<sup>2</sup>, Kaan Müştak<sup>3</sup>, İnci Başak Müştak<sup>3</sup>, Arda Arman<sup>1</sup>, Gültekin Ünal<sup>4</sup>, Mustafa Kolukırcık<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü-Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Bioeksen-Ar-Ge Teknolojileri Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye

**Geliş Tarihi** / Received: 09.10.2019, **Kabul Tarihi** / Accepted: 06.12.2019

**Özet:** Konak spesifik ve biovar olan *Salmonella Gallinarum* ve *Salmonella Pullorum* başta tavuk olmak üzere hindi, bildircin, güvercin, serçe ve papağanlarda önemli hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle kanatlı hayvanlarda bu serotipleri saptamak için hızlı ve güvenilir tanı yöntemleri hastalığın etkin kontrolü için gerekli olmaktadır. Bu amaçla biovarları saptamak ve birbirinden ayırımı sağlamak için eş zamanlı olarak *S. Gallinarum/Pullorum* ve internal kontrol hedefli reaksiyonları içeren hızlı qPCR tanı kiti geliştirildi. *S. Gallinarum/Pullorum* referans ve VKMAE Kanatlı Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edilen *S. Gallinarum* suşlarına qPCR metodu uygulandı. Çalışmada qPCR analizinin duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirildi. Sonuçlar geliştirilen qPCR yönteminin *S. Gallinarum/Pullorum*'u kesin olarak saptayabildiğini gösterdi. qPCR yönteminin kullanım kolaylığı, güvenilirliği, teknik olarak basit, tam otomasyon, spesifik, hassas, hızlı olmasından dolayı bu biovarların teşhisi ve ayırımında daha fazla avantaj sağlayacağı sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** qPCR, *Salmonella*, tanı

### **Development of qPCR Diagnostic Kit for *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum***

**Abstract:** *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* cause important disease of chicken, the others are turkey, quail, pigeon, sparrow and parrot, which are host specific and biovars of each other. Therefore, rapid and reliable methods to detect these poultry-associated *Salmonella* serotypes are necessary for efficient control of *Salmonella* in poultry. For this purpose, a rapid qPCR diagnostic kit including *S. Gallinarum / Pullorum* and internal control targeted reactions was developed simultaneously to detect and differentiate biovars. *S. Gallinarum/Pullorum* reference and *S. Gallinarum* strains that were developed from VKMAE Poultry Laboratory were performed using qPCR method. In this study, sensitivity and specificity of qPCR analysis were evaluated. The results showed that the developed qPCR method was able to detect *Salmonella Gallinarum/Pullorum* correctly. Since the ease of use, reliability, technically simple, full automation, specific, sensitive and fast, the qPCR method is thought to provide more advantages in the diagnosis and differentiation of these biovars.

**Key words:** Diagnosis, qPCR, *Salmonella*

### **Giriş**

Kanatlı hayvanlarda *Salmonella enterica* sub-species *enterica* serovar *Gallinarum/ Pullorum* (*S. Gallinarum/Pullorum*) nedeni enfeksiyonlar, kanatlı tifosu ve pullorum hastalığı olarak tanımlanmaktadır (OIE 2018). Bu hastalıklar tavuk, hindi, bildircin, güvercin, serçe, papağan ve diğer süs kuşlarında görülmektedir. Pullorum hastalığı gençlerde görülmesine rağmen erginlerde de ortaya çıkmaktadır. Bulaşma kaynağını enfekte kanatlılar oluşturmakta ve vertikal bulaşma görülmektedir (Berchieri

ve ark. 2001). İnfekte civcivler kısa sürede ölürlere ve klokalar kirli ve beyaz renklidir, bazı durumlarda ölümlere daha sonraki haftalarda, genellikle de 2. ve 3. haftada rastlanır. Ergin hayvanlarda genellikle semptom görülmez ancak akut olgularda halsizlik, düşüklük, yumurta veriminde düşüş, ilk günlerde ateş, iştahsızlık ve 10 gün içinde ölüm izlenebilir. Kronik olgularda bu semptomları izlemek mümkün değildir. Buna karşın lokalize formları görülür. Etkenin virulansına ve sürünün direncine göre pullorumda mortalite %0-100, tifoda ise %10-93 arasında değişmektedir (Akan 2008). Bu hastalık-

lar uygulanan ulusal kontrol programları sayesinde Kanada, Avustralya, Japonya, Kuzey Amerika, Birleşik Krallık ve bazı Batı Avrupa ülkelerinden eradike edilmesine rağmen Afrika, Asya, Kuzey ve Orta Amerika ülkelerinde halen önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Jones ve ark. 2001).

White-Kauffmann-Le Minör şemasının D serogrubunda (O antijenleri 1, 9, 12 sahipken; flagellar antijeni bulunmaz: -,-) yer alan *S. Gallinarum*/*Pullorum* aynı serovarin biyotipleri olarak kabul edilirler ve serotiplendirme ile birbirinden ayıramazlar (Barrow ve ark. 2011). Günümüzde bu iki biovarın, dulsetol ve ornitin dekarboksilaz gibi biyokimyasal testleri temel alan biyotiplendirme yöntemi ile ayırımı gerçekleştirilmektedir (Trabulsi ve Edwards 1962; Christensen ve ark. 1992; Shivaprasad 2008).

Moleküler çalışmaların yanında günümüzde hala ISO 6579-1:2017 *Salmonella* izolasyon ve identifikasyon prosedürü altın standarttır (Le Minör 1992; ISO 2007, 2012). Tüm prosedürün tamamlanması için geçen süre yaklaşık 11 gündür ve yoğun emek ve tecrübeli personel isteyen bu yöntemi kısaltmak için moleküler tabanlı birçok hızlı tanı yöntemi geliştirilmiştir (Bohaychuck ve ark. 2007; Soria ve ark. 2012). Yüksek sensitivite, spesifite ve zamanı kısaltmasından dolayı tercih edilen metotlar konvansiyonel PCR ve real-time PCR teknikleri olmuştur (Ellingson ve ark. 2004; Malorny ve ark. 2004; Hein ve ark. 2006; Josefsen ve ark. 2007). Bu testler arasında yer alan kantitatif real-time PCR (qPCR) yöntemi ise bu iki biovarın teşhisinde kullanılan hızlı, güvenilir, ucuz ve duyarlı yöntemlerin başında gelmektedir (Kisiela ve ark. 2005). Bu çalışmada, *S. Gallinarum*/*Pullorum* biovarlarının hem tanısını koymak hem de birbirinden ayırt etmek için qPCR tabanlı hızlı tanı kiti geliştirilmesi ve optimizasyonu amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

**Standart bakteri suşları:** Çalışma kapsamında *Salmonella Gallinarum* NCTC 13346, *Salmonella Pullorum* NCTC 10704 pozitif kontrol; *Salmonella Enteritidis* NCTC 12694 ve *Salmonella Typhimurium* NCTC 74 negatif kontrol suşu olarak kullanılmak üzere Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Ulusal *Salmonella* Referans Laboratuvarı'ndan temin edildi.

**Genomik DNA izolasyonu:** DNA ekstraksiyonları ticari DNA ekstraksiyon kiti ile DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, USA) üreticinin açıklamalarına göre yapıldı. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

**Primer ve prob tasarımı:** Standart suşlara ait National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank'dan elde edilen tüm genom dizileri Clustal-O (Clustal-Omega) yazılımıyla hizalanarak *Salmonella enterica* türüne ait tüm serotiplerde bulunan korunmuş bölgeler belirlendi (Kang ve ark. 2011). *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum*'u ayırımı için *glgC* ve *speC* gen bölgelerine spesifik primer, prob ve inhibitörlere bağlı yanlış negatifliği ortadan kaldırmak için internal kontrol primerleri (IAC) tasarlandı (patent aşamasında). Spesifik dizi hedeflenerek primer ve prob tasarımları manuel olarak yapıldı (Dorak 2007). Tasarlanan primer ve prob *in-silico* olarak BLAST tarama motorunda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) incelenerek spesifiteleri belirlendi.

**qPCR Koşulları:** Real-time PCR analizlerinde primer ve prob kullanılarak yer alan PCR karışımı (patent aşamasında) hazırlandı (Tablo 1). Nükleik asit amplifikasyonları FAM-HEX kanallı Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak 95°C 5 dak ön denatürasyon, 40 döngü 95°C 15 sn denatürasyon, 65°C 50 sn bağlanma ve uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Analiz eş zamanlı olarak FAM kanalında *S. Gallinarum*/*Pullorum*, HEX kanalında ise IAC hedefli reaksiyonların olduğu qPCR yapılarak geliştirildi.

Real time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanarak değerlendirildi. Sigmaoidal eğriye sahip ve Ct ≤ 37'de belirgin logaritmik faz gösteren amplifikasyon doğrudan pozitif olarak değerlendirildi.

FAM kanalında gerçekleştirilen reaksiyonların her ikisi de pozitif sonuçlanırsa; DNA'nın *S. Gallinarum* biovar *Gallinarum*, *S. Pullorum*/*Gallinarum* (SP/SG) hedefi pozitif, nonspesifik hedef negatif sonuçlanırsa; DNA'nın *S. Pullorum*'a olduğu sonucuna varıldı. Her iki reaksiyonun da negatif sonuçlanması halinde, negatif örneğin *S. Pullorum* veya *S. Gallinarum* olmadığı sonucuna varıldı.

**Tablo 1.** qPCR amplifikasyon kurulum bileşenleri

	qPCR Bileşenleri				
	IAC	G/P	non-spesifik	negatif kontrol	pozitif kontrol
Renksiz 2X qPCR mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Oligomix ( <i>S. Gallinarum</i> /Pullorum)	-	3 µL		3 µL	3 µL
Oligomix (non-spesifik)	-	-	3 µL	-	-
Oligomix (IAC)	3 µL	-	-	-	-
Negatif kontrol	-	-	-	2 µL	-
Non-spesifik DNA	2 µL	2 µL	2 µL	-	-
<i>S. Gallinarum</i>	-	-	-	-	2 µL
IAC	1 µL	-	-	-	-
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>11 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>	<b>10 µL</b>

qPCR: Kantitatif real-time PCR; IAC: İnternal kontrol; G/P: Gallinarum/Pullorum

**Spesifite ve sensitivitenin tespiti:** Metodun spesifite ve sensitivitesi iki aşamada yapıldı; Birinci aşamada *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* standart suşlara ait DNA'ların 10 katlı dilüsyonları yapıldı. İkinci aşamada ise 12 adet *S. Liverpool*, 11 adet *S. Virchow*, 10 adet *S. Enteritidis*, *S. Infantis* ve *S. Anatum*, 5 adet *S. Senftenberg* ve *S. Agona*, 1 adet *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Avibacterium paragallinarum* suşlarına ait DNA'lar ile İnfeksiyöz Bronşitis (IB) ve Newcastle hastalığı (ND) viruslarına ait RNA'lar kullanıldı. Her iki aşamada kullanılan tüm DNA(sulandırmalar dahil) ve RNA'lara qPCR tekniği uygulandı.

**qPCR tekniğinin validasyonu:** Validasyon çalışması için Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları biriminin katılmış olduğu uluslararası yeterlilik-karşılaştırma testlerinde (ring test) kullanılan 10 adet *S. Gallinarum* suşu kullanıldı.

## Bulgular

**qPCR metodu:** Standart suşların tamamı qPCR PCR ile de *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* olarak doğrulandı. Reaksiyonda negatif kontrol olarak kullanılan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ile yapılan qPCR'de amplifikasyon eğrisi göstermedi. Yapılan testler sonucunda internal kontrol primerlerinin inhibitörleri ortaya koymada başarılı olduğu belirlendi.

**Spesifite ve sensitivitenin belirlenmesi:** Metodun ilk aşamasında, DNA konsantrasyonlarındaki azalmayla birlikte Ct değerlerinde de kademeli olarak azalma belirlendi. qPCR sonucunda elde edilen Ct değerleri tablo 2'de gösterildi.

İkinci aşamada test edilen ve hedef dışı olan bakteri suşları ve virüslere ait DNA/RNA'lar ile yapılan qPCR çalışmasında sigmoidal eğriye rastlanılmadı.

**Tablo 2.** qPCR sonucunda elde edilen Ct değerleri

Biovar adı	Sulandırma oranı	G/P	Non-spesifik	IAC
<i>S. Gallinarum</i>	10 <sup>0</sup>	17,53	15,75	+
	10 <sup>-1</sup>	21,03	19,49	+
	10 <sup>-2</sup>	24,7	22,73	+
	10 <sup>-3</sup>	27,94	26,05	+
	10 <sup>-4</sup>	31,01	29,33	+
<i>S. Pullorum</i>	10 <sup>0</sup>	18,43	N/A	+
	10 <sup>-1</sup>	21,88	N/A	+
	10 <sup>-2</sup>	25,25	N/A	+
	10 <sup>-3</sup>	28,59	N/A	+
	10 <sup>-4</sup>	31,52	N/A	+
Negatif Kontrol	-	N/A	N/A	+

**Geliştirilen qPCR metodunun validasyonu:** Ring testte kullanılmış olan *S. Gallinarum* 10 adet suşla optimizasyon çalışması yapıldı. Hem SP/SG

hedefi hem de nonspesifik hedefinde sigmoidal eğriler görüldüğü için 10 adet suşun *S. Gallinarum* olduğu belirlendi.

## Tartışma ve Sonuç

*S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* hareketsiz, konak spesifik ve genetik olarak birbiriyle yakın ilişkili olan biovarlardır (Löfstrom ve ark. 2010; Feng ve ark. 2013). Bu iki patojenin neden olduğu hastalık tablosu ve salgın nedenli oluşan hayvan ölümleri, ekonomik kayıplar ve diğer ülkelere yayılma riski nedeni ile Salgın Hastalıkları Ofisi (OIE) bildirim zorunlu hastalıklar içerisinde (OIE 2018). Tüm bu nedenler gözönüne alındığında *S. Gallinarum*/*Pullorum*'un teşhisinin ve biovarların birbirinden ayrımının erken dönemde ve doğru yapılabilmesi, ticari kanatlı işletmelerindeki uygulanacak kontrol stratejilerinin ortaya konması açısından önemli olmaktadır (Rubio ve ark. 2017).

*S. Gallinarum*/*Pullorum*'un moleküler tanısı için PCR temelli birçok çalışma bulunmaktadır (Christensen ve ark. 1993; Kisiela ve ark. 2005; Xiong ve ark. 2017). Günümüzde modern tanı metotları içerisinde değerlendirilen real-time PCR, kolaylıkla araştırmacılar ve rutin tanı laboratuvarlarında ulaşılabilir olmuştur. Bununla birlikte, bu teknik için spesifik problemlerin ve primerlerin tasarımı, genomik dizilerinin varlığına ve biyoinformatik analizine bağlı olduğundan dolayı uzmanlık gerekmektedir (Rubio ve ark. 2017).

Bu çalışmada, geliştirilen real-time PCR tekniğinin ilk aşaması hedef genlerin seçilmesidir. Bu amaçla *S. Gallinarum*/*Pullorum* için GenBank'ta bulunan gen diziler incelendi. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da paralellik gösteren ornitin dekarboksilaz (*speC*) ve glikojen biyosententez (*glgC*) hedefli genler belirlendi (Kang ve ark. 2011, 2012). Bu gen bölgeleri haricinde farklı çalışmalarda *fimH* (Kisiela ve ark. 2005), *fliB* ve *fliC* (Paiva ve ark. 2009), *fliB* (Xiong ve ark. 2017), *ipaJ* (Xu ve ark. 2018) genleri hedefleyen moleküler metotlar kullanılarak *S. Gallinarum*/*Pullorum* tanısı yapılmıştır. Çalışmada geliştiren qPCR metodunda kullanmak üzere biovarlara ve internal kontrol primerlerinin öncelikle *in-silico* analizleri daha sonra laboratuvar ortamında *in-vitro* etkinlik testleri gerçekleştirildi. Bu durum her bir biovarın spesifik teşhisi için kulla-

nılan metottan elde edilen sonuçların kapsamlı analizini ve validasyonunu göstermektedir.

Ülkemizde kanatlı hayvanlarda (tavuk, hindi ve kafes kuşları) *Salmonella*'ların moleküler teşhisi için geliştirilen tanı yöntemleri çoğunlukla patojenin cins düzeyi için tercih edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda *invA*, *iroB* genlerinin hedef alındığı PCR, multipleks PCR ve qPCR metotları geliştirilmiş ve bu teşhis metotlarının hız, sensitivite, spesifikite, tekrarlanabilirlik açısından önemli avantajlar sağladığı sonuçlarına varılmıştır (Çarli ve ark. 2001; Eyigör ve Çarli 2003, 2007; Sareyyüopoğlu ve Cantekin 2009).

Bu çalışmada geliştirilen *S. Gallinarum*/*Pullorum* qPCR tanı kiti hem teşhise hem de biovarlar arasında ayrımı yapabildi. qPCR metodu iki gene dayandırıldı ve yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığı belirlendi. Çalışmanın validasyonu amacıyla Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kanatlı Hayvan Hastalıkları biriminden temin edilen 10 adet *S. Gallinarum*'un amplifikasyonunda hem SP/SG hedefi hem de nonspesifik hedefinde sigmoidal eğriler görüldü. Standart *S. Pullorum* suşlarıyla yapılan çalışmalarda SG/SP hedefinde sigmoidal eğriler görülürken nonspesifik hedefinde sigmoidal eğrilere rastlanılmayarak suşların bu yöntemle de *S. Pullorum* olduğu belirlendi. Bu çalışma benzer primer dizileri kullanılan *S. Gallinarum*/*Pullorum* ayrımına yönelik yaptıkları konvansiyonel dupleks PCR çalışmalarıyla paralellik göstermiştir (Kang ve ark. 2011, 2012). Bu çalışma için tasarlanmış olan probun özgül bir şekilde, standart eğrilerle, geniş bir dinamik aralıkta doğru bir şekilde *S. Gallinarum*/*Pullorum* ayrımını gerçekleştirdiği ve ölçülebildiği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum* ve biovar *Pullorum*'un tanısını koymak ve birbirinden ayırmak için *glgC* ve *speC* gen bölgeleri hedef alan qPCR tanı kiti geliştirildi. Geliştirilen kit, biovar *Gallinarum* ve biovar *Pullorum*'u (%100 duyarlılık) doğru bir şekilde tanımladı ve hedef dışı olan suşlar (% 100 özgüllük) negatif olarak tespit etti. Bu tanı kiti ile veteriner tanı laboratuvarlarında Kanatlı tifosu ve *Pullorum* hastalığının hızlı şekilde ayırıcı tanısı yapılabilecektir.



## Kaynaklar

- Akan M. (2008). Kanatlılarda *Salmonella* infeksiyonları ve kontrolünde temel prensipler. *Mektup Ankara*. 6, 3-4.
- Barrow PA, Freitas Neto OC. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol*. 40: 1-13.
- Berchieri JRA, Murphy CK, Marston K, Barrow PA. (2001). Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol*. 30, 229-239.
- Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK, Render DG. (2007). A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food-animal matrices. *J Food Prot*. 70, 1080-1087.
- Christensen JP, Olsen JE, Hansen HC, Bisgaard M. (1992). Characterisation of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathol*. 21,461-470.
- Christensen JP, Olsen JE, Bisgaard M. (1993). Ribotypes of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. *Avian Pathol*. 22,725-738.
- Çarlı KT, Ünal CB, Caner V, Eyigör A. (2001). Detection of *Salmonella* chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 39, 1871-1876.
- Dorak TM. (2007). Real-Time PCR. New York, NY, USA: Taylor&Francis.
- Eyigor A, Carli KT. (2003). Rapid detection of *Salmonella* from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. *Avian Dis*. 47, 380-386.
- Eyigor A, Carli KT. (2007). A PCR-ELISA for the detection of *Salmonella* from chicken intestine. *J Biol Environ Sci*. 1, 45-49.
- Ellingson JL, Anderson JL, Carlson Sa, Sharma VK. (2004). Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol Cell Prob*. 18, 51-57.
- Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. (2006). Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J Microbiol Methods*. 66, 538-547.
- Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Rådström P, De Medici D, Abdulmawjood A, Fach P. (2003). Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *J Clin Microbiol*. 41, 5835.
- Feng Y, Johnston RN, Liu G, Liu S. (2013). Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction. *PLoS ONE*. 8, 1-6.
- ISO. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (ISO 6579:2002/A1:2007). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. (2012). Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique (EN ISO/TS 6579-2). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. (2001). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infect Immun*. 69, 5471-5476.
- Josefsen MH, Krause M, Hansen F, Hoorfar J. (2007). Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Appl Environ Microbiol*. 73, 3040-3048.
- Kang MS, Kwon YK, Jung BY, Kim A, Lee KM, An BK, Song EA, Kwon JH, Chung, GS. (2011). Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. *Vet Microbiol*. 147, 181-185.
- Kang MS, Kwon YK, Kim HR, Oh JY, Kim MJ, An BK, Shin EG, Kwon JH, Park CK. (2012). Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet Microbiol*. 160, 491-495.
- Kisiela D, Kuczkowski M, Kiczak L, Wieliczko A, Ugorski M. (2005). Differentiation of *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum from *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum by PCR-RFLP of the *fimH* gene. *J Vet Med B*. 52, 214-218.
- Le Minör L. (1992). The Genus *Salmonella*. In: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application, Ed.: Balows A, Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. 2nd Ed., Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 2760-2774.
- Löfström C, Hansen F, Hoorfar J. (2010). Validation of a 20-h real-time PCR method for screening of *Salmonella* in poultry faecal samples. *Vet Microbiol*. 144, 511-514.
- Malorny B, Paccasoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol*. 70, 7046-7052.
- OIE. (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Fowl Typhoid and Pullorum Disease, Bölüm 2.3.11.
- Paiva JB, Cavallini JS, Silva MD, Almeida MA, Angela HL, Berchieri JA. (2009). Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. *Brazilian J Poult Sci*. 11, 271-276.
- Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, Smedt JD, Zutter LD. (1999). Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *Int J Food Microbiol*. 46, 37-44.

28. Rubio S, Antonio R, Penha, C, Maria A, Almeida D, Junior AB. (2017). Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum*. *Avian Pathol.* 46, 644-651.
29. Sareyyüpoğlu B, Cantekin Z. (2009). Use of a multiplex-polymerase chain reaction for detection of *Salmonella* and *Chlamydophila psittaci* from caged birds. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 56, 269-273.
30. Shivaprasad HL. (2008). Pullorum disease and fowl typhoid Y.M. Siaf (Ed.), Diseases of poultry, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 568-582.
31. Schoder D, Schmalwieser A, Schaubberger G, Kuhn M, Hoorfar J, Wagner M. (2003). Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clin Chem.* 49, 960-963.
32. Soria MC, Soria MA, Bueno DJ. (2012). Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poult Sci.* 91, 616-626.
33. Trabulsi LR, Edwards PR. (1962). The differentiation of *Salmonella Pullorum* and *Salmonella Gallinarum* by biochemical methods. *Cornell Vet.* 52, 563-569.
34. Xiong D, Song L, Tao J, Zheng H, Zhou Z, Geng S, Pan Z, Jiao X. (2017). An efficient multiplex PCR-based assay as a novel tool for accurate inter-serovar discrimination of *Salmonella* Enteritidis, *S. Pullorum/Gallinarum* and *S. Dublin*. *Front Microbiol.* 8,420-429.
35. Xu LJ, Liu ZJ, Li Y, Yin C, Hu YC, Xie XL, Li QC, Jiao XA. (2018). A rapid method to identify *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum using a specific target gene ipaJ. *Avian Pathol.* 47, 238-44.