

**İMMUNOMANYETİK AYIRMA (IMA) YÖNTEMİ İLE
GIDALARDAN**

***Salmonella* spp. İZOLASYONU**

ISOLATION OF *Salmonella* spp.

FROM FOODS BY USING

IMMUNOMAGNETIC SEPARATION (IMS) METHOD

123367

BİRCE MERCANOĞLU

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

GIDA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı İçin öngördüğü

YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

123367

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda**
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
Prof. Dr. Kamuran AYHAN

Üye (Danışman)

.....
Doç. Dr. S. Aykut AYTAÇ

Üye

.....
Doç. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen
yukarıdaki jüri üyeleri tarafından tarihinde kabul edilmiştir.

...../...../.....

.....
Prof. Dr. Seyfi KULAKSIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

İMMUNOMANYETİK AYIRMA (IMA) YÖNTEMİ İLE GIDALARDAN *Salmonella* spp. İZOLASYONU

Birce Mercanoğlu

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

ÖZ

Son yirmi senedir, mikroorganizmaların gıdalardan ayrılması ve yoğunlaştırılmasında, analiz süresini hızlandırmak ve hedef mikroorganizmaların belirlenmesi ve izolasyonunu kolaylaştırmak amacı ile hızlı teknikler rutin olarak uygulanmaktadır. Gıdalardan belirli mikroorganizmaların ayrılması için kullanılan immunomanyetik ayırma (IMA) yöntemi de, bu tekniklerden biridir.

Bu çalışmada ilk olarak, anti-*Salmonella* küreciklerinin özgünlüğü incelenmiş ve ardından *Salmonella* kontaminasyonu açısından risk taşıdığı düşünülen 50 adet gıda örneği ve yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneğinden *Salmonella* spp. izolasyonu amacı ile, anti-*Salmonella* küreciklerinin kullanıldığı IMA yöntemi-çekirdek metodu ve geleneksel kültürel bir metot olan ISO 6579 referans metodu karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca *Salmonella enteritidis*, anti-*Salmonella* kürecikleri ve *S. enteritidis*+anti-*Salmonella* kompleksleri, atomik kuvvet mikroskobu (AKM) kullanılarak görüntülenmiştir.

Sonuç olarak; IMA yöntemi-çekirdek metodu, doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinin 14'ünün *Salmonella* ile kontamine olduğunu belirleyebilmişken, ISO 6579 referans metodu 12 adedini belirleyebilmiştir. Ayrıca 10^3 kob/mL seviyesinde *S. enteritidis* inokülasyonu gerçekleştirilen 14 adet gıda örneği arasında IMA yöntemi-çekirdek metodu, ISO 6579 referans metoduna göre 1 adet daha fazla *Salmonella* pozitif örnek belirlemiştir.

Bu verilere istatistiksel analizler uygulandıktan sonra, IMA yöntemi-çekirdek metodu ile geleneksel ISO 6579 referans metodu arasında önemli fark olmadığı belirlenmiştir. Ancak IMA yönteminin, ISO 6579 referans metoduna oranla hızlı ve yüksek duyarlılıkta olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, immunomanyetik ayırma (IMA), ISO 6579, gıda, atomik kuvvet mikroskobu

Danışman: Doç. Dr. S. Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

ISOLATION OF *Salmonella* spp. FROM FOODS BY USING IMMUNOMAGNETIC SEPARATION (IMS) METHOD

Birce Mercanoglu

Hacettepe University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department

ABSTRACT

In the last twenty years, rapid techniques for the separation and concentration of microorganisms from foods are routinely applied in order to increase the speed of analysis and ease of isolation and detection of target microorganisms. One recent example of such technique is the immunomagnetic separation (IMS) method that has been used for the separation of specific microorganisms from foods.

In this study, firstly the specificity of Dynabeads® anti-*Salmonella* has been examined and then IMS-core method that uses Dynabeads® anti-*Salmonella* has been investigated in order to isolate *Salmonella* spp. from 50 food samples having the contamination of *Salmonella* risk and 14 spiked food samples in parallel with the traditional cultural method that is ISO 6579 reference method. Also *Salmonella enteritidis*, anti-*Salmonella* beads and the *S. enteritidis*+Dynabeads® anti-*Salmonella* complexes have been visualised by atomic force microscopy (AFM).

As a result, IMS enabled the detection of 14 *Salmonella* positive samples from the 50 naturally contaminated food samples examined whereas ISO 6579 reference method enabled 12 *Salmonella* positive samples. Furthermore, in 14 food samples inoculated with 10^3 cfu/mL of *S. enteritidis*, IMS-core method isolated one more *Salmonella* positive sample than the traditional ISO 6579 reference method.

After applying statistical analysis to these datas, this IMS-core method showed no difference in performance with the traditional ISO 6579 reference method. But IMS method was found as a rapid and a highly sensitive method than the ISO 6579 reference method.

Keywords: *Salmonella*, immunomagnetic separation, ISO 6579, food, atomic force microscopy

Advisor: Assoc. Prof. S. Aykut AYTAC, Hacettepe University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında bilgisi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, karşılaştığım sorunların çözümünde yardımlarını esirgemeyen, her zaman ilgisi ve desteği ile yanımda olan ve bu ilgi ve desteğini hiçbir zaman kaybetmek istemeyeceğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. S. Aykut AYTAÇ'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

AKM çalışmalarını TAEK Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (ANAEM)'de gerçekleştirme olanağını sağlayan Sayın Doç. Dr. İsmail ERCAN ve AKM çalışmalarını beraber yürüttüğümüz TAEK ANAEM Malzeme Araştırma Bölümü Başkanı Sayın Dr. Erdal TAN'a,

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapılması aşamasında değerli görüş ve katkıları ile beni yönlendiren Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümü'nden Sayın Yrd. Doç. Canan HAMURKAROĞLU'na,

Bu çalışmada kullanılan bakterilerin bazılarının temininde yardımını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. A. Gülşen HASÇELİK'e,

Bu çalışmada kullanılan Oxoid *Salmonella* lateks aglütinasyon test materyalinin temininde yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a,

Tez çalışmamın her aşamasında beni gönülden destekleyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ'a,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Ayla ŞENER'e,

Bu çalışma boyunca karşılaştığım sorunları benimle paylaşan, çözümüne yardımcı olan ve her zaman manevi destek veren dostum Sayın Araş. Gör. Sanem YALÇINTAŞ'a,

Yoğun çalışma günlerimde büyük özveri gösteren Uzman Dr. M. Ali ERGÜN'e,

Ve hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmam sırasında da karşılıksız sevgi ve destek bulduğum sevgili annem, babam ve teyzeme

içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Birce MERCANOĞLU

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Gıda örnekleri	20
3.1.2. Kültürler	20
3.1.3. Dilüsyon sıvıları ve tampon çözeltiler	21
3.1.4. Boya çözeltileri	21
3.1.5. İndikatör ve ayıraçlar	21
3.1.6. Besiyerleri	21
3.1.7. IMA yöntemi deney düzeneği	22
3.1.8. İmmunomanyetik partiküller	22
3.1.9. AKM deney düzeneği	22
3.2. Metot	23
3.2.1. Partikül özgünlüğü	23
3.2.2. Doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerinin IMA yöntemi-çekirdek metodu ve ISO 6579 referans metodu için hazırlanması	24
3.2.3. Yapay olarak kontamine edilen gıda örneklerinin IMA yöntemi-çekirdek metodu ve ISO 6579 referans metodu için hazırlanması	24
3.2.4. ISO 6579 referans metodu	25
3.2.5. IMA yöntemi-çekirdek metodu	25
3.2.6. Tanımlama ve doğrulama analizleri	28
3.2.7. İstatistik analizleri	28
3.2.8. AKM ile görüntü eldesi	28
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	30
4.1. Partikül Özgünlüğüne İlişkin Sonuçlar	30

4.2. Doğal Olarak Kontamine Olmuş Gıda Örneklerine İlişkin Sonuçlar	33
4.3. Yapay Olarak Kontamine Edilen Gıda Örneklerine İlişkin Sonuçlar	37
4.4. AKM ile Görüntü Eldesine İlişkin Sonuçlar	42
5. ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	52
EKLER DİZİNİ	60
EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN DİLÜSYON SIVILARI ve TAMPON ÇÖZELTİLER	60
EK 2. ÇALIŞMADA KULLANILAN BOYA ÇÖZELTİLERİ	61
EK 3. ÇALIŞMADA KULLANILAN İNDİKATÖR ve AYIRAÇLAR	62
EK 4. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ	64
ÖZGEÇMİŞ	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Gıdalardan <i>Salmonella</i> hücrelerinin belirlenmesi için kullanılan, ISO'nun önerdiği, klasik kültürel yöntem	10
Şekil 2.2. Hedef mikroorganizmaların direkt ve indirekt IMA tekniği ile yakalanması	14
Şekil 2.3. AFM'nin şematik görünümü	18
Şekil 3.1. IMA düzeneğindeki örnek karıştırıcısı	22
Şekil 3.2. IMA düzeneğindeki manyetik tutucu ve çubuğu	22
Şekil 3.3. IMA yönteminin çalışma mekanizması	26
Şekil 3.4. IMA yönteminin uygulama basamakları	27
Şekil 4.1. <i>S. enteritidis</i> 'in topografik görüntüsü	43
Şekil 4.2a. <i>S. enteritidis</i> 'in boyut analizi (boy)	44
Şekil 4.2b. <i>S. enteritidis</i> 'in boyut analizi (en)	45
Şekil 4.3. anti-Salmonella küreciklerinin topografik görüntüsü	46
Şekil 4.4. anti-Salmonella küreciklerinin boyut analizi	47
Şekil 4.5a. <i>S. enteritidis</i> +anti-Salmonella komplekslerinin topografik görüntüsü (İki anti-Salmonella küreciğine tutunmuş bir <i>S. enteritidis</i>)	48
Şekil 4.5b. <i>S. enteritidis</i> +anti-Salmonella komplekslerinin topografik görüntüsü (Bir anti-Salmonella küreciğine tutunmuş <i>S. enteritidis</i> 'ler)	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. CDC'ye göre <i>Salmonella</i> kabilesinin bugünkü sınıflandırılması	4
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan 64 adet gıda örneği	20
Çizelge 3.2. Tipik <i>Salmonella</i> kültürlerinin bazı doğrulama testlerinde oluşturduğu reaksiyonların sonuçları	29
Çizelge 4.1. Enterobacteriaceae ailesine ve farklı ailelere ait bazı bakteriler ile yapılan anti- <i>Salmonella</i> partikül özgünlüğü deneme sonuçları	30
Çizelge 4.2. Bazı <i>Salmonella</i> türleri ile yapılan anti- <i>Salmonella</i> partikül özgünlüğü deneme sonuçları	32
Çizelge 4.3. Doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerine ilişkin sonuçlar	34
Çizelge 4.4. Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinde ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodunun karşılaştırılması	36
Çizelge 4.5. Yapay olarak kontamine edilen gıda örneklerine ilişkin sonuçlar	38
Çizelge 4.6. Yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneğinde ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodunun karşılaştırılması	39

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı hastalıklar, günümüz dünyasının en yaygın problemlerinden biridir. Gıda zehirlenmelerinin mikrobiyal kökenli olmayan nedenleri, zehirli hayvanlar, zehirli bitkiler, ağır metaller, pestisidler ve herbisidler veya belirli gıdalara karşı alerji ya da duyarlılık gibi faktörleri içermektedir. Mikrobiyal gıda zehirlenmeleri ise, bakteriyel, viral, fungal veya protozoal kökenli olmaktadır (Mansfield and Forsythe, 2000a).

Günümüzde insanların karşı karşıya kaldığı en büyük tehlikenin; ağır metal, pestisid ve herbisid kalıntıları hatta gizli alerjenler değil, gıdalarda bulunan patojenler olduğu bildirilmektedir (<http://www.cdc.gov/pulsenet>).

Patojenler, insan sağlığı için ciddi tehlikelere neden olmakla birlikte, önemli ekonomik kayıplara da yol açmaktadırlar. Patojenler ile kontamine olmuş gıdaların ihraç edilmesinin mümkün olmadığı, ürünün imha edilmek zorunda kalındığı ya da denetim mekanizması yetersiz olan ülkelerde iç pazarda tüketime sunulduğu belirtilmektedir. Bu da, büyük ekonomik kayıplara ve insan sağlığı yönünden ciddi tehlikelere yol açmaktadır.

Hastalık Denetimi ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) tarafından rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklar konusundaki veriler, 1999 yılındaki 10 209 adet enfeksiyon vakasına bakteriyel ajanların neden olduğunu göstermektedir. Bu vakaların 1031'indeki etyolojik ajanın ise, *Salmonella* olduğu belirtilmiştir (Bohra, 2000). 1998 yılında İngiltere ve Galler'de, 93 932 adet gıda zehirlenmesi vakası görülmüş ve bunların 23 000'inin *Salmonella* türleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Mansfield and Forsythe, 2000a). CDC, 1988 ile 1992 yılları arasındaki 2177 adet vakadan da *Salmonella* türlerinin sorumlu olduğunu ve bu vakaların temel nedeninin *Salmonella enteritidis* olduğunu açıklamıştır (Sharp and Reilly, 2000). Bean et al. (1997), 1983 ile 1987 yılları arasındaki bakteriyel ajanların sorumlu olduğu salgınlara %57'sinin de *Salmonella* kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir.

Klasik kültürel yöntemler ile bu patojenin gıdalardan izolasyonu, oldukça uzun bir süre almakta ve yoğun bir işgücü gerektirmektedir. Gıdaların çoğunun sınırlı raf ömürleri nedeni ile, klasik kültürel yöntemler ile izolasyon işlemi tamamlanmadan

bu gıdaların tüketildikleri ya da raf ömürlerini tamamladıkları belirtilmiştir (Cudjoe et al., 1994a; Malkova et al., 1998; Peng and Shelef, 1999) .

Gıdaların bakteriyel kontaminasyonu sonucu gıda zehirlenmelerinin artması ve bu zehirlenme vakalarının sıklıkla açıklanması, tüketicilerin, gıda işletmecilerinin ve bazı yasal kurumların kaygılarını arttırmıştır. Salmonellaların kümes hayvanı etlerini kontamine etme sıklığının artması nedeni ile, kümes hayvanı etleri ve ürünleri çoğu gıda zehirlenmelerinden sorumlu tutulmaktadır. 1997 yılının başlarından itibaren Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kümes hayvanı üreticileri, ürünleri için, *Salmonella* miktarı ve sıklığını belirten standartlara ihtiyaç duymuşlardır. Bu olay, kümes hayvanlarını kontamine eden patojenlerin belirlenmesi için hızlı ve güvenilir tekniklerin geliştirilmesini hızlandırmıştır. Gıda kaynaklı patojenlerin belirlenmesi için daha iyi tekniklerin geliştirilmesi, gıda ürünlerinin güvenilirliğinin tam olarak değerlendirilmesi ve üretim sırasında ya da işletmede patojen sayısını azaltmak için kullanılan önlemlerin etkinliği, gıdadaki patojenlerin gelişimi ve ekolojisi için önemlidir (Mandrel and Wachtel, 1999).

Son yıllarda gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılabilecek daha hızlı ve güvenilir teknikler geliştirilmiştir. Immunomanyetik ayırma (IMA) yöntemi de, bu tekniklerden biridir.

Bu çalışmada; IMA yönteminin, gıdalardan *Salmonella* izolasyonunda, ISO 6579 referans metoduna oranla daha hızlı ve etkili olup olmadığının incelenmesinin yanı sıra *S. enteritidis*'in atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ile görüntülenerek boyut analizinin yapılması amaçlanmaktadır. Bir başka deyişle; IMA yöntemi sırasında anti-Salmonella küreciklerince tutulan *Salmonella* hücrelerinin (AKM) ile görüntüleri elde edilerek, bu iki yöntemin birlikte kullanılması ile, Salmonellaların çok daha kısa sürede ve düşük hata olasılığı ile tanımlanması hedeflenmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Günümüzde eğitim ve yasal yollardaki yeni düzenlemeler ile gıda hijyeninde gözlenen gelişmelere karşın Salmonellalar, gıda zehirlenmelerine neden olan başlıca mikroorganizmalardır (Mansfield and Forsythe, 1996).

Salmonella, Enterobacteriaceae ailesindeki Salmonelleae kabilesinin tek bir cinsidir. *Salmonella* cinsi adını, Amerikalı bir veteriner olan Daniel E. Salmon'dan almıştır. Taksonomide bu cinsin sınıflandırılma ve adlandırılmasının defalarca değiştirildiği ancak, halen, tam olarak kesinlik kazanmadığı belirtilmektedir (Cox, 1999).

Salmonella cinsindeki bakteriler, lipopolisakkarit O (somatik) ve protein H (kirpik) antijenlerinin farklılıkları temeline dayanılarak, 1926 yılında White'ın düzenlediği ve 1972 ile 1978 yılları arasında Kauffmann'ın genişlettiği şemaya göre serotiplere ayrılmaktadırlar (Erdem, 1999). *Salmonella* cinsi içinde, antijence farklı, yaklaşık 2400 serotip tanımlanmaktadır (Anon., 1996a; Garcia-del Portillo, 2000; Mansfield and Forsythe, 2000a). İlk olarak bazı araştırmacılar *Salmonella* cinsini, biyokimyasal özelliklerine göre, *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* ve *S. enteritidis* olmak üzere 3 türe ayırmayı önermişlerdir. Bu sınıflandırmaya göre, *S. typhi* ve *S. choleraesuis* türleri yalnızca birer serotip içermekte ve bilinen 2400'e yakın serotip ise *S. enteritidis* içinde yer almaktadır (Örneğin; *S. enteritidis* serotip *typhimurium*, *S. enteritidis* serotip *heidelberg*). Daha sonra, DNA analizleri ile çeşitli serotipler arasında %61 ile %100 oranlarında DNA benzerliği gösterildiği için, bütün Salmonellaları tek tür içinde toplamak ve biyokimyasal özelliklerine göre alt türlere ayırmak eğilimi doğmuştur. Günümüzde *Salmonella* ve *Arizona* cinsleri, DNA benzerlikleri nedeni ile, *Salmonella* cinsi içinde toplanmışlar ve çeşitli fenotipik özellikleri ile DNA benzerliklerine bakılarak 7 alt gruba ayrılmışlardır (Çizelge 2.1). *Salmonella* alt grupları, alt tür olarak kabul edilmektedirler. İnsanlarda ve sıcak kanlı hayvanlarda enfeksiyona yol açan en yaygın serotipler ise, alt tür l'e aittirler. CDC'nin önerisi ile, farklı serotiplerin farklı epidemiyolojileri olması gözönüne alınarak, günlük kullanımda her *Salmonella* serotipi, tür adı gibi adlandırılmaktadır. Bir başka deyişle, *S. enteritidis* serotip *typhimurium*, kısaca *S. typhimurium* olarak kullanılmaktadır (Erdem, 1999).

Çizelge 2.1 : CDC'ye göre Salmonelleae kabilesinin bugünkü sınıflandırılması (Erdem, 1999)

CDC: 1989	
Cins	
<i>Salmonella</i>	
<u>Alt grup 1 suşları</u>	<u>Alt grup 3b suşları</u>
Çoğu serotipler	<i>S. diarizonae</i>
<i>S. typhi</i>	
<i>S. choleraesuis</i>	<u>Alt grup 4 suşları</u>
<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. houtenae</i>
<i>S. gallinarum</i>	<u>Alt grup 5 suşları</u>
<i>S. pullorum</i>	<i>S. bongori</i>
<u>Alt grup 2 suşları</u>	<u>Alt grup 6 suşları</u>
<i>S. salamae</i>	<i>S. choleraesuis subsp indica</i>
<u>Alt grup 3a suşları</u>	
<i>S. arizonae</i>	

Salmonella serotipleri adlarını, yaptıkları hastalıktan (*S. enteritidis*), izole edildiği hayvandan (kümes hayvanlarından) (*Salmonella gallinarum* ve *Salmonella pullorum*), izole edildiği hayvandan ve hastalıktan (*Salmonella typhimurium* ve *S. choleraesuis*), izole eden araştırmacıdan (*Salmonella schottmülleri*), izole edildiği ülkeden (*Salmonella panama*), izole edildiği bölgeden (*Salmonella kentucky*), izole edildiği şehirden (*Salmonella istanbul*) ve izole edildiği hastaneden (*Salmonella virchow*) almaktadırlar (Cox, 1999).

Salmonellalar, 0.7-1.5 µm eninde ve 2.5 µm boyunda, çubuk şeklinde, kapsül ve spor oluşturmayan, Gram-negatif ve fakültatif anaerobik bakteriler olarak karakterize edilmektedirler. Bunlar, *S. gallinarum* ve *S. pullorum* hariç, peritriş kirpikler sayesinde hareket edebilmektedirler. Ancak, hareketli *Salmonella* türlerinin bazı mutantları hareketsizdir (Cox, 1999).

Salmonellalar, fermentatif mikroorganizmalardır. Başta glukoz olmak üzere arabinoz, maltoz, mannitol, mannoz, ramnoz, sorbitol, ksiloz ve diğer birçok karbonhidratı ve polihidroksi alkolü fermente ederek sadece asit ya da asit ile beraber gaz da oluşturabilen bakterilerdir. Ancak *S. typhi*, hiçbir zaman gaz

retmez. Salmonellalar, ayrıca, oksidaz negatif, katalaz ve lizin pozitif, nitratı nitrite indirgeyebilen, safra tuzlarını tolere edebilen ve üreyi hidrolize edemeyen bakteriler olarak da tanımlanmaktadır (Garcia-del Portillo, 2000).

Salmonellalar mezofilik bakteriler olup, optimum gelişme sıcaklıkları 35-43°C arasındadır. Gelişme hızlarının, 10°C'nin altında ve 50°C'nin üzerinde büyük ölçüde azaldığı saptanmıştır (D'Aoust, 2000). Soğuga çok dirençli mikroorganizmalar olmalarına karşın, canlılıklarının -2°C ile -10°C'ler arasında gerçekleştirilen donma işlemi sırasında azaldığı belirtilmektedir (Garcia-del Portillo, 2000). Salmonellalar ısıl işleme dirençsiz mikroorganizmalar olduklarından dolayı, 55°C'de 1 saatte, 60°C'de 20 dakikada ölmektedirler (Erdem, 1999). Isıl işlem dirençlilikleri ise, gıdanın su aktivitesi (a_w) değeri azalırken artar, fakat gıdanın pH değeri artarken yükselir (D'Aoust, 2000).

Salmonellaların gelişebildikleri optimum pH 6.5-7.5 arasında olup, pH 4.0'ın altında ve pH 9.0'ın üzerinde gelişme hızları azalmaktadır. Salmonellaların hidroklorik, sitrik ve laktik asitlerin bulunduğu ortamlarda pH 4.0 dolaylarında rahatlıkla gelişebildikleri ancak asetik, propiyonik ve bütirik asit gibi bakteristatik asitlerin bulunduğu ortamlarda daha yüksek pH değerlerinde gelişebildikleri belirtilmektedir (Garcia-del Portillo, 2000).

Su aktivitesinin Salmonellaların gelişimi üzerindeki etkisine bakıldığında, bakterilerin kuru koşullara dayanıksız mikroorganizmalar olmalarından dolayı, gıdalarda en düşük 0.94 su aktivitesi değerinde gelişebildikleri görülmektedir (D'Aoust, 2000). Halofilik olmayan bu patojenin NaCl'e toleransı gözönüne alındığında ise, %3-4 NaCl derişiminde *Salmonella* gelişiminin büyük ölçüde engellendiği belirtilmektedir (Cox, 1999).

Doğrudan temas ettiklerinde Salmonellalar dezenfektanlara çok duyarlıdırlar. Ancak, dışkı parçaları ve diğer organik maddeler içindeki Salmonellalara karşı, dezenfektanların etkisiz kaldığı bildirilmektedir (Erdem, 1999).

1970'lerin başından beri Salmonellalarda, antibiyotiklere karşı giderek artan oranda bir direnç geliştiği bildirilmektedir. Bunun en önemli sebebi, besi hayvanlarına büyümelerinin hızlanması amacı ile birçok antibiyotiğin verilmesi olarak açıklanmaktadır. Son yıllarda, büyük ölçüde, tetrasiklinlere, ampisilin,

gentamisin, kanamisin, streptomisin, sulfonamid, kloramfenikol ve siprofloksasine karşı *Salmonellalarda* direnç belirlenmeye başlanmıştır (http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm).

Salmonellaların radyasyona direnci ise, fazla yüksek değildir. Yapılan çalışmalarda, 0.1-0.5 Mrad arasındaki ışınlama uygulamalarında tavuk eti, domuz kıyması ve yumurtada *Salmonella* sayısının önemli derecede azaldığı veya tamamen yok edildiği belirtilmiştir (Karapınar ve (Aktuğ) Gönül, 1998).

Salmonellaların çevrede yaygın olarak bulunmaları ve insanlar tarafından tüketilen gıdaların elde edildiği hayvanlarda gelişebilmeleri, bu bakterilerin neden olduğu hastalıkları yok edilmesi en zor ve en önemli hastalıklar olarak tanımlamaktadır (Garcia-del Portillo, 2000).

Salmonella enfeksiyonları, salmonellozis olarak bilinen bir dizi hastalığa yol açmaktadır. Salmonellozis enterik enfeksiyon olup, iki ana gruba ayrılmaktadır:

1. Kırıklık, halsizlik, iştah kaybı, baş ağrısı ve ürpermeler ile başlayan, yüksek ateş, karında gaz toplanması, dalak ve karaciğerin büyümesi, genellikle kabızlık bazen de diyare ile kendini gösteren, kuluçka süresi 7 ile 21 gün arasında değişen tifo ve paratifodur. Tifo ve paratifo yapan serotipler, *S. typhi* ve *Salmonella paratyphi* dir.
2. Bulantı, baş dönmesi, fenalık hissi ve kusma ile başlayan, diyare, karın ağrısı ve kas krampları ile kendini gösteren, kuluçka süresi 2 ile 48 saat arasında değişen enterokolitdir (Luk and Lindberg, 1991; Anon., 1996a; Mansfield and Forsythe, 1996; Bohra, 2000; Li et al., 2000). Enterokolite neden olan serotipler, *S. enteritidis* ve *S. typhimurium*'dur. *S. enteritidis*'in rapor edilen ciddi komplikasyonları, akut böbrek yetmezliği, osteomyelit (kemik iliği iltihabı), menenjit (beyin ve omurilik zarı iltihabı) dir (Garcia-del Portillo, 2000; Mansfield and Forsythe, 2000a).

Salmonellalar mide asidine (pH<1.5) duyarlı olmalarına karşın gıdalar ile alındıklarında, mideyi geçerek ince barsağa ulaşırlar ve buradaki safra ve peptonlu maddeler içinde kolaylıkla gelişirler. Enfeksiyonun oluşmasında, alınan bakteri sayısının önemi büyüktür. 10 ile 10⁶ org/g-mL arasında değişen bakteri sayısının,

gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (Bohra, 2000; Mansfield and Forsythe, 2000a). Salmonellaların enfektif dozu, büyük ölçüde alınan bakteri sayısına bağlı olmakla beraber, alınan *Salmonella* suşuna, tüketilen gıda tipine ve enfekte olan bireyin toleransına da bağlıdır. Kabul edilen 2400 *Salmonella* serotipinin hemen hemen hepsinin gıda zehirlenmesine neden olduğu bilinmekte ancak enfeksiyona neden olan suşların %95'inin bu serotiplerden 40'ını, özellikle de A-E serogruplarını içerdiği belirtilmektedir (Mansfield and Forsythe, 2000a). Salgınlara sebep olan düşük enfektif doz içeren gıdaların, yüksek lipid miktarı içerdikleri görülmüştür. Buna bağlı olarak, Salmonellaların lipid miselleri içerisinde lokalize oldukları ve mide asidine daha dirençli bir yapı oluşturdukları belirtilmektedir (Garcia-del Portillo, 2000; Mansfield and Forsythe, 2000a). Salmonellalar özellikle bağışıklık yetmezliği bulunan bireylerde, bebeklerde ve yaşlılarda virulanslıklarının artması ile ölümlere neden olabilmektedirler (Erdem, 1999).

Salmonellaların virulanslığının, dokuya invazivliği sağlayan faktörlere, yüzey antijenlerine, endotoksinlere, sitotoksinlere ve enterotoksinlere bağlı olduğu belirtilmektedir. Endotoksinler, Salmonellaların hücre duvarındaki lipopolisakkaritlerde (LPS) bulunmaktadır. LPS molekülündeki polisakkarit kısım, O antijenlerini oluşturmaktadır. Lipid A kısmı ise, patojenin endotoksininin toksik özelliklerinden sorumludur. Salmonellaların konakçıda reseptörlere bağlanmaları ve hücre içerisinde gelişmeleri, O antijenlerinin yan zincirleri ile ilişkilidir. O antijenlerinin yan zincirlerinde bozukluk olan R (rough-düzgün olmayan) kolonili suşlar avirulan olmasına karşın, S (smooth-düzgün) kolonili suşlar virulandır. Polisakkarit Vi (kapsül) antijeni taşıyan *S.typhi* suşları ise, daha virulandır. Çünkü bu antijen, serumun bakterisidal etkisini azaltmakta ve bakterinin makrofaj içerisinde öldürülmesini engellemektedir. *Escherichia coli*'nin LT (labile toxin-ısıya duyarlı toksin) ve ST (stable toxin-ısıya dayanıklı toksin)'lerinin benzeri olan enterotoksinler, *Salmonella* suşlarının çoğunda da belirlenmişlerdir. Ayrıca *S. choleraesuis* ve *S. enteritidis*'in bol miktarda sitotoksin salgıladıkları ancak *S.typhi*'nin az miktarda sitotoksin salgıladığı da bilinmektedir. Salmonellaların konakçıya başarılı bir şekilde girişi ve yaşamını sürdürmesinin, barsak mukozasından demiri tutma becerisine ve taşıdıkları plazmidlere de bağlı olduğu belirtilmektedir. Çünkü bu plazmidler, antimikrobiyal ilaçlara karşı direnci kodlayan

genleri ve çeşitli virulans özellikleri kodlayan genleri taşımaktadırlar (Erdem, 1999; Li, 1999; Bohra, 2000; D'Aoust, 2000).

Salmonellalar, evrensel olarak, zoonotik ajanlar olarak kabul edilmektedirler. Birçok gıda, özellikle de fekal kontaminasyona uğramış çiğ veya az pişmiş hayvansal gıdalar ve sular, bu patojenleri insanlara taşıyan araçlar olarak kabul edilmektedirler (Cox, 1999). *S. typhi* ve *S. paratyphi*, sadece insanlara özgü türler olup, insanlarda enfeksiyona yol açmakta ancak *Salmonella dublin* sığırlarda, *S. gallinarum* ve *S. pullorum* kümes hayvanlarında, *Salmonella abortusovis* koyunlarda ve *S. choleraesuis* domuzlarda enfeksiyona neden olarak sürü sağlığını ve ürün verimini olumsuz yönde etkilemektedirler. Bu türler dışında *Salmonella derby*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Salmonella virchow* türleri ve özellikle de *S. enteritidis* PT4 ve *S. typhimurium* DT104 suşları insan ve hayvanlarda en yaygın rastlanan Salmonellozis etkenleri olarak bilinmektedirler (Karapınar ve (Aktuğ) Gönül, 1998; Mansfield and Forsythe, 2000a).

Alt yapının yeterli ve sağlıklı olmadığı yerlerde kanalizasyon sularının içme ve kullanma sularına karışması sonrası bu suların içilmesi veya bu sular ile sulanan meyve ve sebzelerin çiğ olarak yenmesi sonucu enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Salmonellaların insanlara bulaşmasına neden olan gıdalar arasında en başta, kümes hayvanları etleri ve yumurtalar gelmektedir. Bunların dışında kırmızı etler, süt ve süt ürünleri de önemli bulaş kaynakları olabilmektedirler (Pang et al., 1995; Ripabelli et al., 1997; Shaw et al., 1998; Peng and Shelef, 1999; Velazquez et al., 2000).

Gıda endüstrisinde Salmonellalar, çoğunlukla, kümes hayvanları etlerinin işlendiği sektörde başgöstermektedirler. 1985 ile 1991 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yumurtaların, %82 oranında *S. enteritidis* içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca *S. enteritidis* PT4, ilk kez 1985 yılında, İngiltere'de sıvı yumurtadan izole edilmiştir (Cox, 1999).

ABD'de meydana gelen bir Salmonellozis salgınında, yaklaşık 360 000 kişinin, bir süt ürünleri firması tarafından üretilen pastörize sütlerdeki *Salmonella* kontaminasyonundan etkilendikleri bildirilmiştir (Li, 1999). 1994 yılında ABD'de 224 000 kişiyi etkileyen Salmonellozis salgınının, *S. enteritidis* içeren dondurmanın

tüketimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hammack et al., 1999). 1996 yılında, çoğu 7 yaşının altında olan 48 çocuğu etkileyen salgının ise, *S. virchow* ile kontamine olmuş toz çocuk mamasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Li, 1999).

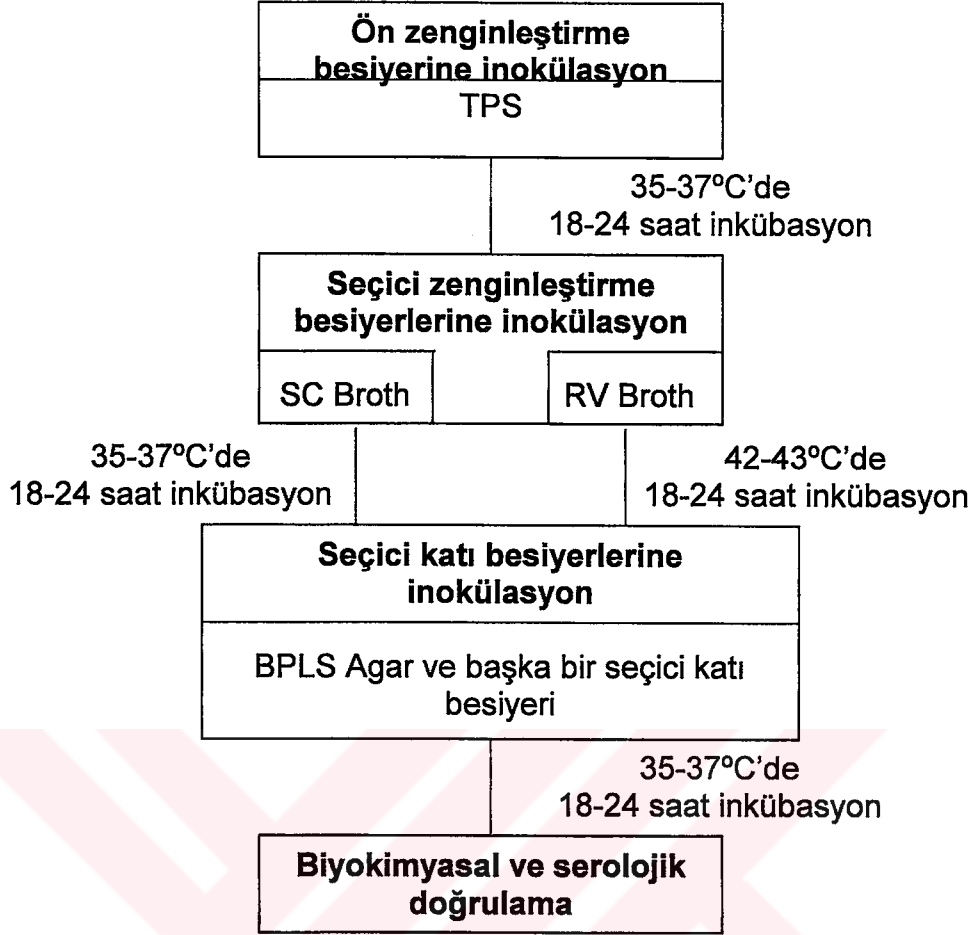
Düşük pH değerine sahip olması nedeni ile, portakal suyu muhtemel bir *Salmonella* salgını aracı olarak görülmemektedir. Ancak 1995 yılındaki Salmonellozis salgınının kaynağı, pastörize edilmemiş portakal suları olarak bilinmektedir (Velazquez et al., 2000; Hammack et al., 2001).

Salmonella ile doğal olarak kontamine olmuş gıdalarda bu bakterinin sayısı çok düşük miktarlarda olabileceği için, bu patojenlerin gıdalardan izole edilebilmeleri oldukça zor bir işlemdir. Buna ek olarak, gıdalarda bulunan rekabetçi bakterilerin sayısının da yüksek olması, Salmonellaların gıdalardan izole edilebilme şanslarını büyük ölçüde azaltmaktadır (Mansfield and Forsythe, 2000a).

Kontaminasyon düzeyine bakılmaksızın gıdalarda herhangi bir *Salmonella* varlığının görülmesi sakıncalı olduğundan, 1990 tarihli Birleşik Krallık Gıda Güvenliği Yasası (UK Food Safety Act), 25 gram gıda örneğinde *Salmonella* bulunmaması gerektiğini belirtmiştir. Bu nedenle, *Salmonella* izolasyonu ve belirleme yöntemlerinin, gıda maddesinin 25 gramında bulunabilecek bir tek *Salmonella* hücrelerini bile belirleyebilmesi gerekmektedir (Andrews, 1985; Bennett et al., 1997; Trkov et al., 1999; Mansfield and Forsythe, 2000a).

Gıdalarda *Salmonella* hücrelerinin belirlenmesi için kullanılan klasik kültürel yöntemler (Şekil 2.1), 4 ana basamak içermektedir:

1. Ön zenginleştirme: Hasar görmüş ve stres altındaki tüm mikroorganizmaların kendilerini onarmalarına olanak sağlayan basamaktır. Uluslararası Standardlar Örgütü (International Standards Organisation-ISO) bu basamakta, 25 gram ya da 25 mL gıda örneğinin, ön zenginleştirme besiyeri olarak kullanılan 225 mL tamponlanmış peptonlu su (TPS) içerisinde homojenize edilmesini ve 35-37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmasını önermektedir. Ancak, farklı izolasyon yöntemlerine ve farklı gıda gruplarına göre değişik ön zenginleştirme besiyerleri kullanılmaktadır.



Şekil 2.1 : Gıdalarda *Salmonella* hücrelerinin belirlenmesi için kullanılan, ISO'nun önerdiği, klasik kültürel yöntem (Patel, 1994)

2. Seçici zenginleştirme: *Salmonella* dışındaki diğer rekabetçi mikroorganizmaların sayılarının azaltılmasına, ancak *Salmonella*ların gelişimlerinin arttırılmasına ve çoğalmalarına olanak sağlayan basamaktır. ISO bu basamakta, 0.1 mL ve 10 mL ön zenginleştirme kültürünün sırasıyla 10 mL Rappaport Vassiliadis Broth (RV Broth) ve 100 mL Selenit Sistin Broth (SC Broth) seçici zenginleştirme besiyerlerine inoküle edilmesini ve yine sırasıyla 42-43°C'de ve 35-37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmalarını önermektedir. Ancak, farklı izolasyon yöntemlerine göre değişik seçici zenginleştirme besiyerleri kullanılmaktadır.
3. İzolasyon: Seçici katı besiyerleri kullanılarak, şüpheli *Salmonella* izolatlarının elde edilmesine olanak sağlayan basamaktır. ISO bu basamakta, Brilliant Green Fenol Red Laktoz Sukroz Agar (BPLS Agar) ile birlikte başka bir seçici katı besiyerinin (Bizmut Sülfid Agar (BS Agar), Harlequin *Salmonella* ABC

(Freeman Formülasyonu) Agar, Hektoen Enterik Agar (HE Agar), Ksiloz Lizin Deoksiçolat Agar (XLD Agar), Rambach Agar ya da Salmonella Shigella Agar (SS Agar)) kullanılmasını önermektedir.

4. Doğrulama: Şüpheli *Salmonella* izolatlarının bir dizi biyokimyasal ve serolojik test kullanılarak, *Salmonella* pozitif olup olmadıklarının doğrulanması basamağıdır (Vermunt et al.,1992; Mansfield and Forsythe, 1993; Molla et al., 1994; Safarik et al., 1995; Bennett et al., 1997; Ripabelli et al., 1997; Rijpens et al., 1999; Ripabelli et al., 1999; Mansfield and Forsythe, 2000a).

Klasik kültürel yöntemler Salmonellaların seçici katı besiyerlerinde görülebilir koloniler halinde çoğalmalarına dayandığı için, bir gıda örneğinde Salmonellaların tahmini olarak belirlenmesi, 4 gün ve elde edilen izolatların *Salmonella* pozitif olup olmadıklarının doğrulanması ise, 7 gün gibi uzun bir süre gerektirmektedir. Bu zaman sürecinde çok fazla miktarda gıda üretilmekte ve depolanmaktadır. Aynı zamanda, kısa raf ömürlü gıda ürünleri sonuçlar alınmadan tüketilebilmektedir. Bir başka deyişle, klasik kültürel yöntemler, gıdalardan Salmonellaların belirlenmeleri ve tanımlanmaları için gerekli olan süreyi uzatmakta ve bu da klasik kültürel yöntemlerin, rutin analizler için uygun olmayan ve pahalı yöntemler olarak tanımlanmalarına yol açmaktadır (Andrews, 1985; Widjoatmodjo et al., 1991; Cudjoe et al., 1994a; Coleman et al., 1995a; Hanai et al., 1997; Malkova et al., 1998; Mandrell and Wachtel, 1999; Peng and Shelef, 1999; D'Aoust, 2000).

Hızlı yöntemler, uygulamalı mikrobiyolojinin dinamik bölümünü oluşturmaktadırlar. Bu yöntemler klinik, çevre ve gıda örneklerinden immunolojik, moleküler biyolojik, mikrobiyolojik, biyokimyasal ve biyofiziksel teknikler kullanılarak, mikroorganizmaların ve onların metabolitlerinin saptanmalarına ve tanımlanmalarına yönelik olarak uygulanmaktadırlar (Özbaş ve Aytaç, 2000).

Salmonellaların neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkları önleyebilme olasılığını arttırmak için, bu patojenlerin gıdalardan izolasyonunda bir çok hızlı yöntem geliştirilmiştir. Ancak, bu hızlı yöntemlerden pek azı, basit ve pahalı olmayan teknikler kullanarak, yüksek bir duyarlık sağlayabilmişlerdir (Vermunt et al., 1992; Hanai et al., 1997; De Boer and Beumer, 1999; Che et al., 2000; Garcia-del Portillo, 2000). Blackburn (1991), immunoloji, moleküler biyoloji ve mikrobiyoloji

dallarına dayalı immunomanyetik ayırma (IMA) yönteminin, karışık mikroorganizma yükü olan ortamlar içerisindeki hedef hücrelerin ayrılmasında hızlı olup ayrıca basit, ucuz ve yüksek duyarlıkta bir yöntem olduğunu belirtmiştir (Shaw et al., 1998).

IMA yöntemi, ön zenginleştirme besiyerinden immunolojik olarak ayrılmış olan *Salmonellaların* direkt olarak seçici katı besiyerlerine inokülasyonuna imkan sağlayarak, RV Broth ve SC Broth gibi seçici zenginleştirme besiyerlerinin yerini aldığından hızlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Luk and Lindberg, 1991; Skjerve and Olsvik, 1991; Parmar et al., 1992; Vermunt et al., 1992; Mansfield and Forsythe, 1993; Molla et al., 1994). IMA sadece hızlı bir yöntem olmakla kalmayıp, şüpheli *Salmonella* izolatlarının, çoğunlukla *Salmonella* pozitif olarak doğrulandığı oldukça özgün bir yöntem olarak belirtilmektedir (Cudjoe et al., 1994a). Ayrıca, IMA yöntemi ile, hasar görmüş ya da stres altında kalmış *Salmonella* hücrelerinin de izole edilebildiği bildirilmektedir (Mansfield and Forsythe, 1993).

IMA, karışık ve yoğun mikroflora içeren bir gıda örneğinden hedeflenen mikroorganizmayı yakalayabilen ve daha ileriki testlerde kullanılmak üzere küçük hacimlere yoğunlaştırabilen (Cudjoe et al., 1995; Fratamico and Crawford, 1999; Safarik and Safarikova, 1999), çapları 2.8 µm, 4.5 µm veya 5.0 µm olan (De Boer and Beumer, 1999; Anon., 2000a) homojen, polistiren mikroküreciklerin kullanımını içermektedir. Bu kürecikler kendilerini süperparamanyetik hale getiren, yani manyetize olabilme özelliklerini yalnızca dışarıdan uygulanan manyetik bir alan varlığında gösterebilen ancak bu manyetik alan uzaklaştırıldığında derhal bu özelliğini yitiren, demir oksit taneciklerinden oluşmaktadırlar (Safarik et al., 1995; Molla et al., 1996). Bu özellik, bir dış manyetik alan olmadığında, küreciklerin birbirlerini çekmeyerek başlangıçta homojen bir karışım içinde bulunmalarını ancak manyetik ayırıcı ile bu karışımdan kolaylıkla ayrılabilmelerini sağlamaktadır (Kronick and Gilpin, 1986; Hardwick et al., 1990; Safarik et al., 1995; De Boer and Beumer, 1999; Safarik and Safarikova, 1999).

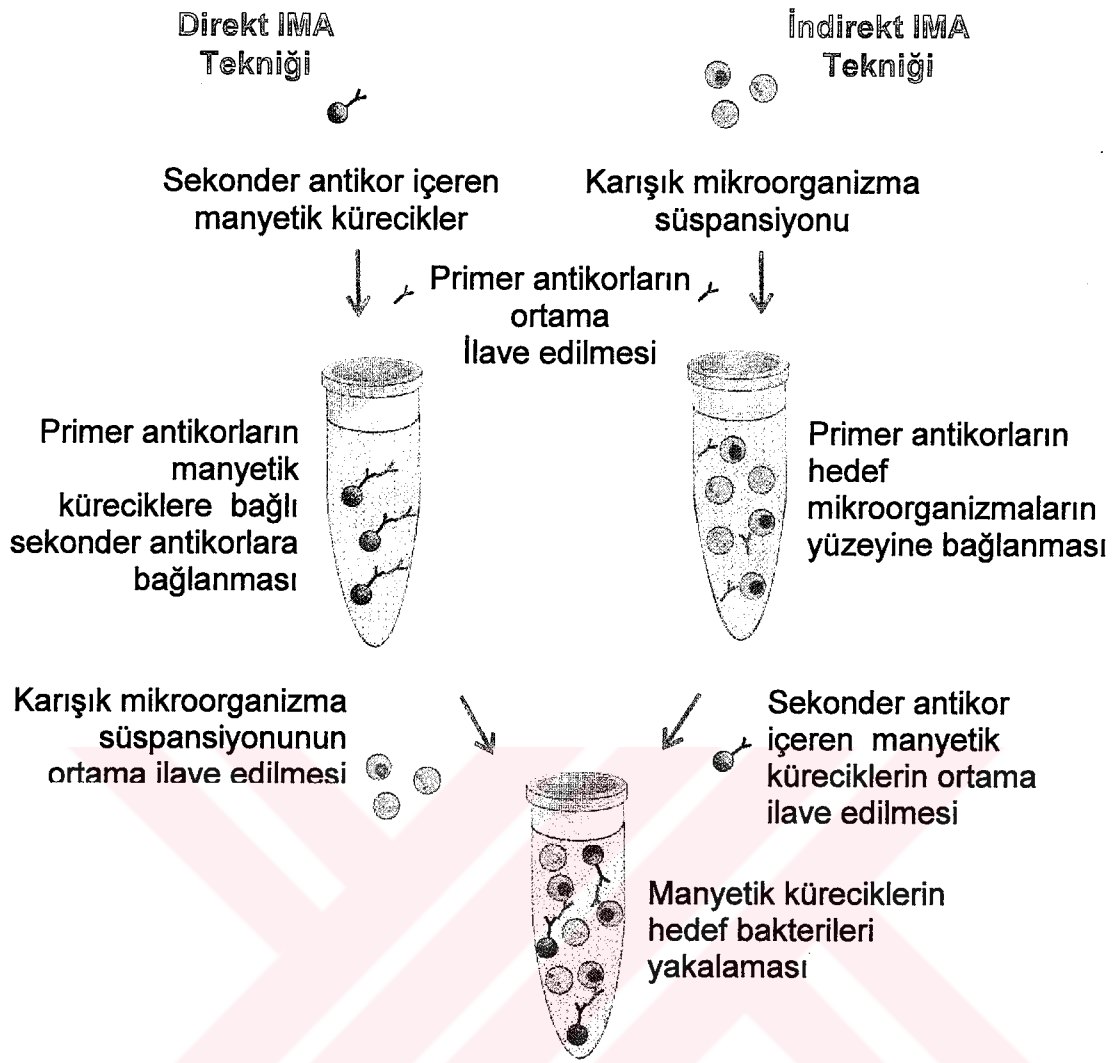
IMA yönteminde kullanılan küreciklerin, tek boyutlu makro gözenekli polistiren boncuklardan oluştuğu belirtilmektedir. Bu boncuklar, yüzeylerindeki makro gözeneklerin içerisinde bulunan gamma-Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ gibi materyallerin oluşumu ile manyetize olmaktadır (Anon., 1996b; Anon., 1998a; Safarik and

Safarikova, 1999). Boncukların yüzeyi, manyetize özellikteki çekirdek bölgesini saran ve ona çeşitli moleküller ile birleşebilmesi ya da çeşitli molekülleri adsorbe edebilmesi için belirli bir yüzey alanı kazandıran polimer, hidrofobik bir tabaka ile kaplanmıştır (Safarik et al., 1995; Özbaş ve Aytaç, 2000). Boncukların yüzeyindeki bu polimer tabaka hedef mikroorganizmaları, demir ile direkt olarak temaslarından doğabilecek muhtemel toksik etkilerden korumakta ve aynı zamanda hidrofobik özelliğinden dolayı, hedef mikroorganizmaların küreciklerin yüzeyine kolaylıkla adsorbe olmalarını sağlamaktadır (De Boer and Beumer, 1999; Safarik and Safarikova, 1999). Boncukların çok hassas bir şekilde belirlenmiş olan homojen büyüklükleri ve şekilleri, fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı bir sistemin oluşmasına imkan tanımaktadır. Bu homojen yapı, kürecikler ile hedef mikroorganizmaların aralarındaki reaksiyon kinetiğinin optimum olmasını sağlamakta ve dolayısıyla hızlı ve etkin bir bağlanma gerçekleşebilmektedir. Boncukların küresel yapısı da, kimyasal aglütinasyon ve özgül olmayan bağlanmayı en aza indirmektedir (Anon., 1996b; Anon., 1998a; Anon., 1998b; Anon., 2000a; Anon., 2002).

IMA yönteminde, çoğunlukla, Dynal firması tarafından üretilen manyetik ya da manyetize olabilen kürecikler kullanılmaktadır. Örneğin; Dynabeads® M-280 küreciğinin yüzey alanı $4-8 \text{ m}^2/\text{g}$, yoğunluğu 1.3 g/cm^3 , demir içeriği %12 (w/v) ve $1.0 \text{ mg}'ı$ içerisindeki parçacık sayısı $6-8 \times 10^{10}$ olarak bilinirken, Dynabeads® M-450 küreciğinin yüzey alanı $1-4 \text{ m}^2/\text{g}$, yoğunluğu 1.5 g/cm^3 , demir içeriği %20 (w/v) ve $1.0 \text{ mg}'ı$ içerisindeki parçacık sayısı 1.4×10^{10} olarak bilinmektedir. (Anon., 1996b; Anon., 1998a; Anon., 2002). Dynabeads® M-500 küreciğinin yüzey alanı ise $7.0 \times 10^{-4} \text{ m}^2/10^7$ parçacık, yoğunluğu 1.5 g/cm^3 ve demir içeriği %20 (w/v) olarak belirtilmektedir (Anon., 1998b; Anon., 2000a).

Hedef mikroorganizmaların immunomanyetik ayırımı iki şekilde gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.2):

1. Direkt IMA tekniği: Bu teknikte, hedef mikroorganizma için özgün olan immunomanyetik kürecikler, karışık mikroorganizma süspansiyonu ile karıştırılmakta ve uygun bir inkübasyon süresinin ardından immunomanyetik olarak küreciklere bağlanmış olan hedef mikroorganizmalar, manyetik bir ayırıcı ile bu süspansiyondan ayrılmaktadırlar. Geriye kalan sıvı ise



Şekil 2.2 : Hedef mikroorganizmaların direkt ve indirekt IMA tekniği ile yakalanması (Anon., 1998b)

uzaklaştırılmakta ve tutulmuş olan manyetik kürecik peleti uygun bir tampon çözelti ile birkaç kez yıkanmaktadır.

2. **İndirekt IMA tekniği:** Direkt IMA tekniğine alternatif olarak kullanılan bu teknikte ise, karışık mikroorganizma süspansiyonuna önce primer antikor eklenmekte ve bu antikorların hedef mikroorganizma yüzeyine bağlanmalarının ardından, sekonder antikor içeren manyetik kürecikler ortama ilave edilmektedir. Primer ve sekonder antikorlar arasındaki etkileşimin ardından, tüm kompleks manyetik bir ayırıcı yardımı ile süspansiyondan ayrılmaktadır (Safarik et al., 1995; Safarik and Safarikova, 1999).

IMA yöntemi, *Staphylococcus aureus* (Johne et al., 1989), *E. coli* (Lund et al., 1988), *Listeria monocytogenes* (Skjerve et al., 1990; Li et al., 2000), *Escherichia*

coli O157:H7 (Okrend et al., 1992; Yu and Bruno, 1996; Akdemir Evrendilek et al., 2001; Chandler et al., 2001), *Escherichia coli* O26 ve *Escherichia coli* O111 (Safarikova and Safarik, 2001), *Vibrio parahaemolyticus* (Tomoyasu, 1992), *Yersinia enterocolitica* (Kapperud et al., 1993), *Clostridium perfringens* (Cudjoe et al., 1991), *Mycobacterium* türleri (Flygare and Larsson, 1987), *Saccharomyces cerevisiae* (Birnbaum and Larsson, 1982) ve *Salmonella* türleri gibi hem birçok mikroorganizmanın izolasyonu hem de *Staphylococcus* ve *C. perfringens* gibi mikroorganizmaların enterotoksinlerinin (Patel, 1994) belirlenmesi amacı ile kullanılmaktadır.

Bu konudaki ilk çalışmalar, Salmonellaların gıdalardan ve fekal örneklerden immunomanyetik ayırımı amacı ile başlamıştır (Mattingly, 1984). Daha sonra Bird et al (1989), anti-Salmonella antikoları ile kaplı manyetik kürecikleri kullanarak, ön zenginleştirme besiyerlerinden Salmonellaların yakalanmasını sağlamışlardır (Safarik et al., 1995). 1990 yılında ise Lin ve Ko isimli iki araştırmacı, anti-sıçan antikoları ile kaplanmış Dynabeads® ve anti-Salmonella antikoları ile kaplanmış lateks parçacıklarını kullanmışlardır. 1991 yılında da Luk ve Lindberg isimli iki araştırmacı, *Salmonella* lipopolisakkaritinin O antijenine özgü antikolar ile kaplanmış manyetik kürecikler ile çalışmışlardır. Daha çok klinik alanda sürdürülen bu çalışmaların ardından, IMA'nın gıda mikrobiyolojisindeki ilk uygulaması Skjerve ve Olsvik isimli iki Norveç'li araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunlar, Brie (Kuzey Fransa'da yapılan tuzlu ve yumuşak bir peynir çeşidi), süt tozu, yoğurt, et ve sebzelerden *Salmonella* hücrelerini 1.0×10^2 hücre/g seviyesinde ayırabildiklerini belirtmişlerdir (Safarik et al., 1995).

Salmonellaların gıda örneklerinden izolasyonunda klasik kültürel yöntemler ile IMA'nın karşılaştırılması ilk kez, büyük ölçekli olarak, 1993 yılında gerçekleştirilmiştir (Mansfield and Forsythe, 1993). 120 adet gıda örneğinde gerçekleştirilen bu çalışmada, anti-Salmonella küreciklerinin kullanıldığı IMA yönteminin, klasik kültürel yöntemlerde çok yaygın olarak kullanılan SC Broth, Muller-Kauffmann Tetratyonat Broth (TT Broth) ve RV Broth kadar etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, toplam izolasyon süresinin yaklaşık 1 gün kısaldığı da belirtilmiştir. Cudjoe et al., (1994a) ise, 180 adet kümes hayvanı etleri üzerinde, Dynabeads® anti-Salmonella ile klasik seçici zenginleştirme basamaklarının

etkinliğini karşılaştırmışlar ve Dynabeads® anti-Salmonella teknolojisinin klasik seçici zenginleştirme basamaklarından daha üstün olduğu sonucuna varmışlardır.

IMA yöntemi, klasik doğrulama yöntemleri (biyokimyasal ve serolojik testler) ile beraber kullanılabildiği gibi, polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction-PCR) veya ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemleri ile beraber de kullanılabilmektedir (Mansfield and Forsythe, 2000a). IMA yöntemi ile beraber kullanılan PCR tekniğinde hem seçici sıvı ve katı besiyerlerine hem de biyokimyasal ve serolojik testlere gerek duyulmadığından, hedef hücrelerin izolasyonu 48 saat gibi kısa bir süreye indirilebilmektedir (Widjoatmodjo et al., 1991; Rijpens et al., 1999; Trkov et al., 1999). Malkova et al. (1998), 25 gramında tek bir *S. enteritidis* hücresi olacak şekilde yapay olarak kontamine ettikleri yumurtadan, IMA ve ELISA yöntemlerini birarada kullanarak, 25 saat gibi kısa bir sürede ve yüksek duyarlıkta *S. enteritidis* izole etmeyi başarmışlardır. Mansfield and Forsythe (2000b) ise, 25 gramında 2 *Salmonella* hücresi olacak şekilde yapay olarak kontamine ettikleri yağsız süt tozundan, IMA ve ELISA yöntemlerini birarada kullanarak, 21 saat gibi kısa bir sürede Salmonellaları izole edebildiklerini belirtmişlerdir.

Günümüzde halen, Salmonellalar da dahil olmak üzere, patojen bakterilerin hızlı bir şekilde belirlenebilmesi için alternatif yöntemler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmaların belli bir alanı da, bakterilerin gelişmiş mikroskopik yöntemler ile belirlenmesini içermektedir .

Mikrobiyologlar, yıllar boyu birçok yöntem kullanarak, mikrobiyal hücreleri araştırmışlardır. İlk olarak 1668 yılında, Antony van Leeuwenhoek isimli Hollandalı bir araştırmacının basit ışık mikroskopunu bulması ile, mikroorganizmalar incelenmeye başlanmıştır (Dufrêne, 2001). Basit ışık mikroskopunun kullanımı çok yüksek nitelikli konveks cam merceklerle dayandığından, ışık ışınlarının yaklaşık 0.2 µm'ye karşılık gelen kırınım limiti, mikroorganizmaların bazı yapılarının gösterilmesinde yetersiz kaldığı için araştırmacılar bu konuda da farklı arayışlar içine girmişlerdir (Edstrom et al., 1990).

Bu arayışların sonucunda, 1933 yılında, elektron demetinin incelenen örneğin içinden geçerek görüntü oluşturduğu ve aynı zamanda ilk elektron mikroskobu

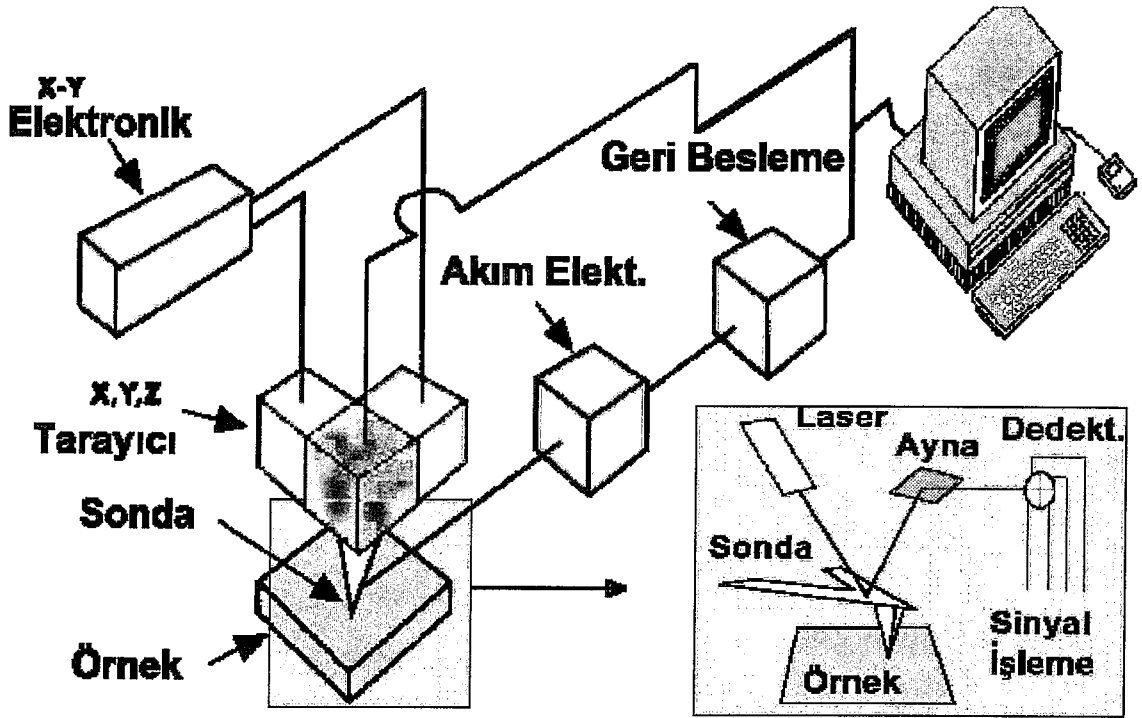
olan Transmisyon Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope-TEM) geliştirilmiş ve hücre yapılarının görüntülenmesi sağlanmıştır. 1942 yılında ise, cisimlerin yüzeyini incelemek üzere, Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) bulunmuştur. Ancak, yüksek akımlı elektronların kısa dalga boylarına sahip olmalarına karşın, yüksek vakuma ihtiyaç duymaları ve dolayısıyla da incelenen örneğe zarar verebilmelerinden ötürü, elektron mikroskoplarının kullanımı sınırlanmıştır (Edstrom et al., 1990).

Binnig ve Rohrer isimli iki araştırmacı, 1982 yılında, ilk taramalı sonda mikroskobu olan Taramalı Tünelleme Mikroskobu'nu (Scanning Tunneling Microscope-STM) bulmuşlardır. Taramalı sonda mikroskoplarından biri olan Atomik Kuvvet Mikroskobu-AKM (Atomic Force Microscope-AFM) ise, 1986 yılında geliştirilmiştir (Binnig et al., 1986). Taramalı sonda mikroskoplarının gelişmesi ile birlikte, atomik düzeylerde büyütme ve çözünürlük ile çalışılmaya başlanmıştır. Örneğin, AKM'nin angstrom düzeyinde çözünürlük elde etme özelliği nedeni ile, incelenen yüzeyin atomik yapısı anlaşılabilir (Ergün, 1999).

Taramalı sonda mikroskopları, çok ince bir sondanın incelenecek örnek yüzeyine yakın bir mesafede hareket ettirilmesi ve bunun sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi ilkesine göre çalışmaktadırlar. Sonda, örnek yüzeyi üzerinde hareket ederken, yüzeyde bulunan mikroskobik boyuttaki girinti ve çıkıntıları algılamaktadır. Sondanın, piezzo elektrik kristalleri aracılığı ile sağlanan, x, y ve z eksenleri yönündeki yukarı ve aşağı doğru, örneğin yüzey özelliklerine bağlı olarak yapmış olduğu hareketleri, örneğin üç boyutlu görüntüsünün işlendiği bilgisayara sinyal olarak gönderilmektedir (Anon., 1994).

AKM ile inceleme yapılırken, sonda ve örnek yüzeyi arasında nano-Newton düzeyinde sabit bir kuvvet uygulanmaktadır. Sonda örnek yüzeyine yaklaştırıldığı zaman, ilk olarak, uzak etkileşim kuvvetleri olan Van der Waals kuvvetleri etkin olmaktadır. Sondanın daha da yaklaştırılması ile, sonda ve örnek yüzeyindeki atomların orbitallerindeki elektronların neden olduğu atomik kuvvetler etkin olmaya başlamaktadır (Ergün, 1999).

Sadece 1-2 μm uzunluğa sahip olan bu sonda, çok hassas esneklikte ve yaklaşık 100-200 μm uzunlukta olan tutucu bir kola yerleştirilmiştir (Bowen et al., 1999).



Şekil 2.3 : AFM'nin şematik görünümü (Tan, 2001)

Örnek yüzeyine sabit bir kuvvet ile basan bu kol, sondanın örnek yüzeyinde dolaşırken karşılaştığı yüzey özelliklerine bağlı olarak aşağı ve yukarı doğru hareket etmektedir. Şekil 2.3'deki sistemde lazer ışığı, kolun ucuna düşürülerek, bir ayna aracılığı ile dedektöre gönderilmektedir. Bundan dolayı, bu kolun en küçük bir hareketi bile dedektöre yansıyan lazer ışığındaki yer değiştirme olarak algılanmakta ve üçüncü boyut olarak tanımlanmaktadır. Dedektörün çıkış voltajı, hem sondaya sabit bir kuvvet uygulanması için piezzo elektrik kristallerine verilen voltaj ile hem de hata sinyali ile karşılaştırılarak, geri besleme sinyali olarak, kullanılmakta ve sonraki düzeltmeler yapılmaktadır. Tarama sırasında kaydedilen x, y ve z değerleri bir sayısal sinyal işlemci yardımı ile doğrudan bilgisayar ekranına gönderilmektedir. Böylelikle örneğin cinsinden, bir başka deyişle, iletken, yalıtkan ya da yarı-iletken özelliğinden bağımsız olarak, örneğin üç boyutlu görüntüsü elde edilebilmektedir (Tan, 2001).

AKM'de kullanılan sondanın bağlı olduğu esnek kol, 0.001 ile 100 N/m arasında değişen yay sabitine sahiptir. Sonda ucunun tarama sırasında örneğe uyguladığı kuvvetin 10^{-11} ile 10^{-6} N arasında olmasından dolayı da, örneğe zarar verilmeden inceleme yapılabilir.

AKM'ler, kontakt ve kontakt olmayan olarak adlandırılan iki ayrı şekilde çalışmaktadır:

- 1) Kontakt modda: Burada, sonda örnek yüzeyi ile temas halindedir. Bu sırada iyonik itme kuvvetleri etkili olmakta ve yüzey topolojisi hakkında bilgi vermektedir.
- 2) Non-kontakt modda: Burada, sondanın ucu ve örnek arasındaki uzaklık yaklaşık, 10 ile 100 nm arasındadır. Bir başka deyişle sonda, örnek yüzeyi ile temas etmemektedir. Bu sırada Van der Waals ve kapiler kuvvetler etkili olmaktadır. Bu yöntem, daha çok, sıvı ortamda çalışılırken veya yapışkan malzemelerin incelenmesinde kullanılmaktadır (Tan, 2001).

AKM ile hücrelerin araştırılması, ilk kez eritrositler üzerinde yapılan çalışmalar ile başlamıştır. Günümüzde ise birçok hücre, sıvı ortamda incelenebilmektedir (Ergün, 1999). Johansen et al. (1996) antibakteriyel özellik taşıyan protamin adlı bir peptidin, *L. monocytogenes* ve *Shewanella putrefaciens* hücreleri üzerine etkisini AKM kullanarak görüntülemişlerdir. AKM ile elde edilen görüntülerde, protaminin bu bakterilerin hücre duvarlarına büyük zarar verdiğini ve hatta hücre zarlarında delinmelere yol açtığını görmüşler ve bu morfolojik değişimlerin de, hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmeleri için gerekli olan solunumu engellediğini belirtmişlerdir. Dufrêne (2001) ise; AKM kullanarak *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 ve *Aspergillus oryzae* LMTC 2.14 funguslarının yüzey özelliklerinin spor oluşumu sırasındaki değişimini ve *Streptococcus salivarius* HB ve *Streptococcus salivarius* HBC12 bakteri hücrelerinin yüzey özelliklerini görüntülemiştir.

Mikroorganizma ve organellerin AKM ile görüntülenmesinden önce, boyama işleminin gerekli olmaması da, AKM kullanımının pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmesini sağlamıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Gıda örnekleri

Çalışmada kullanılan 64 adet gıda örneği, Ankara'daki marketlerden tesadüfi olarak toplanmıştır. Bu gıda örnekleri; kümes hayvanı etleri, kırmızı etler, et ürünleri, geleneksel gıdalar, salatalar ve yumurtalar olmak üzere 6 ayrı gıda grubunu kapsamaktadır (Çizelge 3.1). 64 adet gıda örneğinden 14 adedi, *S. enteritidis* kültürü ile inoküle edilerek, denemeye alınmıştır.

Çizelge 3.1 : Çalışmada kullanılan 64 adet gıda örneği

GIDA GRUPLARI	GIDA ÖRNEĞİ SAYISI	GIDA GRUPLARI	GIDA ÖRNEĞİ SAYISI
<u>Kümes hayvanı etleri</u>		<u>Kırmızı etler</u>	
Tavuk baget	2	Dana biftek	1
Tavuk bonfile	2*	Dana kıyma	3**
Tavuk boyun	1	Kuzu kuşbaşı	1
Tavuk but	1	Kuzu pirzola	1
Tavuk ciğer	2	Toplam	6
Tavuk drümstick (Kemikli tavuk eti)	1	<u>Et ürünleri</u>	
Tavuk göğüs	3*	Macar salamı	2
Tavuk incik	2*	Sosis	3*
Tavuk kanat	3	Sucuk	1*
Tavuk köfte	1	Toplam	6
Tavuk pirzola	3*	<u>Geleneksel gıdalar</u>	
Tavuk şnitzel	1	Adana köfte	1
Hindi but	3*	Arnavut ciğeri	1
Hindi kıyma	1	Çiğ köfte	2*
Hindi kuşbaşı	1	Dana tas kebabı	1
Hindi salam	1	İnegöl köfte	2*
Hindi sucuk	1	Toplam	7
Toplam	29		
<u>Salatalar</u>		<u>Yumurtalar</u>	
İtalyan salata	2	Çiğ yumurta	9
Rus salatası	4**	Toplam	9
Tarator	1*		
Toplam	7		

Toplam gıda örneği sayısı : 64

* Belirtilen gıda grubuna ait gıda örneğinin 1 adedi yapay olarak kontamine edilmiştir.

** Belirtilen gıda grubuna ait gıda örneğinin 2 adedi yapay olarak kontamine edilmiştir.

3.1.2. Kùltürler

S. enteritidis ATCC 13076 ve *E. coli* ATCC 35281 kùltürleri, “American Type Culture Collection (ATCC), ABD” den; *S. dublin* kùltürü, “Refik Saydam Hifzısıhha Enstitüsü, Ankara, Türkiye” den liyofilize formda sağlanmıştır. *E. coli* O157:H7 937 kùltürü, “Prof. M.P. Doyle, Georgia Üniversitesi, ABD” den; *S. typhimurium* kùltürü, “Prof. K. Halkman, Ankara Üniversitesi, Türkiye” den, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ve *S. aureus* kùltürleri, “Prof. A.G. Haşçelik, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye” den ve *Y. enterocolitica* O:9 BL 87/46 kùltürü ise, “Norwich AFRC (Agricultural and Food Research Council) Food Research Institute, İngiltere” den sağlanmıştır.

3.1.3. Dilüsyon sıvıları ve tampon çözeltiler

Çalışmada kullanılan IMA yıkama ve Serum Fizyolojik (SF) çözeltilerinin bileşimleri ve hazırlanışları Ek 1 bölümünde verilmektedir.

3.1.4. Boya çözeltileri

Çalışmada kullanılan Kristal Violet, Lugol (Gram İyot) ve Safranin çözeltilerinin bileşimleri ve hazırlanışları Ek 2 bölümünde verilmektedir.

3.1.5. İndikatör ve ayıraçlar

Çalışmada kullanılan Kovac's ayırıcı, Metil Kırmızısı indikatörü, %40'lık KOH ve α -Naftol çözeltilerinin bileşimleri ve hazırlanışları Ek 3 bölümünde verilmektedir.

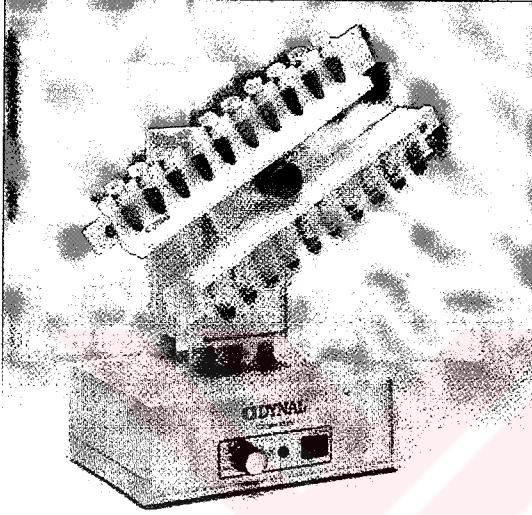
3.1.6. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan Triptik Soy Broth (TS Broth), SC Broth, Rambach Agar, BPLS Agar, XLD Agar, Triptik Soy Agar (TS Agar), Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) ve Üre Agar Merck (Almanya), RV Broth ve Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formülü) LAB M (İngiltere) firmalarından sağlanmıştır. Ayrıca; TPS, İndol testinde kullanılan Tripton Water, Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer testlerinde kullanılan Glukoz Fosfat Broth, Mannitol ve Salisin testlerinde kullanılan sırasıyla mannitol ve salisin içeren besiyerleri, besiyerlerinin bileşimlerinden hazırlanmıştır. Bu besiyerlerinin bileşimleri ve hazırlanışları Ek 4 bölümünde verilmektedir.

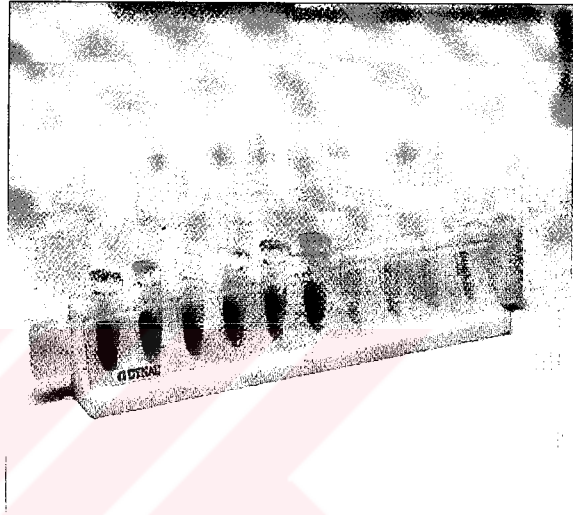
3.1.7. IMA yöntemi deney düzeneği

Çalışmada Dynal® (Oslo, Norveç) firması tarafından önerilen IMA yöntemi deney düzeneği kullanılmıştır. Bu düzenek; örnek karıştırıcısı (Dynal® MX3 sample mixer) (Şekil 3.1), 10 adet standard Eppendorf tüpünü tutabilen manyetik bir tutucu ve bu tutucunun manyetik çubuğundan (Dynal MPC®-M rack) (Şekil 3.2) oluşmaktadır.

3.1.8. İmmunomanyetik partiküller



Şekil 3.1 : IMA düzeneğindeki örnek karıştırıcısı (Anon., 2000a)



Şekil 3.2 : IMA düzeneğindeki manyetik tutucu ve çubuğu (Anon., 2000a)

Çalışmada Dynal® (Oslo, Norveç) firmasından sağlanan Dynabeads® anti-Salmonella partikülleri kullanılmıştır. Bu partiküller, yüzeyleri Salmonellaları yakalayabilecek özellikte saflaştırılmış antikorlar ile kaplanmış haldedir. Bu partiküller; fosfat ile tamponlanmış %0.85'lik NaCl çözeltisi (pH 7.4), %0.1 sığır serum albumini ve %0.02 sodyum azid (NaN_3) den oluşan ortamda süspansiyon olarak bulunmaktadır.

3.1.9. AKM deney düzeneği

Çalışmada TopoMetrix (ABD) firmasından sağlanan TopoMetrix TMX2000 Explorer ve eğrilik yarıçapı 1000 A° olan standart piramit sonda ucu (Topometrix 1520-00) kullanılmıştır.

3.2. Metot

Çalışmanın ilk bölümü; Enterobacteriaceae ve farklı ailelere ait bakterilerden birkaçı ve bazı *Salmonella* türleri ile ortamda herhangi bir gıda örneği etkileşimi olmaksızın gerçekleştirilen, partikül özgünlüğünün belirlenmesine yönelik, model sistem denemelerini içermektedir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, iki ayrı deneme modeli birarada yürütülmüştür. Bunlardan biri; Ankara'daki marketlerden tesadüfi olarak toplanan ve Salmonellalar açısından risk grubunda oldukları kabul edilen 50 adet gıda örneğindeki *Salmonella* varlığının, IMA yöntemi-çekirdek metodu ve ISO 6579 referans metodu ile karşılaştırmalı olarak incelenmesini kapsamaktadır. Diğer model ise; yine Ankara piyasasından sağlanan 14 adet gıda örneğine, *S. enteritidis* kültürünün yapay olarak inokülasyonunu ve bu patojen bakterinin IMA yöntemi-çekirdek metodu ve ISO 6579 referans metodu kullanılarak karşılaştırmalı olarak izolasyonunu içermektedir.

Çalışmanın son bölümü ise; *S. enteritidis*, anti-Salmonella partikülleri ve *S. enteritidis*+anti-Salmonella komplekslerinin, AKM ile görüntülenerek incelenmesini kapsamaktadır.

3.2.1. Partikül özgünlüğü

Çalışmanın bu bölümü, IMA yönteminde kullanılan Dynabeads® anti-Salmonella partiküllerinin özgünlüğünü belirlemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, *E. aerogenes*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. flexneri* ve *Y. enterocolitica* O:9 gibi Enterobacteriaceae ailesine ve *S. aureus*, *E. faecalis* gibi farklı ailelere ait bakterilerin, TS Broth besiyerinde 24 saatlik saf kültürleri hazırlanarak SF çözeltilisi ile ardışık dilüsyonları yapılmıştır. Ardışık dilüsyonları hazırlanan bu kültürlerden TS Agar besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile direkt kültürel inokülasyonlar yapıldıktan sonra, aynı dilüsyonlara IMA yöntemi uygulanarak hem BPLS Agar hem de TS Agar besiyerlerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Aynı zamanda; *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ve *S. dublin* gibi bazı *Salmonella* türlerinin de TS Broth besiyerinde 24 saatlik saf kültürleri hazırlanarak SF çözeltilisi ile ardışık dilüsyonları yapılmıştır. Ardışık dilüsyonları hazırlanan bu kültürlerden

BPLS Agar besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile direkt kültürel inokülasyonlar yapıldıktan sonra, aynı dilüsyonlara IMA yöntemi uygulanarak BPLS Agar besiyerlerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

İnokülasyon yapılan Petri kapları, 35-37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Petri kaplarındaki koloni gelişimleri incelenerek, anti-Salmonella partiküllerinin bu bakteri hücrelerini tutup tutamadığı belirlenmiştir. Koloni gelişimi gözlenen Petri kaplarındaki koloniler sayılarak da, anti-Salmonella partiküllerinin bakteri hücrelerini ne oranda tutabildikleri belirlenmiştir.

3.2.2. Doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerinin IMA yöntemi-çekirdek metodu ve ISO 6579 referans metodu için hazırlanması

24 adet kümes hayvanı eti, 4 adet kırmızı et, 4 adet et ürünü, 5 adet geleneksel gıda ve 4 adet salata olmak üzere 41 adet gıda örneğinin herbirinden 25 g alınarak, 225 mL TPS içeren filtreli steril Stomacher torbalarına aktarılmış ve Stomacher aygıtında (Stomacher Seeward 400, İngiltere) 1 dakika tutularak, gıda örnekleri homojen hale getirilmiştir. Ancak 9 adet yumurta örneğinin herbiri, öncelikle, sert bir fırça yardımı ile çeşme suyu altında yıkanıp havlu ile kurulanmış, 10 saniye süre ile %70'lik etil alkolde bekletildikten sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan yumurtalar steril erlenler içine kırılıp, iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra, homojen hale getirilmiş herbir yumurta örneğinden ISO 6579 referans metodunda kullanılmak üzere 11 g alınarak, 99 mL SF çözeltilisi içeren erlene aktarılmıştır. Diğer taraftan; IMA yöntemi-çekirdek metodunda kullanılmak üzere geriye kalan 50 g homojen hale getirilmiş yumurta örneği üzerine, 35 mg FeSO₄/L ilave edilerek karıştırılmıştır (Anon., 1999a). Hazırlanan homojenatların tümü, ön zenginleştirme amacı ile, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3. Yapay olarak kontamine edilen gıda örneklerinin IMA yöntemi-çekirdek metodu ve ISO 6579 referans metodu için hazırlanması

5 adet kümes hayvanı eti, 2 adet kırmızı et, 2 adet et ürünü, 2 adet geleneksel gıda ve 3 adet salata olmak üzere toplam 14 adet gıda örneği, ilk olarak, *S. enteritidis* kültürü ile yaklaşık 10³ kob/mL seviyesinde inoküle edilmiştir. İnokülasyon amacı ile hazırlanan kültür, *S. enteritidis*'in TS Broth besiyerinde 37°C'de 24 saat geliştirilmesi ve SF çözeltilisi ile uygun dilüsyonunun hazırlanması

ile elde edilmiştir. Yapay olarak inokülasyonu tamamlanmış her bir gıda örneğinden 25 g alınarak, 225 mL TPS içeren filtreli steril Stomacher torbalarına aktarılmış ve Stomacher aygıtında 1 dakika tutularak, gıda örnekleri homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan homojenatların tümü, ön zenginleştirme amacı ile, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4. ISO 6579 referans metodu

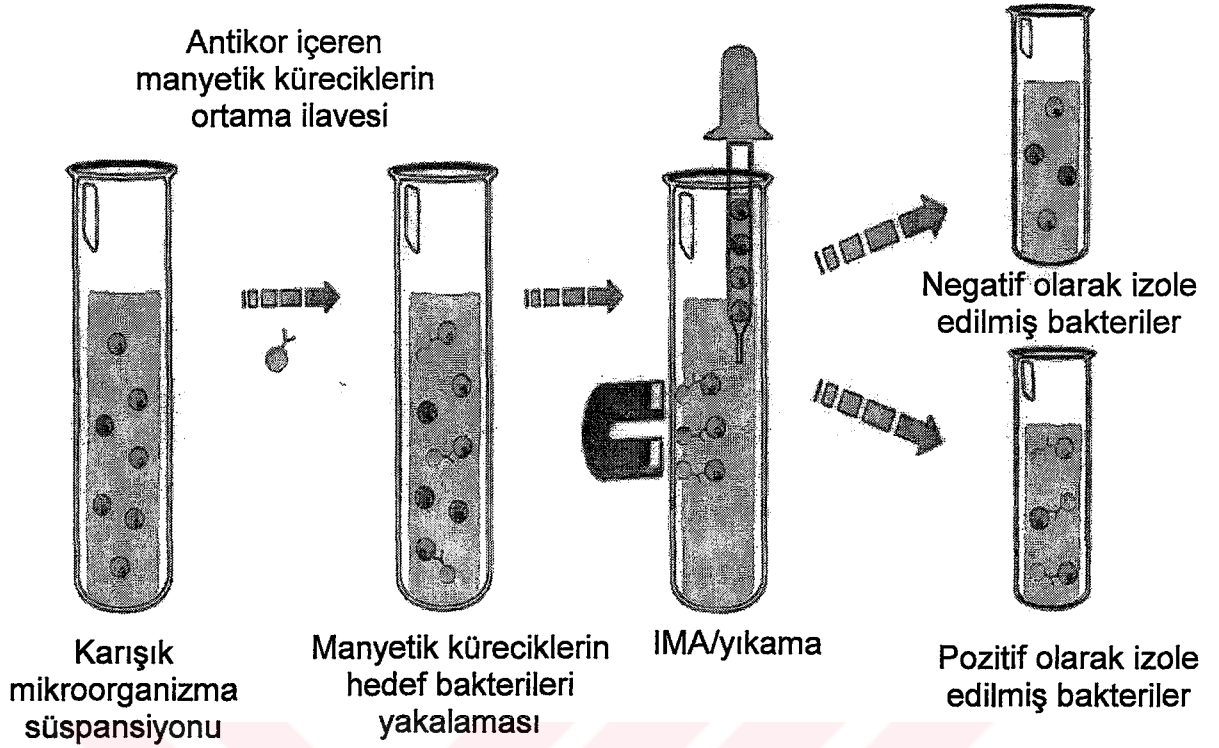
37°C'de 18-24 saat inkübe edilen homojenatlardan 10 ve 0.1 mL alınarak, sırasıyla SC Broth ve RV Broth seçici zenginleştirme besiyerlerine aktarılmıştır. SC Broth'lar 37°C'de, RV Broth'lar ise 42°C'de 24'er saat inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyonun ardından seçici olarak zenginleştirilen kültürler; BLPS Agar ve Rambach Agar seçici katı besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile ekilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.1).

Inkübasyon sonunda, izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonilerinin tanımlanması ve doğrulanması amacı ile birtakım biyokimyasal testlerin yapılabilmesi için, şüpheli koloniler TS Agar besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek saf kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen bu saf kültürler, ileri biyokimyasal testler için, 4°C'de buzdolabında saklanmışlardır.

3.2.5. IMA yöntemi-çekirdek metodu

IMA yönteminin çalışma mekanizması ve uygulama basamakları sırasıyla Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmektedir.

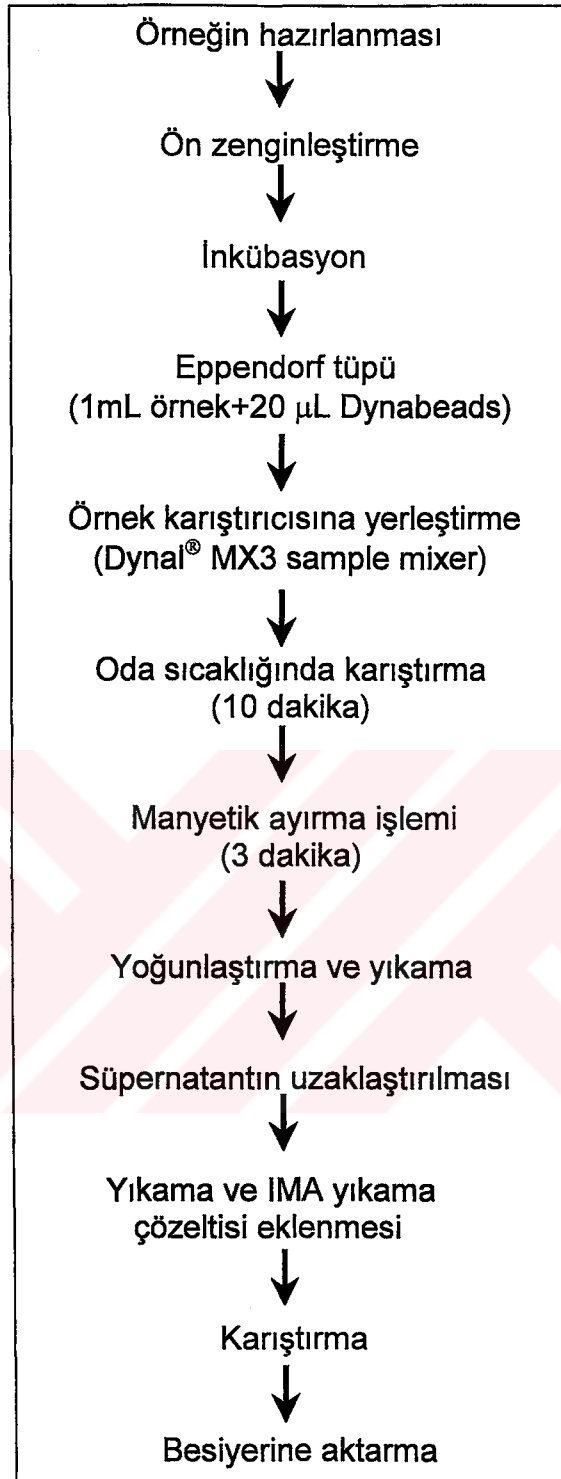
IMA yöntemi-çekirdek metoduna göre, ön zenginleştirme kültürlerinden 1'er mL alınarak, manyetik tutucudaki steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 20'şer µL Dynabeads® anti-Salmonella partikül süspansiyonu eklenmiş ve partiküllerin yüzeyini kaplamış olan hedef mikroorganizmaya özgü antikorların Salmonellaları bağlayabilmesi için, oda sıcaklığında 10 dakika süre ile örnek karıştırıcısında sürekli olarak karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda manyetik çubuk, Eppendorf tüplerini taşıyan manyetik tutucuya yerleştirilerek, tüpler 3 dakika da elde karıştırılmışlardır. Böylelikle; *Salmonella*+anti-Salmonella komplekslerinin, manyetik çubuğun yarattığı manyetik alan etkisi ile, tüplerin iç yüzeylerinde gözle görülebilir bir şekilde toplanmaları



Şekil 3.3 : IMA yönteminin çalışma mekanizması (Anon., 1996b)

sağlanmıştır. Ardından, *Salmonella*+anti-*Salmonella* komplekslerinin dağılımlarına izin vermeyecek bir şekilde, tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Manyetik çubuk, manyetik tutucudan çıkarıldıktan sonra, yıkama amacı ile 1 mL IMA yıkama çözeltisi eklenerek karıştırma yapılmıştır ve bu yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır. Son yıkamanın ardından yine manyetik çubuk yardımı ile oluşturulan *Salmonella*+anti-*Salmonella* komplekslerinin üzerine, 0.1 mL IMA yıkama çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve bu süspansiyon 10 mL RV Broth besiyerine aktarılarak, 42°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik RV kültürleri, daha sonra, BLPS Agar ve Rambach Agar seçici katı besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile inoküle edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

Ancak, 35 mg FeSO₄/L ilave edilerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılan yumurta homojenatları, IMA yöntemi-çekirdek metodu öncesinde TPS ile beş kez seyreltilmişler ve IMA sırasında anti-*Salmonella* partiküllerinden önerildiği şekilde 20 µL yerine 40 µL kullanılmıştır (Anon., 1999a). Inkübasyon sonunda, izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonilerinin tanımlanması ve doğrulanması amacı ile



Şekil 3.4 : IMA yönteminin şematize edilmiş uygulama basamakları (Özbaş ve Aytaç, 2000)

birtakım biyokimyasal testlerin yapılabilmesi için, şüpheli koloniler TS Agar besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek saf kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen bu saf kültürler, ileri biyokimyasal testler için, 4°C'de buzdolabında saklanmışlardır.

3.2.6. Tanımlama ve doğrulama analizleri

Bölüm 3.2.4 ve 3.2.5'de belirtilen ve TS Agar besiyerlerinde saklanan şüpheli izolatlar, ilk olarak, TS Broth besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılarak izolatların canlanmaları ve gelişmeleri sağlanmıştır.

Daha sonra, Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formülü) Agar ve XLD Agar besiyerlerine inokülasyonlar yapılarak, koloni morfolojileri karşılaştırılmıştır. Ardından, Gram boyama yapılmış ve indol testi için; Trypton Water besiyerine, metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri için; Glukoz Fosfat Broth besiyerlerine, üre testi için; Üre Agar besiyerine, karbonhidrat fermentasyon testleri için sırasıyla mannitol ve salisin içeren besiyerlerine, asit, gaz ve H₂S oluşumunun incelenmesi için TSI Agar besiyerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir (Anon., 1996c; Anon., 1998d; Temiz, 2000). Bu testlerin yanısıra, tanımlama ve doğrulama amacı ile, *Salmonella* lateks aglütinasyon testi (Anon., 2000c) ve ayrıca API 10S sistemi (Anon., 2000d) de kullanılmıştır. Tipik *Salmonella* kültürlerinin bu testlerde oluşturduğu reaksiyonların sonuçları, Çizelge 3.2'de verilmiştir.

3.2.7. İstatistik analizleri

İstatistiksel analiz için uygun görülen verilere, çalışma sonuçlarının değerlendirilebilmesi amacı ile, parametrik olmayan bağımlı iki grup testlerinden biri olan Wilcoxon testi uygulanmış ve bu testin sonuçları SPSS Paket Programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.8. AKM ile görüntü eldesi

İlk olarak *S. enteritidis*'in, TS Broth besiyerinde 24 saatlik saf kültürü hazırlanarak SF çözeltisi ile ardışık dilüsyonları yapılmıştır. Daha sonra yaklaşık 10² kob/mL olacak şekilde 1 mL örnek alınarak, manyetik tutucudaki steril Eppendorf tüpüne aktarılmış ve IMA işlemi gerçekleştirilmiştir. IMA işlemindeki son yıkamanın ardından manyetik çubuk yardımı ile oluşturulan *S. enteritidis*+anti-Salmonella komplekslerinin üzerine, 0.1 µL IMA yıkama çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra, *S. enteritidis*, anti-Salmonella partikülleri ve IMA işlemi sonrası elde edilen *S. enteritidis*+anti-Salmonella kompleksleri özel olarak temizlenmiş lamalar (Lamlar öncelikle ultrasonik temizleme cihazında, organik çözücü içinde

Çizelge 3.2 : Tipik *Salmonella* kültürlerinin bazı doğrulama testlerinde oluşturduğu reaksiyonların sonuçları (Anon., 2000c; Anon., 2000d; Anon., 1998d; Anon., 1996c)

TEST	REAKSİYON SONUCU
Gram boyama	-
İndol testi	-
Metil kırmızısı testi	+
Voges-Proskauer testi	-
Üre testi	-
Mannitol testi	+
Salisin testi	-
TSI Agar (dip/yüzey/gaz/H ₂ S)	glukoz +/-laktöz ve sukroz -/+/-
Salmonella Latex testi	+
API 10S testi*	
ONPG (β -galaktosidaz testi)	-
GLU (glukoz testi)	+
ARA (arabinoz testi)	+
LDC (lizin dekarboksidaz testi)	+
ODC (ornitin dekarboksidaz testi)	+
CIT (sitrat testi)	+
H ₂ S	+
URE (üre testi)	-
TDA (triptofan deaminaz testi)	-
IND (indol testi)	-
OX (oksidaz testi)	-
NO ₂	+

* API 10S test sonuçları, bioMérieux firması temsilciliği tarafından sağlanan bilgisayar destekli program ile değerlendirilmiştir.

temizlenmiş ve ardından sterilizatörde 100°C'de 2 saat bekletilmiştir) üzerine alınarak, ince birer film halinde yayılmışlardır. Havada kurumaları sağlandıktan sonra, AKM ile incelemeye geçilmiştir. AKM ile incelenmeleri, açık havada gerçekleştirilmiştir. Analizlere önce 100x100 μm^2 alanda başlanmış, daha sonra 10x10 μm^2 alana kadar yakınlaştırılmıştır. Bu sırada sonda ucunun tarama sırasında preparatlara uyguladığı kuvvet 1-3 nN ve görüntü çözünürlüğü ise 400x400 piksel olup, elde edilen veriler bilgisayarın yazılımı sayesinde görüntüye çevrilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

4.1. Partikül Özgünlüğüne İlişkin Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümünde IMA yönteminde kullanılan anti-Salmonella partiküllerinin özgünlüğü, ilk aşamada, *E. aerogenes*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *S. flexneri* ve *Y. enterocolitica* O:9 gibi Enterobacteriaceae ailesine ve *S. aureus*, *E. faecalis* gibi farklı ailelere ait bakteriler ile ortamda herhangi bir gıda örneği etkileşimi olmaksızın gerçekleştirilen model sistem denemeleri ile incelenmiştir. Partikül özgünlüğü ile ilgili ilk aşama deneme sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Enterobacteriaceae ailesine ve farklı ailelere ait bazı bakteriler ile yapılan anti-Salmonella partikül özgünlüğü deneme sonuçları

Bakteri	Bakterinin geri kazanımı (%)*	
	TS Agar	BPLS Agar
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6.4	4.5
<i>Escherichia coli</i>	2.3	1.9
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.6	1.8
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0

* Enterobacteriaceae ailesine ve farklı ailelere ait bakterilerden birkaçının anti-Salmonella partikülleri ile TS Agar ve BPLS Agar besiyerlerindeki geri kazanım yüzdeleri belirlemek için, IMA yöntemi uygulanarak inokülasyonlar yapılan TS Agar ve BPLS Agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayısı, direkt kültürel inokülasyonlar yapılan TS Agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayısına oranlanmıştır.

Çizelge 4.1'in incelenmesinden de görülebileceği gibi *E. coli* O157:H7, *P. vulgaris*, *S. flexneri*, *Y. enterocolitica* O:9, *S. aureus* ve *E. faecalis* kültürleri ile çalışıldığında, anti-Salmonella partiküllerinin bu bakterileri tutamadıkları belirlenmiştir. Diğer bir taraftan, anti-Salmonella partiküllerinin *E. aerogenes*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerini tutabildikleri saptanmıştır. Ancak bu bakterilerin TS Agar gibi genel bir besiyerinde sırasıyla %6.4, %2.3 ve %2.6, BPLS Agar gibi

seçici bir besiyerinde ise sırasıyla %4.5, %1.9 ve %1.8 gibi düşük geri kazanım yüzdelerine sahip oldukları görülmektedir. Bu bakterilerin anti-Salmonella partikülleri tarafından böyle düşük bir yüzde ile de olsa tutulabilmeleri, onların partikül yüzeylerine yapışmalarından kaynaklanan özgün olmayan bağlanmaları ile açıklanmaktadır. Özgün olmayan bu bağlanmaların, Salmonellaların tutulmasını engellemediği ancak IMA yöntemi sonrası inokülasyon yapılan seçici katı besiyerlerinde Salmonellalar ile birlikte bu bakterilerin de gelişmesine olanak verdiği ama yine de *Salmonella* kolonilerinin diğer kolonilerinden makroskopik olarak rahatlıkla ayrılabilirdiği belirtilmektedir (Molla et al., 1994). Dolayısıyla, gerek doğal olarak gerekse yapay olarak kontamine olmuş gıda örnekleri ile çalışılırken, IMA yöntemi sonrası RV Broth seçici zenginleştirme besiyerinin kullanılmasının ardından seçici katı besiyerlerine inokülasyonlara geçilmesi, özgün olmayarak bağlanan bu bakterilerin seçici katı besiyerlerindeki gelişimini önemli ölçüde sınırlandırdığı görülmüştür.

Blackburn ve Patel, özgün olmayan bağlanmaların miktarının; bakteri suşu ve bakteri suşunun örnek karıştırıcısında sürekli olarak karıştırma sırasında içinde bulunduğu inkübasyon ortamı, sıcaklığı ve süresi ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir (Skjerve et al., 1990; Molla et al., 1994). Vermunt et al. (1992), anti-Salmonella partiküllerinin *Enterobacter agglomerans* G2 suşunu, *Enterobacter agglomerans* G7 ve G8 suşlarına oranla daha yüksek bir yüzde ile tutabildiklerini bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, örnek karıştırıcısında sürekli olarak karıştırma sırasında kreması ayrılmış %4 süt içeren tamponlanmış peptonlu su ortamında inkübe edilen *Aeromonas hydrophila* G5 suşunun, %0.1 sığır serum albumini içeren tamponlanmış peptonlu su ortamında inkübe edilen *A. hydrophila* G5 suşuna oranla anti-Salmonella partikülleri tarafından daha düşük bir yüzde ile tutabildiklerini saptamışlardır. Aynı zamanda, *A. hydrophila* G5 suşunun 10 dakikalık bir süre ile örnek karıştırıcısında inkübasyona bırakılmasının ardından anti-Salmonella partikülleri tarafından tutulabilme yüzdesinin, 60 dakikalık bir süre ile örnek karıştırıcısında inkübasyona bırakılmasının ardından tutulabilme yüzdesine oranla daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, inkübasyon çözeltilisine Tween-20 ya da protamin gibi deterjanların katılmasının da, özgün olmayan bağlanmaların miktarını azalttığı bulunmuştur (Okrend et al., 1992; Vermunt et al., 1992).

İkinci aşamada ise, IMA yönteminde kullanılan anti-Salmonella partiküllerinin özgünlüğü, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ve *S. dublin* gibi bazı *Salmonella* türleri ile ortamda herhangi bir gıda örneği etkileşimi olmaksızın yapılan model sistem denemeleri ile incelenmiştir. Partikül özgünlüğü ile ilgili ikinci aşama deneme sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Bazı *Salmonella* türleri ile yapılan anti-Salmonella partikül özgünlüğü deneme sonuçları

Bakteri	Bakterinin geri kazanımı (%)*
	BPLS Agar
<i>S. enteritidis</i>	65
<i>S. typhimurium</i>	41
<i>S. dublin</i>	12

* Bazı *Salmonella* türlerinin anti-Salmonella partikülleri ile BPLS Agar besiyerindeki geri kazanım yüzdelerini belirlemek için, IMA yöntemi uygulanarak inokülasyonlar yapılan BPLS Agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayısı, direkt kültürel inokülasyonlar yapılan BPLS Agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayısına oranlanmıştır.

Çizelge 4.2’in incelenmesinden de görülebileceği gibi *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ve *S. dublin* kültürleri ile çalışıldığında, anti-Salmonella partiküllerinin bu bakterilerinin tümünü ancak farklı oranlarda tutabildikleri belirlenmiştir. *S. enteritidis*, *S. typhimurium* ve *S. dublin* bakterilerinin BPLS Agar gibi seçici bir besiyerindeki geri kazanım yüzdeleri, sırasıyla %65, %41 ve %12 olarak bulunmuştur. *Salmonella* türlerinin geri kazanım yüzdelerinin beklenilenden daha düşük olması; onların anti-Salmonella partikülleri tarafından düşük bir yüzde ile tutulabilmeleri olarak değil, IMA yöntemi sırasındaki ilk yıkama basamağı sonrası olası kayıpları olarak açıklanmaktadır (Vermunt et al., 1992; Molla et al., 1994). Bir başka deyişle, belli miktardaki anti-Salmonella kürecikleri ancak belli miktardaki Salmonellaları tutabilmekte ve ortamda anti-Salmonella küreciklerinden fazla sayıda *Salmonella* bulunduğu takdirde, IMA yöntemi sırasındaki ilk yıkama basamağı sonrası kayıplar söz konusu olmaktadır. Vermunt et al. (1992), *Salmonella livingstone* ile yaptıkları bir çalışmada, anti-Salmonella partikülleri tarafından tutulan bu bakterilerin ilk yıkama basamağı sonrası %90 kayba uğradıklarını belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada, *S. livingstone* bakterisinin 60 dakikalık bir süre ile örnek karıştırıcısında inkübasyona bırakılmasının ardından

uygulanan ilk yıkama basamağı sonrası kaybının, 10 dakikalık bir süre ile örnek karıştırıcısında inkübasyona bırakılmasının ardından uygulanan ilk yıkama basamağı sonrası kaybına oranla daha düşük olduğunu saptamışlardır. Ancak; bakterilerin anti-Salmonella partikülleri ile 10 dakikadan fazla bir süre ile örnek karıştırıcısında inkübasyona bırakılmalarının özgün olmayan bağlanma miktarını arttırabileceği belirtildiğinden, IMA yöntemi sırasındaki ilk yıkama basamağı sonrası meydana gelen olası kayıpların gözardı edilebileceği de belirtilmektedir. Ayrıca IMA yöntemi doğrudan sayıma yönelik olarak geliştirilmiş bir yöntem olmadığından, bu kayıpların normal karşılanabildiği belirtilmektedir (Mansfield and Forsythe, 2000a). IMA yöntemi sırasındaki ilk yıkama basamağı sonrası ne kadar kayıp olursa olsun, gıda örneğinde bir tek *Salmonella* hücresi olsa dahi, anti-Salmonella kürecikleri tarafından tutulacak ve yasal olarak 25 gram gıda maddesinde bir tek *Salmonella* hücresinin bile olmaması gerektiğinden, gıda örneği tüketime uygun bulunmayarak kabul edilmeyecektir.

4.2. Doğal Olarak Kontamine Olmuş Gıda Örneklerine İlişkin Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümünde, Ankara'daki marketlerden tesadüfi olarak toplanan ve Salmonellalar açısından risk grubunda oldukları kabul edilen 50 adet gıda örneğindeki *Salmonella* varlığı, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu gıda örneklerinin 24 adedi kümes hayvanı eti, 4 adedi kırmızı et, 4 adedi et ürünü, 5 adedi geleneksel gıda, 4 adedi salata ve 9 adedi de yumurta olmak üzere farklı gıda gruplarını kapsamaktadır (Çizelge 3.1).

Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinden gerek ISO 6579 referans metodu gerekse IMA yöntemi-çekirdek metodu uygulanarak izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonilerine, Bölüm 3.2.5'de belirtilen tanımlama ve doğrulama analizleri uygulanmış ve Çizelge 4.3'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 : Doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerine ilişkin sonuçlar

GIDA ÖRNEKLERİ	ISO 6579 REFERANS METODU	IMA YÖNTEMİ- ÇEKİRDEK METODU
<u>Kümes hayvanı etleri</u>		
Tavuk baget ¹	+	+
Tavuk baget ²	+	+
Tavuk bonfile	+	+
Tavuk boyun	+	+
Tavuk but	-	-
Tavuk ciğer ¹	+	+
Tavuk ciğer ²	-	-
Tavuk drümstick	-	+
Tavuk göğüs ¹	-	+
Tavuk göğüs ²	-	-
Tavuk incik	-	-
Tavuk kanat ¹	+	+
Tavuk kanat ²	+	+
Tavuk kanat ³	+	+
Tavuk köfte	+	+
Tavuk pirzola ¹	+	+
Tavuk pirzola ²	-	-
Tavuk şnitzel	+	+
Hindi but ¹	+	+
Hindi but ²	-	-
Hindi kıyma	-	-
Hindi kuşbaşı	-	-
Hindi salam	-	-
Hindi sucuk	-	-
<u>Kırmızı etler</u>		
Dana biftek	-	-
Dana kıyma	-	-
Kuzu kuşbaşı	-	-
Kuzu pirzola	-	-
<u>Et ürünleri</u>		
Macar salami ¹	-	-
Macar salami ²	-	-
Sosis ¹	-	-
Sosis ²	-	-
<u>Geleneksel gıdalar</u>		
Adana köfte	-	-
Arnavut ciğeri	-	-
Çiğ köfte	-	-
Dana tas kebabı	-	-
İnegöl köfte	-	-

Çizelge 4.3 devam ediyor.

Salatalar		
İtalyan salata ¹	-	-
İtalyan salata ²	-	-
Rus salatası ¹	-	-
Rus salatası ²	-	-
Yumurtalar		
Yumurta ¹	-	-
Yumurta ²	-	-
Yumurta ³	-	-
Yumurta ⁴	-	-
Yumurta ⁵	-	-
Yumurta ⁶	-	-
Yumurta ⁷	-	-
Yumurta ⁸	-	-
Yumurta ⁹	-	-

+ : *Salmonella* pozitif

- : *Salmonella* negatif

Çizelge 4.3 incelendiğinde, doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneği içerisinde kırmızı etler, et ürünleri, geleneksel gıdalar, salatalar ve yumurtalar başlığı olarak verilen gıda gruplarına ait hiçbir örnekte *Salmonella* varlığına rastlanılmadığı görülmektedir. Kümes hayvanı etleri grubuna bakıldığında; 24 adet gıda örneğinden 14 adedinin, *Salmonella* ile kontamine olduğu IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak saptanmıştır. ISO 6579 referans metodu kullanıldığında ise; bu 14 adet gıda örneğinin ikisinde, *Salmonella* izolasyonunun gerçekleştirilemediği görülmektedir.

Cudjoe et al. (1994a), IMA yöntemi-çekirdek metodunu kullanarak, doğal olarak kontamine olmuş 180 adet kümes hayvanı etinin 135 adedinin *Salmonella* ile kontamine olduğunu saptayabilmişken, ISO 6579 referans metodunu kullanarak aynı örneklerin yalnızca 98 adedinin *Salmonella* ile kontamine olduğunu belirleyebilmişlerdir. Cudjoe and Krona (1997) ise yaptıkları bir çalışmada, doğal olarak kontamine olmuş 100 adet gıda örneğinden yalnızca 31 adedinin *Salmonella* ile kontamine olduğunu ISO 6579 referans metodunu kullanarak saptayabilmişken, IMA yöntemi-çekirdek metodunu kullanarak 39 adedinin *Salmonella* ile kontamine olduğunu belirleyebilmişlerdir. Her iki çalışma sonucunda da IMA yönteminin, ISO 6579 referans metoduna göre daha etkili bir izolasyon yaptığı vurgulanmıştır.

Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinde, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodunun karşılaştırmalı olarak çalışılmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinde ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodunun karşılaştırılması

GIDA GRUPLARI	GIDA ÖRNEĞİ SAYISI	ISO 6579 REFERANS METODU		IMA YÖNTEMİ-ÇEKİRDEK METODU	
		POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
Kümes hayvanı etleri	24	12	12	14	10
Kırmızı etler	4	0	4	0	4
Et ürünleri	4	0	4	0	4
Geleneksel gıdalar	5	0	5	0	5
Salatalar	4	0	4	0	4
Yumurtalar	9	0	9	0	9
TOPLAM	50	12	38	14 ^a	36

^a : IMA yöntemi-çekirdek metodu, ISO 6579 referans metoduna göre 2 adet daha fazla gıda örneğinin *Salmonella* ile kontamine olduğunun saptanmasını sağlamıştır.

Çizelge 4.4'ün incelenmesinden de görülebileceği gibi, kümes hayvanı etleri grubuna ait 2 adet gıda örneğinde IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak *Salmonella* izolasyonu başarılabılırken, aynı örneklerde ISO 6579 referans metodu kullanılarak izolasyon yapılamamış ve ISO 6579 referans metodu hatalı negatif sonuç vermiştir. Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinde, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak *Salmonella* varlığı karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, IMA yöntemi-çekirdek metodunun ISO 6579 referans metoduna göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir.

ISO 6579 referans metodu ile IMA yöntemi-çekirdek metodu arasında fark olup-olmadığının belirlenebilmesi amacı ile, istatistiksel analiz için uygun görülen verilere, parametrik olmayan bağımlı iki grup testlerinden biri olan Wilcoxon testi uygulanmış ve bu testin sonuçları SPSS Paket Programı kullanılarak

değerlendirilmiştir. Uygulanan istatistiksel analiz sonucunda, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($P > 0.05$).

Mansfield ve Forsythe (1993), gerek doğal olarak kontamine olmuş 120 adet gıda örneği gerekse yapay olarak kontamine edilen 60 adet gıda örneği ile yaptıkları bir çalışma sonucunda IMA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen seçici zenginleştirme basamağının, SC Broth, TT Broth ya da RV Broth kullanılarak gerçekleştirilen seçici zenginleştirme basamakları kadar etkili bir izolasyonu daha kısa sürede sağladığını saptamışlardır. Molla et al (1994) ise, doğal olarak kontamine olmuş 165 adet gıda örneğinin 54 adedinin *Salmonella* ile kontamine olduğunu hem IMA yöntemi hem de ISO 6579 referans metodu kullanarak saptamışlar ve her iki yöntem arasında önemli bir fark olmadığını ancak IMA yönteminin ISO 6579 referans metoduna oranla daha hızlı ve kolay uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

4.3. Yapay Olarak Kontamine Edilen Gıda Örneklerine İlişkin Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümünde, Ankara piyasasından sağlanan 14 adet gıda örneğine, *S. enteritidis* kültürünün yaklaşık 10^3 kob/mL seviyesinde inokülasyonu gerçekleştirilmiş ve örneklerdeki *Salmonella* varlığı, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu gıda örneklerinin 5 adedi kümes hayvanı eti, 2 adedi kırmızı et, 2 adedi et ürünü, 2 adedi geleneksel gıda ve 3 adedi de salata olmak üzere farklı gıda gruplarını kapsamaktadır (Çizelge 3.1).

Yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneğinden gerek ISO 6579 referans metodu gerekse IMA yöntemi-çekirdek metodu uygulanarak izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonilerine, Bölüm 3.2.5'de belirtilen tanımlama ve doğrulama analizleri uygulanmış ve Çizelge 4.5'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.5 : Yapay olarak kontamine edilen gıda örneklerine ilişkin sonuçlar

GIDA ÖRNEKLERİ	ISO 6579 REFERANS METODU	IMA YÖNTEMİ-ÇEKİRDEK METODU
<u>Kümes hayvanı etleri</u>		
Tavuk bonfile	+	+
Tavuk göğüs	+	+
Tavuk incik	+	+
Tavuk pirzola	+	+
Hindi but	+	+
<u>Kırmızı etler</u>		
Dana kıyma ¹	+	+
Dana kıyma ²	+	+
<u>Et ürünleri</u>		
Sosis	+	+
Sucuk	-	+
<u>Geleneksel gıdalar</u>		
Çiğ köfte	+	+
İnegöl köfte	+	+
<u>Salatalar</u>		
Rus salatası ¹	+	+
Rus salatası ²	+	+
Tarator	+	+

+ : *Salmonella* pozitif

- : *Salmonella* negatif

Çizelge 4.5 incelendiğinde, yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneği içerisinde et ürünleri grubuna bakıldığında; 2 adet gıda örneğinin ikisinde de, IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak *Salmonella* varlığı saptanmıştır. ISO 6579 referans metodu kullanıldığında ise; bu 2 adet gıda örneğinin birinde, *Salmonella* izolasyonunun gerçekleştirilemediği görülmektedir.

Yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneğinde, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodunun karşılaştırmalı olarak çalışılmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.6 : Yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneğinde ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodunun karşılaştırılması

GIDA GRUPLARI	GIDA ÖRNEĞİ SAYISI	ISO 6579 REFERANS METODU		IMA YÖNTEMİ-ÇEKİRDEK METODU	
		POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
Kümes hayvanı etleri	5	5	0	5	0
Kırmızı etler	2	2	0	2	0
Et ürünleri	2	1	1	2	0
Geleneksel gıdalar	2	2	0	2	0
Salatalar	3	3	0	3	0
TOPLAM	14	13	1	14^a	0

^a : IMA yöntemi-çekirdek metodu, ISO 6579 referans metoduna göre 1 adet daha fazla gıda örneğinde *Salmonella* varlığının saptanmasını sağlamıştır.

Çizelge 4.6'nın incelenmesinden de görülebileceği gibi, et ürünleri grubuna ait 1 adet gıda örneğinde IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak *Salmonella* izolasyonu başarılabilirken, aynı örnekde ISO 6579 referans metodu kullanılarak izolasyon yapılamamış ve ISO 6579 referans metodu hatalı negatif sonuç vermiştir. Yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneğinde, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak *Salmonella* varlığı karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, IMA yöntemi-çekirdek metodunun ISO 6579 referans metoduna göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir.

ISO 6579 referans metodu ile IMA yöntemi-çekirdek metodu arasında fark olup-olmadığının belirlenebilmesi amacı ile, istatistiksel analiz için uygun görülen verilere, parametrik olmayan bağımlı iki grup testlerinden biri olan Wilcoxon testi uygulanmış ve bu testin sonuçları SPSS Paket Programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulanan istatistiksel analiz sonucunda, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($P > 0.05$).

İstatistiksel analizler sonucunda her iki yöntem arasında önemli bir fark olmadığı saptanmış olsa da, İMA yöntemi-çekirdek metodu kullanılarak yapılan çalışmalarda seçici katı besiyerlerinde gözlenen koloni gelişimlerinin, ISO 6579 referans metodu kullanılarak yapılan çalışmalarda gözlenen koloni gelişimlerine oranla çok daha saf olduğu, bir başka deyişle, ağırlıklı olarak *Salmonella* kolonilerini içerdiği belirlenmiştir. Bu da, seçici katı besiyerlerinden şüpheli *Salmonella* kolonilerinin izolasyonunu kolaylaştırarak, zaman kaybı ve hatalı koloni seçimini engellenmiştir. Cudjoe and Krona (1997); ISO 6579 referans metodunu kullanarak elde ettikleri kültürlerde, İMA yöntemi-çekirdek metodunu kullanarak elde ettikleri kültürlerle oranla daha yoğun bir rekabetçi flora gözlemişlerdir. Dolayısıyla; İMA yöntemi-çekirdek metodunun kullanılması ile rekabetçi flora gelişiminin büyük ölçüde engellenebileceğini ve bunun da seçici katı besiyerlerinden, tanımlama ve doğrulama analizleri için, şüpheli *Salmonella* kolonilerinin seçimini hızlandıracağını belirtmişlerdir.

Cudjoe (1999), *Salmonellaların* gıdaları doğal olarak kontamine etme seviyesinin genellikle düşük olmasından dolayı, bu patojenlerin gıdalardan izolasyonu sırasında, ilk olarak, ön zenginleştirme besiyeri kullanımının mutlak gerekli olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışmada da, gerek ISO 6579 referans metodu gerekse İMA yöntemi-çekirdek metodunun önermesi ile, ön zenginleştirme basamağında TPS besiyeri kullanılmıştır. Ancak, yumurta örnekleri ile çalışılırken, İMA yöntemi-çekirdek metodu ön zenginleştirme besiyerine FeSO_4 ilave edilmiştir. Clay and Board (1991)'a göre; FeSO_4 formundaki demir, yumurtadaki konalbumin (ovotransferrin) in şelat ajanı olarak görev yapmasını engelleyerek Gram-negatif bakterilerin gelişimini hızlandırmaktadır (Reissbrodt et al., 1996). Yumurtalardan *Salmonella* izolasyonu sırasında ön zenginleştirme besiyerlerine 35 mg/L olacak şekilde FeSO_4 ilave edilmesinin de, zaten yumurtalarda az sayıda bulunan bu patojenin gelişimini ve çoğalmasını arttırdığı bildirilmektedir (Gast, 1993). Ancak bu durumun *Salmonellalar* ile birlikte diğer Gram-negatif bakterilerin de gelişmelerine ve çoğalmalarına olanak sağlamasından dolayı Cudjoe et al. (1994b), bu şekilde ön zenginleştirme yapılan örneğe özgünlüğü yüksek olan İMA yöntemi-çekirdek metodu uygulanmasının, gerek rekabetçi flora gelişimini büyük ölçüde engellemesi gerekse *Salmonella* izolasyonunun 30 saat gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilmesi açısından, daha elverişli olduğunu belirtmişlerdir. Reissbrodt

et al. (1996), yumurtalardan *Salmonella* izolasyonu amacı ile yaptıkları bir çalışmada da, ön zenginleştirme besiyerlerine 1 mg/L olacak şekilde ferriksamin E ilave edilmesinin, rekabetçi flora gelişiminin engellenmesi açısından, 35 mg/L FeSO₄ ilave edilmesine oranla daha etkili olduğunu saptamışlardır.

Birçok araştırmacı, Salmonellaların gıdalardan izolasyonu sırasında değişik seçici zenginleştirme besiyerlerinden yararlanmışlardır. Bu çalışmada da, ISO 6579 referans metodunun önermesi ile, seçici zenginleştirme basamağında SC Broth ve RV Broth besiyerleri kullanılmıştır. Ancak, SC Broth ve RV Broth besiyerleri kullanılarak *Salmonella* izolasyonu karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, RV Broth besiyerinin SC Broth besiyerine göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Hammack et al. (1999); SC Broth, RV Broth ve TT Broth ile yaptıkları bir çalışma sonucu, her üç besiyeri arasında çok önemli bir etkinlik farkı olmadığını ancak düşük sayıda *Salmonella* ile yapay olarak kontamine ettikleri gıdalar ile çalıştıklarında RV Broth ve TT Broth besiyerlerinin daha iyi sonuçlar verdiğini, dolayısıyla da gıdalardan *Salmonella* izolasyonu sırasında seçici zenginleştirme besiyeri olarak bu iki besiyerinin beraber kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir. Blivet et al. (1997) ise; doğal olarak kontamine olmuş kümes hayvanı etlerindeki *Salmonella* varlığını araştırmak amacı ile SC Broth, RV Broth, TT Broth ve KIMAN Broth (20 mg/L novobiosin sodyum tuzu, 10 mg/L malaşit yeşili oksalatı ve 40 g/L potasyum iyodür içeren Whitley Empedans Broth) besiyerlerini kullanmışlar ve RV Broth ve KIMAN Broth besiyerlerinin daha başarılı sonuçlar verdiğini saptamışlardır.

Her ne kadar klasik kültürel yöntemler ile yapılan *Salmonella* izolasyonunda seçici zenginleştirme basamağındaki besiyerlerinin üstünlüklerinden bahsedilse de, IMA yönteminin, karışık mikrobiyal populasyonlar içerisindeki hedef hücrelerin seçiminde bu seçici zenginleştirme besiyerlerine oranla daha hızlı sonuç alınabilen bir yöntem olması ile birlikte basit, ucuz ve yüksek duyarlılıkta olduğu da saptanmıştır (Cudjoe et al., 1994a; Molla et al., 1994; Coleman et al., 1995a; Coleman et al., 1995b; Dziadkowiec et al., 1995; Mansfield and Forsythe, 1996; Cudjoe and Krona, 1997; Davies and Wray, 1997; Ripabelli et al., 1997; Shaw et al., 1998). Bu çalışmada da istatistiksel analizler sonucunda ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi-çekirdek metodu arasında önemli bir fark olmadığı gözlenmiş olsa da IMA yönteminin, çekirdek metot uygulanmadığında takdirde,

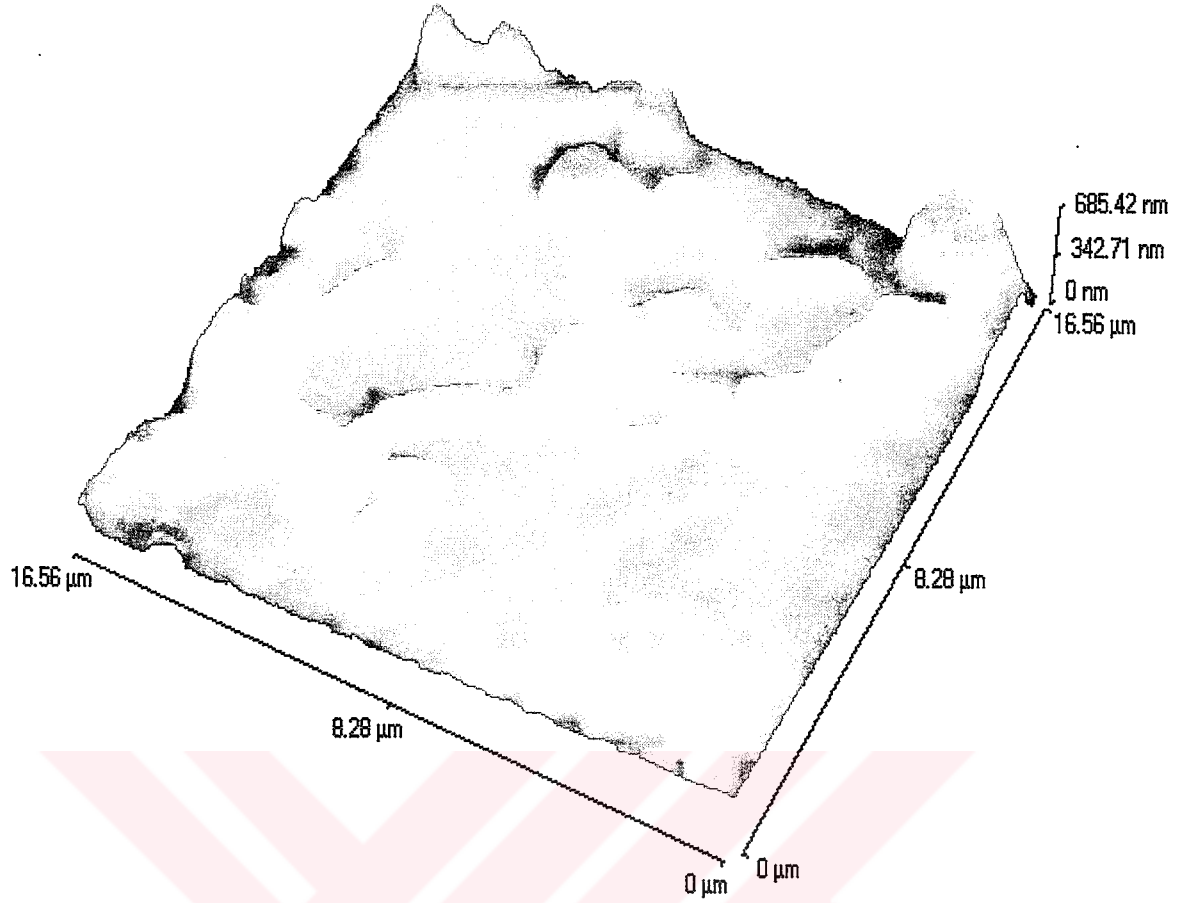
ISO 6579 referans metoduna oranla 1 gün daha önce sonuçlanabileceği vurgulanmaktadır.

Salmonellaların gıdalardan izolasyonu sırasında değişik seçici katı besiyerleri kullanılabilmektedir. Bu amaçla çalışmada, BPLS Agar, Rambach Agar ve Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formülü) Agar besiyerleri kullanılmıştır. Rambach Agar gıda kaynaklı olmayan *S. typhi* ve *S. paratyphi* bakterilerinin izolasyonu için kullanımı tercih edilmeyen bir seçici katı besiyeri olsa da, gıdaları kontamine etme olasılığı fazla olan diğer *Salmonella* türlerinin izolasyonunda oldukça yüksek etkinlik sağlamak ve bu besiyerinden izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonilerine tanımlama ve doğrulama analizlerinden birkaçının uygulanmasına gerek kalmamaktadır (Gruenewald et al., 1991). Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formülü) Agar da, son yıllarda Salmonella izolasyonu amacı ile kullanılan oldukça etkili bir seçici zenginleştirme besiyeridir.

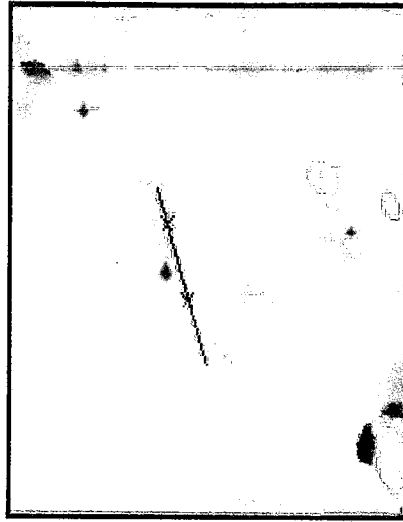
4.4. AKM ile Görüntü Eldesine İlişkin Sonuçlar

Çalışmanın son bölümünde ise; *S. enteritidis*, anti-Salmonella partikülleri ve *S. enteritidis*+anti-Salmonella kompleksleri, AKM ile görüntülenerek incelenmiştir.

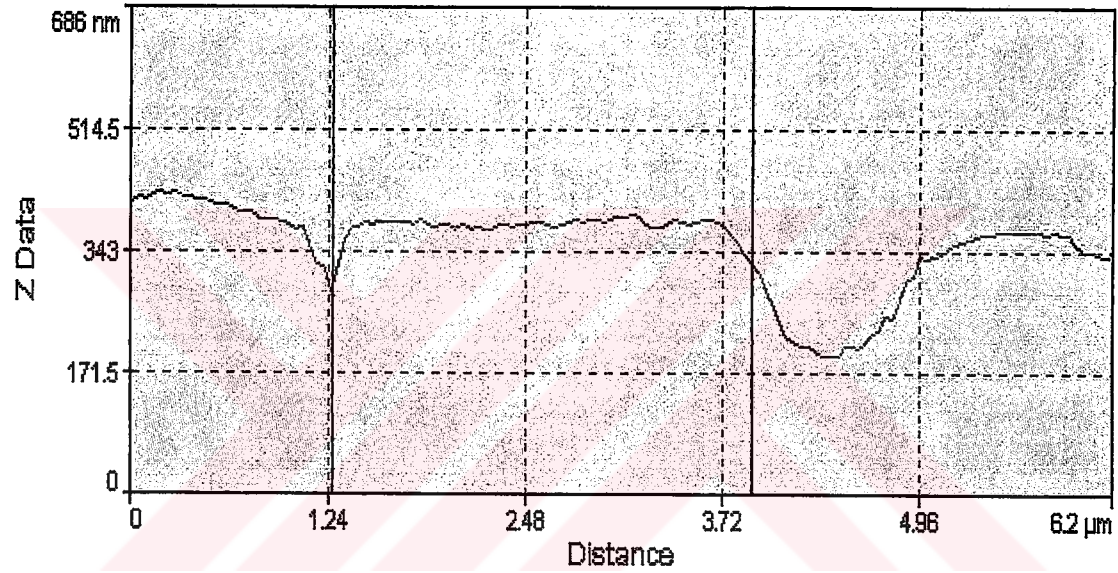
Şekil 4.1'de *S. enteritidis*'in topografik görüntüsü gösterilmektedir. Şekil 4.2a ve 4.2b'de *S. enteritidis*'in boyutları analiz edilmiş ve bu patojenin boyu 2.635 µm, eni 0,993 µm olarak bulunmuştur. Cox (1999), bu patojenin boyunun 2-5 µm, eninin ise 0.7-1.5 µm arasında olduğunu belirtmiştir. Bu verilere dayanarak, ölçümlerin literatür ile uygunluğundan bahsedilebilir.



Şekil 4.1 : *S. enteritidis*'in topografik görüntüsü

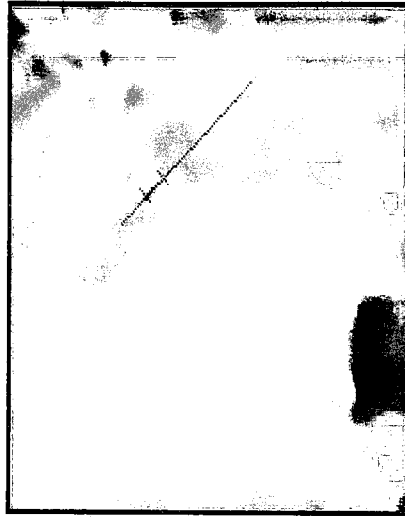


File Information:			
Zmin: 0.0 nm		Zmax: 685.4 nm	Scan Range: 16 μ m
Result:			
	Line1		
	X(μ m)	Y(μ m)	Z(nm)
Point1:	1.23		287.6
Point2:	3.86		330.0
Diff:	2.63		42.4
Length:	2.635 μ m *		
Pt Angle:	0.92°		

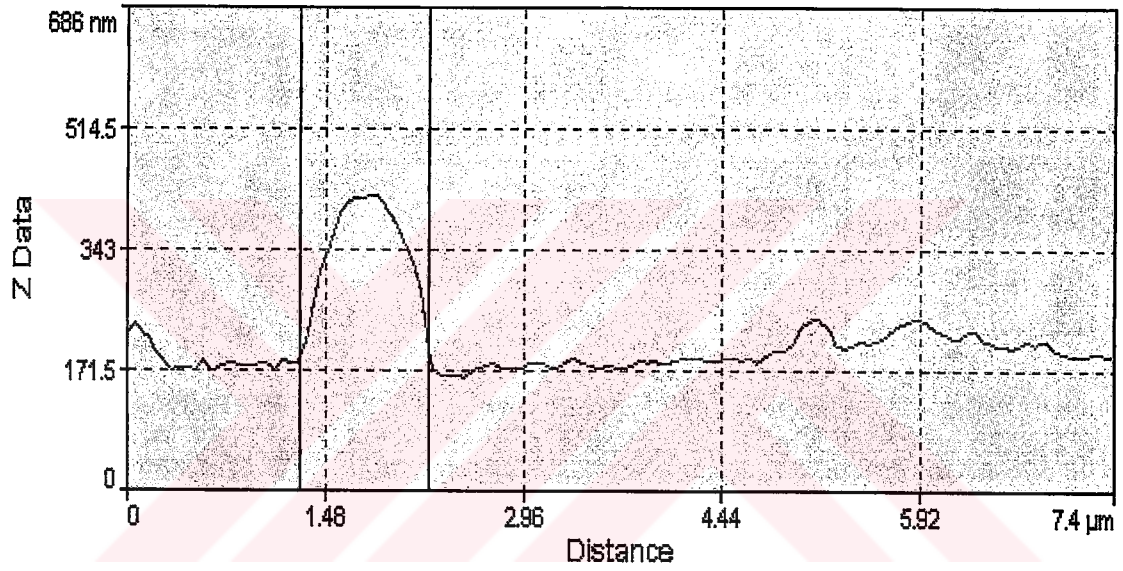


Şekil 4.2a : *S. enteritidis*'in boyut analizi (boy)

* *S. enteritidis*'in boyu 2.635 μ m olarak bulunmuştur.



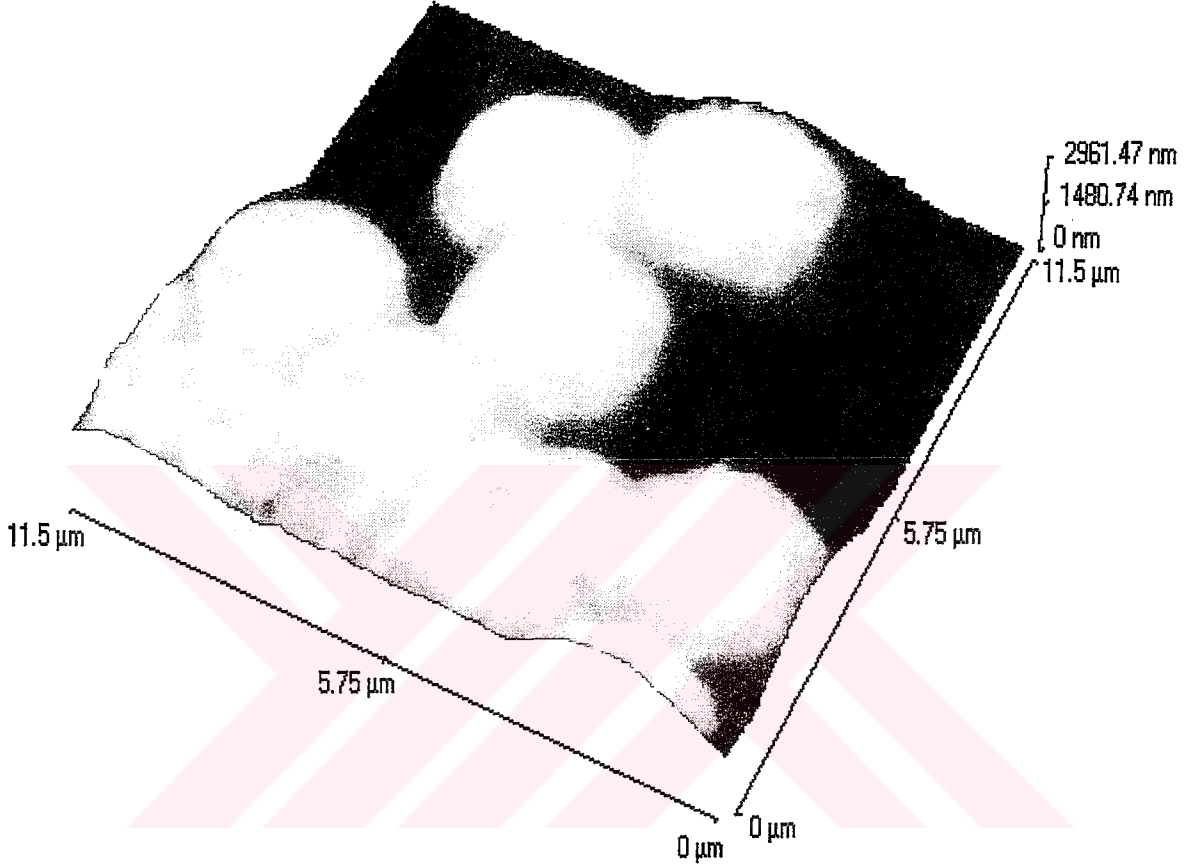
File Information:			
Zmin:	0.0 nm	Zmax: 685.4 nm	Scan Range: 16 μ m
Result:			
	Line1		
	X(μ m)	Y(μ m)	Z(nm)
Point1:	1.26		186.4
Point2:	2.25		213.1
Diff:	0.99		26.7
Length:	0.993 μ m *		
Pt Angle:	1.54°		



Şekil 4.2b : *S. enteritidis*'in boyut analizi (en)

* *S. enteritidis*'in eni 0.993 μ m olarak bulunmuştur.

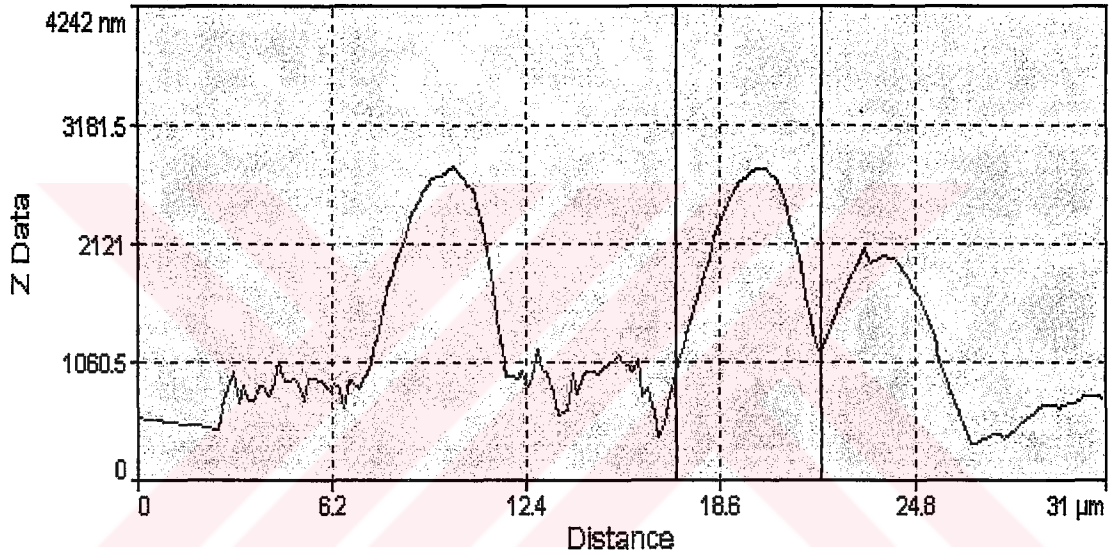
Şekil 4.3'de, anti-Salmonella kürecikleri görüntülenmiş ve bu küreciklerin çapı Şekil 4.4'de 4.518 μm olarak bulunmuştur. Bu küreciklerin çapı, Anon. (2000a)'da, 4.5 μm olarak belirtmiştir. Bu verilere dayanarak, ölçümlerin literatür ile uygunluğundan bahsedilebilir.



Şekil 4.3 : anti-Salmonella küreciklerinin topografik görüntüsü



File Information:			
Zmin:	0.0 nm	Zmax: 4241.0 nm	Scan Range: 62 μm
Result:			
	Line1		
	X(μm)	Y(μm)	Z(nm)
Point1:	16.9		930.3
Point2:	21.5		1154.2
Diff:	4.5		223.9
Length:	4.518 μm		
Pt Angle:	2.84°		



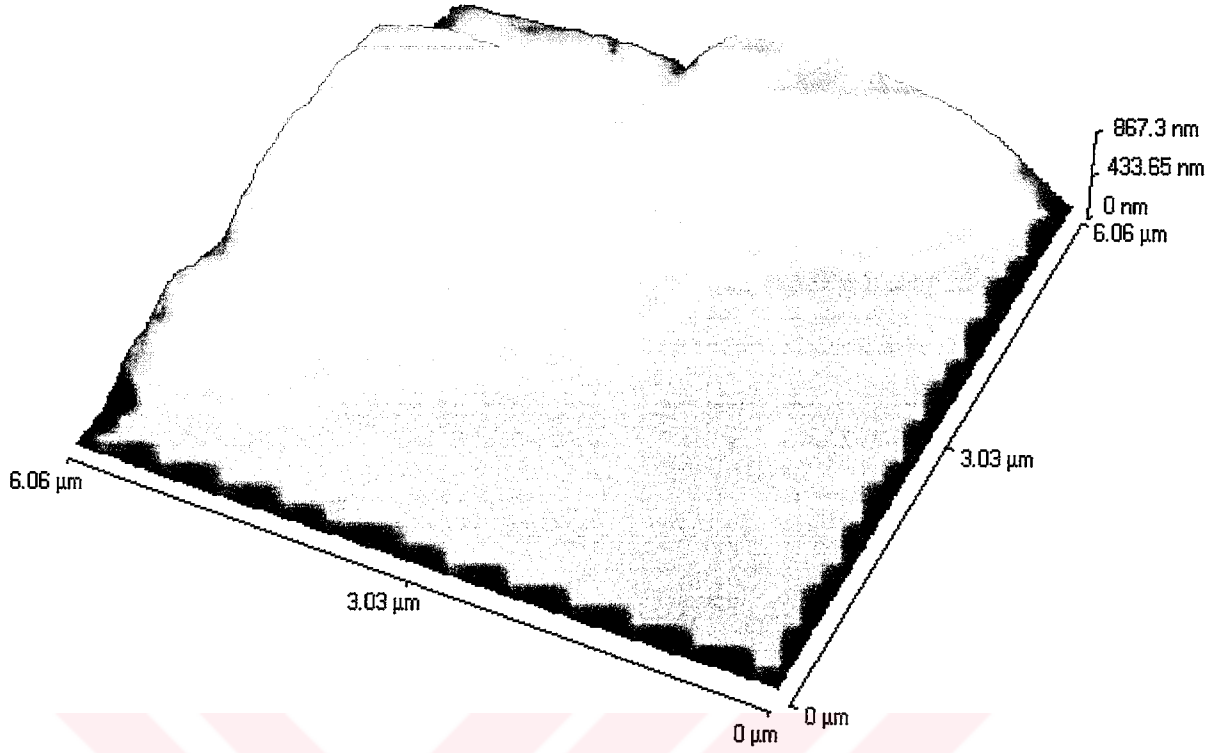
Şekil 4.4 : anti-Salmonella küreciklerinin boyut analizi

* anti-Salmonella küreciklerinin çapı 4.518 μm olarak bulunmuştur.

Son olarak, Şekil 4.5a ve 4.5b'de da *S. enteritidis*+anti-Salmonella kompleksleri görüntülenmiştir. Bu şekillerden de görülebileceği gibi anti-Salmonella küreciklerine sadece *S. enteritidis* bağlanmıştır. Bu bağlanma, kullanılan IMA yönteminin yüksek özgünlüğe sahip olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.5a : *S. enteritidis*+anti-Salmonella komplekslerinin topografik görüntüsü (iki anti-Salmonella küreciğine tutunmuş bir *S. enteritidis*)



Şekil 4.5b : *S. enteritidis*+anti-Salmonella komplekslerinin topografik görüntüsü
(Bir anti-Salmonella küreciğine tutunmuş *S. enteritidis*'ler)

IMA ve AKM yöntemlerinin bu şekilde birlikte kullanılması ile bütün bu bağlanma ve görüntüleme işlemleri, en çok 7-12 saatte tamamlanmaktadır. Klasik kültürel yöntemler ile izolasyonu ve tanımlanması 7-10 gün süren bu patojenin, bu şekilde izolasyonu ve tanımlanması çok kısa bir sürede ve hatasız yapılabilir. Bunda da, hem IMA yönteminin yüksek duyarlılıkta olmasının payı olmakta hem de küreciklere bağlanan bakterilerin AKM ile hemen görüntülenerek nanometre seviyesinde üç boyutlu topografik ölçümlerinin yapılabilmesinin payı olmaktadır. Bu iki yöntemin, bazı değişiklikler ile, gıdalara uygulanması yönünde herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Ancak; yüksek özgünlüğe sahip IMA yönteminin kullanılması ile gıdalardan izole edilen şüpheli kolonilerin AKM ile nanometre seviyesinde görüntülenip boyut analizlerinin yapılması ve hedef mikroorganizmanın literatürde belirtilen yüzey özellikleri ve boyutları ile karşılaştırılması, izolasyon ve tanımlama işlemlerini kolaylaştıracak ve hızlandıracaktır.

5. ÖNERİLER

Gelişen gıda bilimi ve teknolojisi çerçevesinde gıdalara yönelik mikrobiyolojik analizlerin daha çabuk ve daha duyarlı olan yöntemler ile gerçekleştirilmesine çalışılmaktadır. Örneğin; klasik kültürel yöntemler ile gıda maddesinde *Salmonella* aranması 4 gün, varlığının doğrulanması 3 gün olmak üzere toplam 7 gün sürmektedir. Gıda işletmesinde üretilen bir gıda maddesinde bu analizlerin yapılması ve ürünün temiz olması durumunda piyasaya verilmesi, çoğu kez mümkün olmamakta ve büyük risklere girilmektedir. Bir başka deyişle, üretilen bir gıdanın mikrobiyal kalitesinin saptanması için klasik kültürel yöntemler pratik olma açısından yetersiz kalmaktadır.

Hızlı yöntemlerden biri olan IMA yöntemi ise, klasik kültürel yöntemlerdeki seçici zenginleştirme basamağının yerine kullanılarak analiz süresini 1 gün kısaltmakta ve bu yöntemin yüksek özgünlüğü ve kolay uygulanabilirliği klasik kültürel yöntemler ile karşılaştırıldığında, IMA yönteminin üstünlüğü ortaya çıkmaktadır. IMA yöntemi-çekirdek metodu kullanıldığında ise, analiz süresi klasik kültürel yöntemlere göre değişmemekte ancak *Salmonella*+anti-*Salmonella* komplekslerinin, seçici katı besiyerlerine inokülasyonlarından önce RV Broth gibi seçici bir besiyerinde inkübe edilmeleri, IMA yönteminin seçiciliğini arttırmaktadır.

Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneği ve yapay olarak kontamine edilen 14 adet gıda örneği ile yapılan bu çalışmada da; IMA yöntemi-çekirdek metodu, klasik kültürel yöntemlerden biri olan ISO 6579 referans metodu ile karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında önemli bir fark olmadığı ($P > 0.05$) bulunmuştur. Ancak gıdalardan *Salmonella* izolasyonu amaçlandığında IMA yönteminin, gerek analiz süresini kısaltması gerekse yüksek özgünlüğe sahip olarak rekabetçi diğer mikroorganizmaların küreciklere tutunmasını engellemesi nedeni ile, klasik kültürel yöntemlerdeki seçici zenginleştirme basamağına alternatif olarak kullanılmasının daha elverişli olacağı belirtilmektedir. Ayrıca, izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonilerinin AKM ile görüntülenerek boyut analizlerinin yapılması ile de, tanımlama ve doğrulama analizleri öncesi çok kısa bir sürede hedef bakterinin belirlenmesinde ön bir bilgiye ulaşılabilmektedir. Ancak, gıdalardan izole edilen şüpheli *Salmonella* izolatları AKM ile incelenirken, gerek gıdadan gerekse kullanılan besiyeri ve çözelti bileşimlerinden kaynaklanan

görüntü kirliliğini engellemek için, çok temiz bir şekilde preparatın hazırlanması gerekmekte ve AKM ile edilen ön bilginin tanımlama ve doğrulama analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışma bulgularının da, bu tip hızlı yöntemleri geliştirecek daha ileri araştırmalara katkı oluşturabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akdemir Evrendilek, G., Richter, E.R. and Chism, G.W. 2001. Concurrent detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* from a single enrichment in 24 hours. *Journal of Food Safety*. 21, 75-86.
- Andrews, W.H., 1985, A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods, *Food Technology*. March, 77-82.
- Anonymous, 2002, Dynal Immunosystems Manual, Oslo, Norway, pp. 1.1-12.6.
- Anonymous, 2000a, Dynal Bioscience Product Catalogue, Oslo, Norway, 76p.
- Anonymous, 2000b, Merck Microbiology Manual, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 407p.
- Anonymous, 2000c, Oxoid *Salmonella* Latex Test-Package Insert, England.
- Anonymous, 2000d, bioMérieux API 10S-Package Insert, France.
- Anonymous, 1999a, Dynal Enrichment of *Salmonella*-Package Insert, Oslo, Norway.
- Anonymous, 1999b, LAB M Culture Media Manual Version 06/0199, idg, England, 112p.
- Anonymous, 1998a, Dynal Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Oslo, Norway, pp. 181p.
- Anonymous, 1998b, Dynal Cells&Proteins Nucleic Acids Microorganisms Product Catalogue, Oslo, Norway, 64p.
- Anonymous, 1998c, AOAC Official Method 967.25 *Salmonella* in Foods-Preparation of Culture Media and Reagents, 3p.
- Anonymous, 1998d, AOAC Official Method 967.27 *Salmonella* in Foods-Identification, 3p.
- Anonymous, 1996a, Salmonellae. Microorganisms in Foods 5 Microbiological Specifications of Food Pathogens ICMSF. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Great Britain, pp. 219-264.
- Anonymous, 1996b, Dynal Cell Separation and Protein Purification, Oslo, Norway, 165p.
- Anonymous, 1996c, Mikrobiyoloji-*Salmonella* Aranması Metotlarında Genel Kurallar, TS 7438, 18s.
- Anonymous, 1994, Topometrix User's Manual, Version 3.OX, Appendix 2, 85-10086.

- Bean, N.H., Goulding, J.S., Daniels, M.W.T. and Angulo, F.J., 1997, Surveillance of foodborne disease outbreaks-United States, 1988-1992, *Journal of Food Protection*. 60, 1265-1286.
- Bennett, A.R., Davids, F.G.C., Vlahodimou, S., Banks, J.G. and Betts, R.P., 1997, The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of *Salmonella*, *Journal of Applied Microbiology*. 83, 259-265.
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C., 1986, Atomic force microscope, *Physical Review Letters*. 56, 930-933.
- Bird, J.A., Easter, M.C., Hadfield, S.G., May, E. and Stringer, M., 1989, Rapid *Salmonella* detection by a combination of conductance and immunological techniques. *Rapid Microbial Methods for Foods, Beverages and Pharmaceuticals*. Standard, C.J., Petitt, S.B. and Skinner, F.A. (eds.), Society for Applied Bacteriology Technical Series 25, Oxford Blackwell Science, pp. 165-184.
- Birnbaum, S. and Larsson, P.O., 1982, Application of magnetic immobilized microorganisms. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 7, 55-57.
- Blackburn, C. de W., 1991, Separation and detection of *Salmonella* using immunomagnetic particles, *Biofouling*. 5, 143-155.
- Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F. and Colin, P., 1997, Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products, *International Journal of Food Microbiology*. 38, 211-216.
- Bohra, L.K., 2000, Evaluation of 5' nuclease based assays for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* from food, cattle feces and enrichment broth systems. Thesis of PhD, Food Science Graduate Program, Kansas State University, Manhattan, USA, pp. 2-13.
- Bowen, W.R., Hilal, N., Lovitt, R.W. and Wright, C.J. 1999, Atomic force microscopy. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2. Robinson, R.K. (Chief ed.), Academic Press, Great Britain, pp. 1418-1425.
- Chandler, D.P., Brown, J., Call, D.R., Wunschel, S., Grate, J.W., Holman, D.A., Olson, L., Stottlemire, M.S. and Bruckner-Lea, C.J., 2001, Automated immunomagnetic separation and microassay detection of *Escherichia coli* O157:H7 from poultry carcass rinse, *International Journal of Food Microbiology*. 70, 143-154.
- Che, Y.H., Li, Y., Slavik, M. and Paul, D., 2000, Rapid detection of *Salmonella typhimurium* in chicken carcass wash water using an immunoelectrochemical method, *Journal of Food Protection*. 63, 8, 1043-1048.
- Clay, C.E. and Board, R.G., 1991, Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens' shells eggs, *Epidemiol. Inf.* 106, 271-281.

- Coleman, D.J., Chick, K.E. and Nye, K.J., 1995a, An evaluation of immunomagnetic separation for the detection of salmonellas in raw chicken carcasses, *Letters in Applied Microbiology*. 21, 152-154.
- Coleman, D.J., Nye, K.J., Chick, K.E. and Gagg, C.M., 1995b, A comparison of immunomagnetic separation plus enrichment with conventional *Salmonella* culture in the examination of raw sausages, *Letters in Applied Microbiology*. 21, 249-251.
- Cox, J. 1999, *Salmonella*/Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2. Robinson, R.K. (Chief ed.), Academic Press, Great Britain, pp. 1929-1937.
- Cudjoe, K.S. 1999, *Salmonella*-detection by immunomagnetic particle-based assay. *Encyclopedia of Food Microbiology* Volume 2. Robinson, R.K. (Chief ed.), Academic Press, Great Britain, pp. 1968-1976.
- Cudjoe, K.S. and Krona, R., 1997, Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads® anti-Salmonella and a conventional reference method, *International Journal of Food Microbiology*. 37, 55-62.
- Cudjoe, K.S., Hagtvedt, T. and Dainty, R., 1995, Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA, *International Journal of Food Microbiology*. 27, 11-25.
- Cudjoe, K.S., Krona, R. and Olsen, N.N., 1994a, IMS: a new selective technique for detection of *Salmonella* in foods, *International Journal of Food Microbiology*. 23, 159-165.
- Cudjoe, K.S., Krona, R., Gron, B. and Olsen, E., 1994b, Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover *Salmonella enteritidis* from raw eggs, *International Journal of Food Microbiology*. 23, 149-158.
- Cudjoe, K.S., Thorsen, L.I., Sorenson, T., Reseland, J., Olsvik, O. and Granum, P.E., 1991, Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA, *International Journal of Food Microbiology*. 12, 313-322.
- D'Aoust, J.-Y. 2000, *Salmonella*. *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Volume 2. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. (eds.), Aspen Publishers, Inc., Maryland, pp. 1233- 1299.
- Davies, R.H. and Wray, C., 1997, Immunomagnetic separation for enhanced flagellar antigen phase inversion in *Salmonella*, *Letters in Applied Microbiology*. 24, 217-220.
- De Boer, E. and Beumer, R.R., 1999, Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*. 50, 119-130.

- Dufrêne, Y.F., 2001, Atomic force microscopy of microbial cells, *European Microscopy and Analysis*, March, 25-27.
- Dziadkowiec, D., Mansfield, L.P. and Forsythe, S.J., 1995, The detection of *Salmonella* in skimmed milk powder enrichments using conventional methods and immunomagnetic separation, *Letters in Applied Microbiology*. 20, 361-364.
- Edstrom R.D., Yang, X., Lee, G. and Evans, D.F., 1990, Viewing molecules with scanning tunneling microscopy and atomic force microscopy, *FASEB*. 4, 3144-3151.
- Erdem, B. 1999, *Enterobacteriaceae/Salmonella*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ustaçelebi, Ş. (Baş Editör), Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, s. 489-502.
- Ergün, M.A., 1999, Atomik kuvvet mikroskopunun sitogenetik analizde kullanımı, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 52s.
- Flygare, S. and Larsson, P.O., 1987, Steroid transformation using magnetically immobilized *Mycobacterium* spp., *Enzyme and Microbial Technology*. 9, 494-499.
- Fratamico, P.M. and Crawford, C.G. 1999, Detection by commercial particle-based assays. *Encyclopedia of Food Microbiology Volume 2*. Robinson, R.K. (Chief ed.), Academic Press, Great Britain, pp. 655-661.
- Garcia-del Portillo, F. 2000, Molecular and cellular biology of *Salmonella* pathogenesis. *Microbial Foodborne Diseases: Mechanisms of Pathogenesis and Toxin Synthesis*. Cary, J.W., Linz, J.E. and Bhatnagar, D. (eds). Technomic Publishing Company, USA. pp. 1-51.
- Gast, R.K., 1993, Recovery of *Salmonella enteritidis* from inoculated pools of egg contents, *Journal of Food Protection*. 56, 21-24.
- Gruenewald, R., Henderson, R.W. and Yappow, S., 1991, Use of Rambach Propylene Glycol Containing Agar for Identification of *Salmonella* spp., *Journal of Clinical Microbiology*. 29, 10, 2354-2356.
- Hammack, T.S., Amaguana, R.M. and Andrews, W.H., 2001, An improved method for the recovery of *Salmonella* serovars from orange juice using universal preenrichment broth, *Journal of Food Protection*. 64, 5, 659-663.
- Hammack, T.S., Amaguana, R.M., June, G.A., Sherrod, P.S. and Andrews, W.H., 1999, Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* spp. from foods with a low microbial load, *Journal of Food Protection*. 62, 1, 16-21.

- Hanai, K., Satake, M., Nakanishi, H. and Venkateswaran, K., 1997, Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods, *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2, 775-778.
- Hardwick, R.A., Prisco, M.R. and Shah, D.O., 1990, A large-scale magnetic separator for selective cell separations with paramagnetic microbeads, *Artificial Organs*. 14, 5, 342-347.
- Internet 1: 2001, DBMD-Salmonellosis/General information.
http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm
- Internet 2: 2001, National Molecular Subtyping Network for Foodborne Diseases Surveillance (PulseNet). <http://www.cdc.gov/pulsenet>.
- Johansen, C., Gill, T. and Gram, L., 1996, Changes in cell morphology of *Listeria monocytogenes* and *Shewanella putrefaciens* resulting from the action of protamine, *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 3, 1058-1064.
- Johne, B., Jarp, J. and Haaheim, L.R., 1989, *Staphylococcus aureus* exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy, *Journal of Clinical Microbiology*. 27, 1631-1635.
- Kapperud, G., Vardunt, T., Skjerve, E., Hornes, E. and Michaelsen, T.E., 1993., Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA, *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 2938-2944.
- Karapınar, M. ve (Aktuğ) Gönül, Ş. 1998, Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar/Aktif gıda enfeksiyonları (Enfeksiyon tipi gıda zehirlenmeleri)/*Salmonella* enfeksiyonları. Gıda Mikrobiyolojisi, Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (Editörler), Mengi Tan Basımevi, İzmir, s. 112- 122.
- Kronick, P. and Gilpin, R.W., 1986, Use of superparamagnetic particles for isolation of cells, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 12, 73-80.
- Li, X., Boudjellab, N. and Zhao, X., 2000, Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*. 56, 167-177.
- Li, X., 1999, Rapid detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in milk by immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. Thesis of Master of Science, Department of Animal Science, MacDonald Campus of McGill University, Montreal, Quebec, Canada, pp. 3-10.
- Luk, J.M.C. and Lindberg, A.A., 1991, Rapid and sensitive detection of *Salmonella* (O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays, *Journal of Immunological Methods*. 137, 1-8.

- Lund, A., Hellemann, A.L. and Vartdal, F., 1988, Rapid isolation of K88⁺ *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles, *Journal of Clinical Microbiology*. 26, 2572-2575.
- Malkova, K., Rauch, P., Wyatt, G.M. and Morgan, M.R.A., 1998, Combined immunomagnetic separation and detection of *Salmonella enteritidis* in food samples, *Food and Agricultural Immunology*. 10, 271-280.
- Mandrell, R.E. and Wachtel, M.R., 1999, Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry, *Current Opinion in Biotechnology*. 10, 273-278.
- Mansfield, L.P. and Forsythe, S.J., 2000a, Detection of salmonellae in food, *Reviews in Medical Microbiology*. 11, 1, 37-46.
- Mansfield, L.P. and Forsythe, S.J., 2000b, The detection of *Salmonella* using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure, *Letters in Applied Microbiology*. 31, 279-283.
- Mansfield, L. and Forsythe, S., 1996, Collaborative ring-trial of Dynabeads[®] anti-*Salmonella* for immunomagnetic separation of stressed *Salmonella* cells from herbs and spices, *International Journal of Food Microbiology*. 29, 41-47.
- Mansfield, L.P. and Forsythe, S.J., 1993, Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection, *Letters in Applied Microbiology*. 16, 122-125.
- Mattingly, J.A., 1984, An enzyme immunoassay for the detection of all *Salmonella* using a combination of a myeloma protein and a hybridoma antibody, *Journal of Immunological Methods*. 73, 147-156.
- Molla, B., Kleer, J. and Sinell, H.-J., 1996, Coupling of immunomagnetic separation and ELISA for the rapid detection of *Salmonella* in foods, *Fleischwirtschaft*. 76, 8, 823-825.
- Molla, B., Kleer, J. and Sinell, H.-J., 1994, Detection of *Salmonella* in foods by immunomagnetic separation, *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 45, 5, 110-113.
- Okrend, A.J.G., Rose, B.E. and Lattuada, C.P., 1992, Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads, *Journal of Food Protection*. 55, 214-217.
- Özbaş, Z.Y. ve Aytaç, S.A., 2000, Bazı patojen bakterilerin gıdalarda immunomanyetik ayırma sistemi ile belirlenmesi, TOGTAG, Proje No: 1708. Ankara, 51s.
- Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B. and Altwegg M., 1995, Typhoid fever and other salmonellosis: A continuing challenge. *Trends in Microbiology*. 3, 253-255.

- Parmar, N., Easter, M.C. and Forsythe, S.J., 1992, The detection of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* using immunomagnetic separation and conductance microbiology, *Letters in Applied Microbiology*. 15, 175-178.
- Patel, P.D. 1994, Microbiological applications of immunomagnetic techniques. *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Patel, P.D. (ed.), Chapman & Hall, Great Britain, pp. 104-130.
- Peng, H. and Shelef, L.A., 1999, Automated rapid screening of foods for the presence of salmonellae, *Journal of Food Protection*. 62, 11, 1341-1345.
- Reissbrodt, R., Vielitz, E., Kormann, E., Rabsch, W. and Kühn, H., 1996, Ferrioxamine E-supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for *Salmonella*, *International Journal of Food Microbiology*. 29, 81-91.
- Rijpens, N., Herman, L., Vereecken, F., Jannes, G., Smedt, J.D. and Zutter, L.D., 1999, Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR, *International Journal of Food Microbiology*. 46, 37-44.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L. and Grasso, G.M., 1999, Evaluation of immunomagnetic separation and plating media for recovery of *Salmonella* from meat, *Journal of Food Protection*. 62, 2, 198-201.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Ruberto, A., Iannitto, G. and Grasso, G.M., 1997, Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring *Salmonella* in raw pork sausages and chicken meat, *Letters in Applied Microbiology*. 24, 493-497.
- Safarik, I. and Safarikova, M., 1999, Review: Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *Journal of Chromatography B*. 722, 33-53.
- Safarik, I., Safarikova, M. and Forsythe, S.J., 1995, A review: The application of magnetic separations in applied microbiology, *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 575-585.
- Safarikova, M. and Safarik, I., 2001, Immunomagnetic separation of *Escherichia coli* O26, O111 and O157 from vegetables, *Letters in Applied Microbiology*. 33, 36-39.
- Sharp, J.C.M. and Reilly, W.B.J. 2000, Surveillance of foodborne diseases. *The Microbiological Safety and Quality of Food, Volume 2*. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. (eds.), Aspen Publishers, Inc., Maryland, pp. 975-1003.
- Shaw, S.J., Blais, B.W. and Nundy, D.C., 1998, Performance of the Dynabeads anti-Salmonella system in the detection of *Salmonella* species in foods, animal feeds and environmental samples, *Journal of Food Protection*. 61, 11, 1507-1510.

- Skjerve, E. and Olsvik, O., 1991, Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods, *International Journal of Food Microbiology*. 14, 11-18.
- Skjerve, E., Rorvik, L.M. and Olsvik, O., 1990, Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation, *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 3478-3481.
- Tan, E., 2001, Atomik kuvvet mikroskobu, TMMOB Fizik Mühendisleri Odası (FMO) Bülteni., Haziran, 20-26.
- Temiz, A., 2000, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 3. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 291s.
- Tomoyasu, T., 1992, Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study, *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2679-2682.
- Trkov, M., Majerikova, I., Jerasek, B., Stefanovicova, A., Rijpens, N. and Kuchta, T., 1999, Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction, *Food Microbiology*. 16, 393-399.
- Velazquez, M., Tatini, S.R. and Feirtag, J.M., 2000, Evaluation of a two-step protocol for rapid detection of *Salmonella* in ice-cream and Cheddar cheese, *Food Microbiology*. 17, 349-359.
- Vermunt, A.E.M., Franken, A.A.J.M. and Beumer, R.R., 1992, Isolation of salmonellas by immunomagnetic separation, *Journal of Applied Bacteriology*. 72, 112-118.
- Widjoatmodjo, M.N., Fluit, A.C., Torensma, R., Keller, B.H.I. and Verhoef, J., 1991, Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 10, 11, 935-938.
- Yu, H. and Bruno, J.G., 1996, Immunomagnetic-Electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples, *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2, 587-592.

EKLER DİZİNİ

EK 1. ÇALIŞMADA KULLANILAN DİLÜSYON SIVILARI ve TAMPON ÇÖZELTİLER

IMA Yıkama Çözeltisi

IMA yöntemi-çekirdek metodundan kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

0.15 M NaCl ve 0.01 M sodyum fosfat tamponu içeren çözeltinin (8.77 gram NaCl+0.262 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ +1.442 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /1 L damıtık su) pH'sı NaOH çözeltisi ile 7.4'e ayarlanır. Bu çözeltiye, daha sonra, 0.5 mL Tween 20 eklenir. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Çözelti buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 1999a).

Serum Fizyolojik Çözeltisi

Ardışık dilüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

8.5 gram NaCl, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Test tüplerine ya da erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda (9 mL, 90 mL. vb. gibi) dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Çözelti buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Temiz, 2000).

EK 2. ÇALIŞMADA KULLANILAN BOYA ÇÖZELTİLERİ

Kristal Violet Çözeltisi

Gram boyamada kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

0.5 gram kristal violet, 100 mL damıtık su içinde çözdürülür (Temiz, 2000).

Lugol (Gram İyot) Çözeltisi

Gram boyamada kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

2 gram KI, 300 mL damıtık su içinde çözdürülür. Bu çözeltiye, daha sonra, 1 gram iyice ezilmiş iyot kristali eklenir ve oda sıcaklığında tam bir çözünme sağlanıncaya kadar karıştırılır (Temiz, 2000).

Safranin Çözeltisi

Gram boyamada kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

0.5 gram safranin, 10 mL %95'lik etil alkol içinde çözdürülür ve 100 mL damıtık su ile karıştırılır (Temiz, 2000).

EK 3. ÇALIŞMADA KULLANILAN İNDİKATÖR ve AYIRAÇLAR

Kovac's Ayıracı

Mikroorganizmaların, Tripton Water besiyerinde, triptofandan indol oluşturup-oluşturmadığını belirlemek amacı ile indol testinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

10 gram p-dimetil aminobenzaldehit, 150 mL butil alkol içinde çözdürülür. Bu çözeltiye, daha sonra, 50 mL konsantre HCl eklenir. Çözelti ışıktan korunacak şekilde buzdolabında muhafaza edilmelidir ve ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 1998c).

Metil Kırmızısı İndikatörü

Mikroorganizmaların, Glukoz Fosfat besiyerinde, glukozdan asit oluşturup-oluşturmadığını belirlemek amacı ile metil kırmızısı testinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

0.2 gram metil kırmızısı, 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözdürülür. Bu çözeltiye, daha sonra, 50 mL damıtık su eklenir. Çözelti buzdolabında muhafaza edilmelidir ve ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Temiz, 2000).

%40'lık KOH Çözeltisi

Voges-Proskauer testinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

40 gram KOH, 50 mL damıtık su içinde çözdürülür. Bu çözelti, daha sonra, damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanır. Çözelti buzdolabında muhafaza edilmelidir ve ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 1998c).

α -Naftol Çözeltisi

Mikroorganizmaların, Glukoz Fosfat besiyerinde, glukozdan asetil metil karbinol (asetoin) oluşturup-oluşturmadığını belirlemek amacı ile Voges-Proskauer testinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

5 gram α -Naftol, 100 mL %95'lik etil alkol içinde çözdürölür. Çözelti ışıktan korunacak şekilde buzdolabında en fazla 1 hafta muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir. α -Naftol karsinojenik özellikte olduğundan dolayı, çözelti hazırlanırken dikkatli olunmalıdır (Anon., 1998c).



EK 4. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS)

Gerek ISO 6579 referans metodunun gerekse IMA yöntemi-çekirdek metodunun ön zenginleştirme basamağında kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Pepton	10
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9
KH ₂ PO ₄	1.5
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.2 ± 0.2

Hazırlanışı:

Bileşenler tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 1996c).

Triptik Soy Broth (TS Broth)-MERCK Cat. No. 1.00800

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Kazein peptonu	17
Soya peptonu	3
D (+) glukoz	2.5
NaCl	5
K ₂ PO ₄	2.5
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.3 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 30 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 2000b).

Selenit Sistin Broth (SC Broth)-MERCK Cat. No. 1.07709

ISO 6579 referans metodunun seçici zenginleştirme basamağında kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Kazein peptonu	5
L (-) sistin	0.01
Laktoz	4
Fosfat tamponu	10
Sodyum hidrojen selenit	4
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.0 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 23 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, gerekirse çözdürme işleminin verimini arttırmak amacı ile maksimum 60°C sıcaklıktaki su banyosunda bekletilir. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Besiyeri buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 2000b).

Rappaport-Vassiliadis Broth (RV Broth)-LAB M No. LAB 86

ISO 6579 referans metodunun seçici zenginleştirme basamağında kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Soya peptonu	4.5
NaCl	7.2
KH ₂ PO ₄	1.26
K ₂ HPO ₄	0.18
Magnezyum klorit (susuz)	13.58
Malaşit yeşili	0.033
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>
pH: 5.2 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 26.8 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 1999b).

Triptik Soy Agar (TS Agar)

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Kazein peptonu	17
Soya peptonu	3
D (+) glukoz	2.5
NaCl	5
K ₂ PO ₄	2.5
Agar	15
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>
pH: 7.3 ± 0.2	

TSB besiyerinin hazır karışıma 15 gram agar eklenerek tartılan karışım, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara ya da test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, erlen, balon gibi cam kaplardaki besiyeri

Petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır ya da besiyerini içeren tüpler yatık halde katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren Petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır. Besiyerini içeren tüpler de buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 2000b, Temiz, 2000).

Rambach Agar*-MERCK Cat. No. 1.07500

Gerek ISO 6579 referans metodunun gerekse IMA yöntemi-çekirdek metodunun seçici katı besiyerlerine inokülasyon basamağında kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Pepton	8
NaCl	5
Sodyum deoksiçolat	1
Kromojenik karışım	1.5
Propilen glikol	10.5
Agar	15
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>
pH: 7.3 ± 0.2	

Hazırlanışı:

1 vial sıvı karışım, 250 mL damıtık su içinde çözündürülür. Bu çözeltinin üzerine, daha sonra, 1 vial besiyeri eklenir. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, çözdürme işleminin verimini arttırmak amacı ile kaynar su banyosunda bekletilir ve sık sık karıştırılır. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon sonrası, besiyeri Petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren Petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır (Anon., 2000b).

* Mat pembe renkli bu besiyerinde Salmonellalar, kırmızı renkli koloniler oluşturmaktadır.

BPLS Agar*-MERCK Cat. No. 1.07237

Gerek ISO 6579 referans metodunun gerekse IMA yöntemi-çekirdek metodunun seçici katı besiyerlerine inokülasyon basamağında kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Et peptonu	5
Kazein peptonu	5
Et ekstraktı	5
NaCl	3
Na ₂ HPO ₄	2
Laktoz	10
Fenol kırmızısı	0.08
Brilliant yeşili	0.0125
Agar	12
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>
pH: 6.9 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 57 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, besiyeri Petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren Petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır (Anon., 2000b).

* Kırmızı renkli bu besiyerinde Salmonellalar, kırmızı zon ile çevrilmiş pembe renkli koloniler oluşturmaktadır.

Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formülü)*-LAB M No. HAL001

Gerek ISO 6579 referans metodunun gerekse IMA yöntemi-çekirdek metodunun seçici katı besiyerlerine inokülasyon basamağında kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Sığır eti ekstraktı	5
Pepton	5
Sodyum sitrat	8.5
Sodyum deoksiçolat	5
X-∞-Gal	0.08
CHE-Gal	0.3
Ferrik amonyum sitrat	0.5
IPTG	0.03
Agar	12
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.2 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 36.5 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, çözündürme işleminin verimini arttırmak amacı ile kaynar su banyosunda bekletilir ve sık sık karıştırılır. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon sonrası, besiyeri Petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren Petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır (Anon., 1999b).

* Açık sarı renkli bu besiyerinde Salmonellalar, saydam zon ile çevrilmiş mavi-yeşil renkli koloniler oluşturmaktadır.

Ksiloz Lizin Deoksiçolat Agar (XLD Agar)*-MERCK Cat. No. 1.05287

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Maya ekstraktı	3
NaCl	5
D (+) ksiloz	3.5
Laktoz	7.5

devam ediyor

L (+) lizin	5
Sodyum deoksiçolat	2.5
Sodyum tiyosülfat	6.8
Amonyum demir (III) sitrat	0.8
Fenol kırmızısı	0.08
Agar	13.5
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.4 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 55 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, çözündürme işleminin verimini arttırmak amacı ile kaynar su banyosunda bekletilir ve sık sık karıştırılır. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon sonrası, besiyeri Petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren Petri kapları ters olarak buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi yüzeyleri kurutulmalıdır (Anon., 2000b).

* Kırmızı renkli bu besiyerinde Salmonellalar, bazen siyah bazen de saydam merkezli kırmızı renkli koloniler oluşturmaktadır.

Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)-MERCK Cat. No. 1.03915

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Kazein peptonu	15
Et peptonu	5
Et ekstraktı	3
Maya ekstraktı	3
NaCl	5
Laktoz	10
Sukroz	10
D (+) glukoz	1

devam ediyor

Amonyum demir (III) sitrat	0.5
Sodyum tiyosülfat	0.5
Fenol kırmızısı	0.024
Agar	12
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.4 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 65 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası, besiyerini içeren tüpler yatık halde katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 2000b).

Tripton Water

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

<u>Bileşimi:</u>	gram/L
Kazein peptonu	10
NaCl	5
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.3 ± 0.2

Hazırlanışı:

Bileşenler tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözdürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Temiz, 2000).

Glukoz Fosfat Broth

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

Bileşimi: gram/L

Pepton	5
D-glukoz	5
K ₂ HPO ₄	5
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

pH: 7.5 ± 0.2

Hazırlanışı:

Bileşenler tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Test tüplerine gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Temiz, 2000).

Üre Agar-MERCK Cat. No. 1.08492

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

Bileşimi: gram/L

Et peptonu	1
D (+) glukoz	1
NaCl	5
KH ₂ PO ₄	2
Fenol kırmızısı	0.012
Agar	12
<u>Damıtık su</u>	<u>1 L</u>

+ %40'lık üre çözeltisi 50 mL

pH: 6.8 ± 0.2

Hazırlanışı:

Hazır karışımdan 21 gram tartılarak, 1 L damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası besiyerine, filtrasyon yöntemi ile sterilize edilmiş, 50 mL %40'lık üre çözeltisi eklenir ve karıştırılarak gerekli

miktarlarda steril test tüplerine dağıtılır. Besiyerini içeren tüpler yatık halde katılaşmaya bırakılır. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir (Anon., 2000b).

Karbonhidrat Fermentasyon Besiyerleri

Mannitol içeren besiyeri

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

Bileşimi:

Pepton	10 g
Et ekstraktı	3 g
NaCl	5 g
Bromkresol moru çözeltisi	3 mL
<u>Damıtık su</u>	<u>886 mL</u>
+ %10'luk mannitol çözeltisi	111 mL

Hazırlanışı:

Bileşenler ve bromkresol moru çözeltisi (0.012 gram bromkresol moru+0.4 mL 0.05 N NaOH+2.6 mL damıtık su) tartılarak, 886 mL damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası besiyerine 111 mL, filtrasyon yöntemi ile sterilize edilmiş, %10'luk mannitol çözeltisi eklenir ve karıştırılarak gerekli miktarlarda steril test tüplerine dağıtılır. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir.

Salisin içeren besiyeri

Tanımlama ve doğrulama analizlerinde kullanılmıştır.

Bileşimi:

Pepton	10 g
--------	------

devam ediyor

Et ekstraktı	3 g
NaCl	5 g
Bromkresol moru çözeltisi	3 mL
<u>Damıtık su</u>	<u>886 mL</u>
+ %10'luk salisin çözeltisi	111 mL

Hazırlanışı:

Bileşenler ve bromkresol moru çözeltisi (0.012 gram bromkresol moru+0.4 mL 0.05 N NaOH+2.6 mL damıtık su) tartılarak, 886 mL damıtık su içinde çözündürülür. Erlen, balon gibi cam kaplara gerekli miktarlarda dağıtılarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sterilizasyon sonrası besiyerine 111 mL, filtrasyon yöntemi ile sterilize edilmiş, %10'luk salisin çözeltisi eklenir ve karıştırılarak gerekli miktarlarda steril test tüplerine dağıtılır. Besiyerini içeren tüpler buzdolabında muhafaza edilmelidir ve kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Birce Mercanoğlu

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 14 Temmuz 1976

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1991-1994 TED Ankara Koleji

Lisans 1995-1999 Hacettepe Üniversitesi Mühendislik
Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : 2000- Araş.Gör. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik
Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü