



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇİKOLATA VE SÜTLÜ-KREMALİ
KEKLERİN ÜRETİM AŞAMALARINDA
POTANSİYEL RİSK
OLUŞTURABİLECEK *LISTERIA*
MONOCYTOGENES, *CRONOBACTER*
(*ENTEROBACTER*) *SAKAZAKII* VE
SALMONELLA SPP. PATOJEN
BAKTERİLERİNİN REAL-TİME PCR
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Büşra AKGÜL KESER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 13.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ÇİKOLATA VE SÜTLÜ-KREMALİ KEKLERİN
ÜRETİM AŞAMALARINDA POTANSİYEL RİSK
OLUŞTURABİLECEK *LISTERIA MONOCYTOGENES*,
CRONOBACTER (ENTEROBACTER) SAKAZAKII VE
SALMONELLA SPP. PATOJEN BAKTERİLERİNİN
REAL-TİME PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Büşra AKGÜL KESER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 13.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

Büşra AKGÜL KESER tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan ‘Çikolata ve Sütü-Kremalı Keklerin Üretim Aşamalarında Potansiyel Risk Oluşturabilecek *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* ve *Salmonella* spp. Patojen Bakterilerinin Real-Time PCR Yöntemi İle Belirlenmesi’ başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.08.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ
Raportör Üye : Prof. Dr. İsmail KARABOZ
Üye : Doç. Dr. H. Halil BIYIK

İmza


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Çikolata ve Sütü-Kremalı Keklerin Üretim Aşamalarında Potansiyel Risk Oluşturabilecek *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* ve *Salmonella spp.* Patojen Bakterilerinin Real-Time PCR Yöntemi İle Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13 / 08 / 2015



Büşra AKGÜL KESER

ÖZET

**ÇİKOLATA VE SÜTLÜ-KREMALİ KEKLERİN ÜRETİM
AŞAMALARINDA POTANSİYEL RİSK OLUŞTURABİLECEK
LİSTERİA MONOCYTOGENES, *CRONOBACTER*
(*ENTEROBACTER*) *SAKAZAKİİ* VE *SALMONELLA SPP.* PATOJEN
BAKTERİLERİNİN REAL-TİME PCR YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ**

KESER AKGÜL, Büşra

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

Ağustos 2015, 98 sayfa

Bu araştırmada bir gıda üretim tesisinde 01.11.2013-30.04.2014 tarihleri arasında toplam altı ay boyunca üretilen ürünlerin (çikolata ve sütlü-kremalı kekler); hammadde, yarı ürün (üretim aşamasında alınan örnekler) ve final ürünlerinde örnekleme yapılmıştır. Bu gıda maddeleri için risk potansiyeli en yüksek olan üç patojenin (*L.monocytogenes*, *C.sakazakii* ve *Salmonella spp.*) varlığı diğer yöntemlere göre daha hassas, verimli ve en önemlisi hızlı bir şekilde tespit eden Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Buna göre çikolata (kakaolu fındık ezmesi) ve sütlü-kremalı keklerin yapımında kullanılan 213 adet hammaddede, hammaddenin çeşidine ve risk potansiyeline göre katagorize edilerek, *Salmonella spp*, *L.monocytogenes* ve *C.sakazakii* analizleri yapılmıştır. Yarı ürün kontrollerinde toplam 62 adet fındık ezmesinde *Salmonella spp.* analizleri gerçekleştirilmiştir. Final ürünlerde ise 87 adet çikolata (kakaolu fındık ezmesi) numunesinde *Salmonella spp.* analizleri yapılırken, 35 adet sütlü-kremalı kek ve 39 adet çikolata kaplı sütlü-kremalı kek numunelerinde *Salmonella spp.* ve *L.monocytogenes* analizleri yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda yarı ürün ve final ürünlerde hiç patojen bakteri tespit edilmemiştir. Hammaddelerden ise sadece iki ayrı lotta ait pastörize yumurtada Real-Time PCR’da *Salmonella spp.* tespit edilmiştir. Pozitif numunelerde klasik kültürel metotla yapılan doğrulama sonucunda sadece bir lotta

ait yumurtada *Salmonella spp.* olduğu kanıtlanırken diğ er lotta ait ö rnekteki sonucun hatalı pozitif olduğu anlaşılmıştır. Real-Time PCR hızlı ve duyarlı bir sistem olup çok dışık yüzdede hatalı pozitif sonuç verebileceğ inden pozitif sonuç lar mutlaka klasik metotla doğ rulanmalıdır.

Sonuç olarak gıda gvenliğ i yüksek, kaliteli bir ürün üretmenin temel şartlarından birsinin dışık riskli hammadde temini olduğ unu ve insanlarda sağ lik problemi oluşturmayan güvenli bir gıda üretimi için üretimden tüketime kadar her basamakta alınması gereken tedbirler vurgulanmıştır.

Anahtar kelime: Real-Time PCR, ikolata, stl kremalı kek, *Salmonella spp.*, *L.monocytogenes*, *C.sakazakii*.

ABSTRACT

**DETERMINATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*,
CRONOBACTER (ENTEROBACTER) SAKAZAKII AND
SALMONELLA SPP. PATHOGENIC BACTERIA WHICH COULD
BE A POTENTIAL RISK IN STAGE OF PRODUCTION WITH
REAL-TIME PCR METHOD**

KESER AKGÜL, Büşra

Master of Science Thesis Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

August 2015, 98 pages

In this study, exemplification at raw material, semi manufactured and final products was made in the products (chocolate and milk-cream cakes) during six months between the dates 01.11.2013-30.04.2014 at a food production facility. Three pathogen (*L.monocytogenes*, *C.sakazakii* and *Salmonella* spp.) which have the highest potential risk for foodstuffs were determined by Real-Time PCR method that has more precise, efficient and most importantly quickly detection comparative to other methods.

Salmonella spp., *L.monocytogenes* and *C.sakazakii* analysis were performed by categorize with regard to raw material type and risk potential in 213 raw materials which were used in the making of chocolate (hazelnut spread with cocoa) and milk-cream cakes. *Salmonella* spp. analyses were carried out in semi manufactured controls at a total of 62 pieces of hazelnut spread. While *Salmonella* spp. analysis were performed in 87 pieces of chocolate (hazelnut spread with cocoa) samples, *Salmonella* spp. and *L.monocytogenes* analysis were carried out in 35 pieces of milk-cream cakes and 39 pieces of chocolate covered milk-cream cakes samples in the final products.

As a result of the studies, any pathogen bacteria were not detected in semi and final products. As to raw materials, *Salmonella* spp. were detected in only

pasteurized egg belonging to the two different lot numbers with Real-Time PCR. Whereas as a results of confirmation of positive sample with classical method *Salmonella* spp. was just existed in a egg belonging to one lot number, it was deduced that the positive sample belonging to the other lot numbers was false. Positive results should be confirmed with classical method absolutely due to the fact that Real-time PCR is a quick and precision system which can be led to false positive results at low percentage.

In conclusion, the importance of low risk raw material supply in order to produce quality products and precautions, which should be taken every stage from production to consumption, receive emphasis not to create health problems in humans for a safe food production.

Key words: Real-Time PCR, chocolate, milk-cream cakes, *Salmonella* spp., *L.monocytogenes*, *C.sakazakii*.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen başta sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Ateş' e, gerekli verilerin sağlanmasında kolaylık gösteren gıda fabrikası çalışanlarına, tezin biçimlenmesinde değerli katkılarını aldığım sevgili kardeşim Şeyma Akgül' e ve değerli arkadaşım Sennur Çalışkan' a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca manevi desteklerinden dolayı ailem ve Mehmet Keser' e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Gıda Patojenleri.....	4
2.1.1. <i>Salmonella</i> spp.....	5
2.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.1.3. <i>Cronobacter sakazakii</i>	27
2.2. Gıda Patojenlerinin Tespitinde Kullanılan Hızlı Yöntemler.....	33
2.2.1. Biyokimyasal tabanlı yöntemler.....	34
2.2.2. İmmunolojik tabanlı yöntemler.....	35
2.2.3. Nükleik asit tabanlı yöntemler.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.4. Elektriksel sinyal ölçümü tabanlı yöntemler.....	37
2.2.5. ATP ölçüm tabanlı yöntemler.....	37
2.3. Real-Time PCR.....	37
2.4. Çikolata ve Sütlü Kremalı Keklerde Patojen Bakteri Riski.....	45
2.4.1. Hammadde kaynaklı riskler ve tespiti.....	48
2.4.2. Üretim esnasında ve sonrasındaki riskler ve tespiti.....	54
3. MATERYAL VE METOD.....	55
3.1. Materyal.....	55
3.1.1. Çalışma materyali.....	55
3.1.2. Cihaz ve ekipmanlar.....	55
3.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	55
3.2. Yöntem.....	61
3.2.1. Real-Time PCR ile <i>Salmonella</i> spp. analizi.....	61
3.2.2. Real-Time PCR ile <i>Listeria monocytogenes</i> analizi.....	68
3.2.3. Real-Time PCR ile <i>Cronobacter sakazakii</i> analizi.....	72
4. BULGULAR.....	77

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

5.TARTIŞMA.....	79
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Salmonella</i> ’ ların gıdalara bulaşma zinciri.....	7
2.2. <i>Salmonella spp.</i> İzolasyon şeması (ISO 6579:2002).....	15
2.3. <i>Listeria</i> enfeksiyon döngüsü (Brackett, 1988).....	18
2.4. <i>L.monocytogenes</i> İzolasyon Şeması (ISO 11290-1/A1:2004:2004-10).....	26
2.5. <i>C.sakazakii</i> İzolasyon şeması (ISO 22964:2006).....	33
2.6. PCR tekniğinde sıcaklık akış döngüsü.....	41
2.7. PCR başmakları 1. Denatürasyon 2. Annealing 3. Extension.....	42
2.8. PCR’ da kullanılan prob ve primer çeşitleri.....	43
3.1. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agarda <i>Salmonella enteritidis</i> NCTC 5188, Brilliant Green Phenol Red Lactose (BPLS) agarda <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.....	66
3.2. APİ 20 E test kitindeki tipik <i>Salmonella enteritidis</i> reaksiyonları.....	67
3.3. Real-Time PCR’ da amplifikasyon eğrileri.....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>Salmonella</i> serotiplerinin biyokimyasal özellikleri.....	8
2.2. Kaufmann-White şemasına göre <i>Salmonella enterica</i> 'nın antijenik formülleri (Poppoff and Le Minor, 2001).....	9
2.3. Avrupa Birliği raporunda bildirilen çeşitli ülkelere ait listeriozis vakaları (EU Report 2001).....	17
2.4. <i>Listeria</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri (Ryser and Donnelly 2001).....	21
3.1. <i>Salmonella spp.</i> İçin numune ve 1:9 oranındaki BPW miktarları.....	62
3.2. <i>L.monocytogenes</i> için numune ve 1:9 oranındaki BPW miktarları.....	68
3.3. <i>C.sakazakii</i> için numune ve 1:9 oranındaki BPW miktarları.....	72
4.1. 01.11.2013-30.04.2014 / 6 ay 'lık patojen bakteri analiz sonuçları.....	78

1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı halk sağığı problemleri 21. yüzyılın önemli problemlerinden biridir. Hijyenik koşullarda üretilmeyen gıdaların yol açtığı enfeksiyon veya toksikasyonlara da sıklıkla rastlanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı epidemiyolojik verilere göre gıda kaynaklı hastalıkların sayısında sabit bir artışın olduğu belirtilmektedir. Bu durum gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde insanlar için hayatı tehdit edicidir ve önemli ekonomik sonuçlara neden olur. Bu yüzden güvenli gıda üretimi Avrupa Birliği başta olmak üzere dünyadaki gıda konusunda otorite kuruluşlarca gıda üretim ve tüketiminde olmazsa olmaz kriter olarak kabul edilmiştir (Erol, 2007; Erkmen 2010).

Günümüzde gıda zincirinde gıda güvenliği ve gıda hijyeni, gerek gıda üreticileri gerekse tüketiciler açısından büyük önem taşımaktadır (Çelik, 2008). Gıda güvenliği; gıda maddelerinin insanlarda sağlık sorunu oluşturmaması için üretimden tüketime kadar her basamakta alınması gereken tedbirler bütünü olarak ifade edilebilir. Gıda hijyeni ise tüketicide sağlık sorunlarına neden olabilecek her türlü tehlike ve risklerin kontrol altında tutulması ve gıdalar yoluyla tüketicide herhangi bir hastalık oluşmaması için gerekli koşulların sağlanmasıdır.

Gıdaların mikrobiyolojik kalitesi ve güvenilirliği, öncelikle gıdanın üretimi, dağıtımı, depolanması ve hazırlanması asamalarındaki kritik risk noktalarının tanımlanmasına ve sağlıklı üretim ve dağıtım koşullarının gerçekleşmesine bağlıdır. Bu koşulların sağlanması ve sürdürülebilmesi içinde gıda üretimi zincirinde ve gıda üreten işletmelerde, ISO kalite yönetim standartları ve 2006 yılında yayınlanan TS EN ISO 22000 standartları uygulanmaktadır. Bu uluslararası standartla denetlenebilir şartlar aracılığıyla, son ürünün güvenli bir şekilde hazırlanmasını sağlamak ve insan tüketimine güvenilir gıdalar sunulmasını sağlar (TSE, 2006). Uygulanan gıda güvenliği ve kalite sistemleri müşterilerin temizlik, hijyen ve kalite beklentilerini karşılamalıdır.

Bir gıda üretim tesisinde gıda güvenliğini yüksek oranda sağlamanın temel şartlarından birisi düşük riskli hammadde teminidir. Bu hammaddelerin tedarikçiden temininden sonra mutlaka test edildikten sonra kullanımına izin verilir. Bu uygulama hammaddede mevcut bir kontaminasyon varsa tespit edilerek, kullanılmaya başlanmadan geri iyadesini böylece üretimin kontamine olmasının önüne geçilmesine imkân sağlar. Yine üretim hattı boyunca alınan

örneklerin mikrobiyolojik durumu hızlıca değerlendirilebilmelidir. Böylece mevcut bir problemde hızlı önlem alınmasına imkân sağlanır. Son final halini almış ürünlerin de test sonuçlarının ulusal ve uluslararası standart kriterleri dâhilinde olması gerekir. Analiz sonuçlarının hızlı ve doğru bir şekilde elde edilmesi ürünün raf ömrü ve depolama alanı gibi koşullardan çok önemlidir. Bu yüzden gıda üretim tesislerinde hızlı metotlar tercih edilmektedir. Hızlı ve güvenilir bir cihaz olarak Real-Time PCR, gıda endüstrisinde en çok tercih edilenlerin başında gelir.

Real-Time PCR, spesifik bir DNA parçası kopyasının, primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntem olan PCR çeşitidir. Bu yöntem sayesinde çok az miktardaki patojen kontaminasyonu bile çabuk ve basit bir şekilde tespit edilebilmektedir. Geleneksel mikrobiyolojik metotlar ile patojen bakteri tespiti standart olarak kabul edilmesine rağmen yoğun emek ve zaman alıcıdır. "Polymerase chain reaction" (PCR) teşhis yöntemi olarak spesifite, hız ve sensivitesinin yüksek olması nedeniyle büyük bir avantaj sunmaktadır (Stone et al., 1994; Tuchili et al., 1995).

Gıdalar için gerekli olan mikrobiyolojik kriterler muhtemel bir sağlık tehlikesi oluşturanlar ile gıdalarda düşük kaliteye neden olan ve dayanma sürelerini azaltan fakat sağlık tehlikesi arz etmeyenler olmak üzere iki kategoride incelenebilir (Aldridge, 1978). Gıdalar için mikrobiyolojik spesifikasyonları saptayan uluslararası ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) komisyonu bir sınıflandırma cetveli düzenleyerek bunun içerisinde sağlık tehlikesinin derecelerini tespit etmiştir. Bu mikroorganizmalar gıda maddesinde doğal flora olarak kabul edilen saprofit mikroorganizmalar olabileceği gibi bunların dışında üretim, pazarlama ve benzeri faaliyetler sırasında özellikle fekal (dışkı) kökenli bakteriler ve bunlarla birlikte enfeksiyon etkeni ve besin zehirlenmesi etkeni mikroorganizmalarda gıdalara kontamine olurlar. Tehlikeli sınıfı oluşturan ve Dünya çapında gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerden *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* ve *C.sakazakii* diğerleri arasında en yaygın olanlarıdır (Todd, 1989).

Gıda kaynaklı hastalıklar, genel anlamda patojenik mikroorganizmalar ve mikrobiyal toksinler ile kontamine olmuş gıdaların yenmesi ile oluşan ve daha çok gastrointestinal semptomlarla seyreden klinik tablolar olup intoksikasyonlar,

infeksiyonlar ve toksik infeksiyonlar şeklinde gözlemlenir. Bu hastalıklar, grip gibi hafif geçebildiği gibi, ölümlü sonuçlanabilen ishallere, kusma, mide bulantısı, ateş, mide krampları şeklinde de görülebilmektedir. ABD hastalık kontrol merkezi verilerine göre; her yıl gıda kaynaklı olmak üzere, 76 milyon kişi hastalanmakta, 325.000 kişi hastaneye gitmekte ve yaklaşık 5.000 kişi ölmektedir (CDC, 2004; Ryan et al., 2003).

Çalışma materyalimiz oluşturan çikolata, yapısı gereği mikroorganizmaların gelişmesi yönünden oldukça kısıtlı bir ortam olmasına rağmen; hammadde ve bileşenlerin miktarlarına, kalitesine ve üretim teknolojisine bağlı olarak mikroflora gelişebilmektedir. Sıtlı-kremalı kekler ise mikroorganizmaların üreyebilmeleri için gerekli olan besin içeriğine sahip olmaları, uygun pH ve su değerleri ile daha büyük risk altındadırlar. Kek kısmı uygulanan ısı işlem ile büyük sorunlar oluşturmazken, krema kısmı risk grubunu teşkil etmektedir.

Bu çalışmada, bu gıdaların hammaddeden final ürüne kadar tüm üretim aşamalarında alınan örneklerde, mikrobiyolojik kaliteleri hakkında ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmaların sonuçları ile yerli ve yabancı standartlarda belirtilen değerlere göre öne çıkan üç patojen (*L.monocytogenes*, *C.sakazakii* ve *Salmonella* spp.) varlığı araştırılmıştır. Analizler diğer yöntemlere göre daha hassas, verimli ve en önemlisi hızlı bir şekilde tespit eden Real-Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile gıda güvenliği ve hijyenin sağlandığı kalite standartlarına uygun çalışılan bir üretim tesisinde mikrobiyal risklerin nasıl en aza indirgenebileceği ve kaliteli bir üretim yapılabileceği vurgulanmak istenmiştir. Böylelikle birçok kişinin özellikle de çocukların çok sık tükettikleri çikolata ve soğuk olarak muhafaza edilen sıtlı-kremalı keklerin, sağlık açısından risk potansiyelleri belirlenerek, bunların nasıl önlenebildiği vurgulanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Gıda Patojenleri

Gıdaların mikrobiyal florasını, gıdalarda doğal olarak bulunan mikroorganizmalar ile çevreden gıdaya bulaşmış olan mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Bunlar fermente gıdaların elde edilmesi amacıyla kullanılan ve “starter” olarak adlandırılan mikroorganizmalar gibi yararlı, gıda maddesinin bozulmasına neden olan saprofit mikroorganizmalar ya da gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyonlarına neden olan patojen mikroorganizmalar gibi zararlı olabilirler. Bunların dışında ne faydalı ne de zararlı olan (inert) mikroorganizmalar da mevcuttur (Ayhan, 2000; Tunail, 1986).

Hastalık etmeni olan patojen mikroorganizmaların gıdalar aracılığıyla vücuda alınması sonucu enfeksiyonlar meydana gelmektedir. Bu enfeksiyonlar, gıda sadece taşıyıcı işlevi görerek ve mikroorganizma gıda içerisinde çoğalmadan pasif olarak gerçekleşebileceği gibi patojen mikroorganizmanın gıda içerisinde çoğalması ve belirli bir sayıda hücrenin gıda ile birlikte alınması sonucu aktif olarak da gerçekleşebilmektedir (Tunail, 2000; Karapınar, 1998).

Gıda maddesinin patojen bir mikroorganizma ile kontamine olması ve bu mikroorganizmanın çoğalarak toksin salgılaması sonrası, bu gıda maddesinin tüketilmesiyle meydana gelen zehirlenmeye “Gıda Kaynaklı Zehirlenme” adı verilmektedir. Diğer bir ifade ile hastalık, gıda ile birlikte patojen mikroorganizmanın vücuda alınması sonucu değil, mikroorganizmanın salgıladığı toksinin alınması sonucu meydana gelmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklardan en yaygın görülenleri bakteri kökenli olup çabuk ortaya çıkmakta ve hızlı ilerlemektedir (Tunail, 2000; Karapınar, 1998).

Gıdalarda mikroorganizma gelişmesi öncelikle gıdanın bileşimine bağlıdır. Gıdanın besin içeriği, pH, su aktivitesi, şeker ve tuz konsantrasyonları, viskozitesi gibi pek çok etmen önemli olduğu gibi gıdanın oksidasyon - redüksiyon potansiyeli ya da bulunduğu atmosfer ortamı, depolanma sıcaklığı, gıdada bulunan antimikrobiyel bileşikler gibi çeşitli iç ve dış faktörler gıdalarda mikroorganizmaların gelişmesi üzerine etkili olmaktadır. Bu yüzden her gıda grubu için potansiyel patojen bakteri riski ve çeşidi değişmektedir.

- Et ve et ürünlerinde- *Salmonella* spp., *L.monocytogenes*, *E.coli* O157:H7, *C.perfringens*
- Süt ve süt ürünlerinde- *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* suşları
- Yumurta ve yumurta ürünlerinde- *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*
- Hububat ve fırıncılık ürünleri- *Salmonella* spp., *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *C.perfringens*
- Meyve ve sebzeler ile işlenmiş ürünler- *Salmonella* spp., *L.monocytogenes*, *E.coli* O157:H7, *S.aureus*, *B.cereus*
- Kakao ve kakao ürünleri, çikolata ve çikolata ürünleri- *Salmonella* spp.
- Şekerli ürünler- *Salmonella* spp., *E.coli*.

(Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Yayımlandığı R.Gazete: 06.02.2009-27133, Tebliğ No: 2009/6)

Çikolata ve sütlü kremalı keklerin hammadde ya da final ürün halleri için en çok risk teşkil eden patojenler, FDA (U.S.Food and Drug Administration), ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) gibi kuruluş tarafından hazırlanan standartlara göre *Salmonella* spp., *L.monocytogenes* ve *C.sakazakii* olarak öne çıkmaktadır.

2.1.1. *Salmonella* spp.

2.1.1.1. Tarihçesi ve genel özellikleri

Salmonella ilk kez tifoid basili olarak 1880 yılında Alman bakteriyologlar Ebert ve Koch tarafından tanımlanmış ve 1884 yılında Gaffky *Salmonella*' yı kültüre etmeyi başarmıştır (Bell and Kyriakides, 2002).

1885 yılında *Salmonella enterica* (kolera) Amerikalı veteriner patolog olan Dr. Salmon tarafından keşfedilmiş ve domuz bağırsağından izole edilmiştir. Paratifoid basili 1896 yılında Achard ve Bensaud, 1898 yılında ise Gwyn tarafından izole edilmiştir (Adams and Moss, 1995). *Salmonella* çeşitli çevrelerden gıdalara bulaşabilmekte ve salgınlara neden olabilmektedir (Bkz. Şekil 2.1).

Fransa'da 1995 ve 1999 yılları arasında yılda 32 000 ve 43.000 arasında salmonelloz vakasının 6.000 ile 10.700 arasında hastane tedavisine (100-560 ölüm dâhil) sebep olduğu tahmin edilmektedir. 2001 ve 2006 yılları arasında *S. enterica*

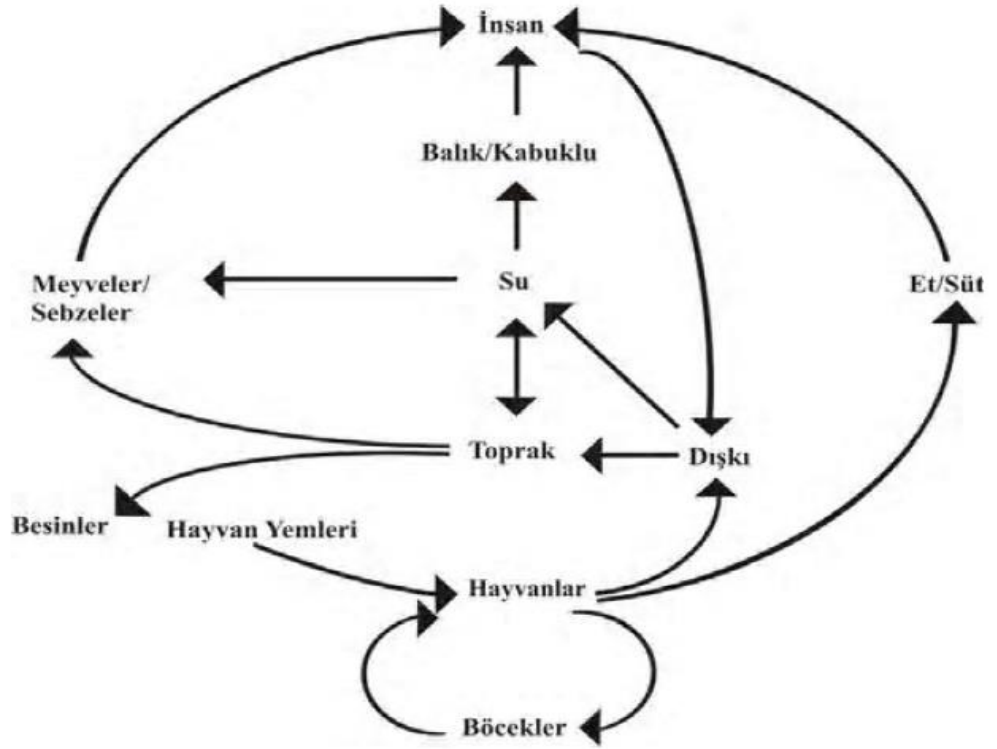
serotipin Typhi 109-127 suşları, serotip Paratyphi A 24-52 suşları CNR her yıl tespit edilmiştir (Weill, 2007).

2000 yılında, dünya çapında tifo 20 milyondan fazla hastalığa 200.000 üzerinde ölüme neden olurken, paratifo tahmini 5,4 milyon hastalığa neden oldu (Güneş, 2012).

Çinde, 2001-2010 döneminde gıda kaynaklı salgın hastalıklarda 140.101 bildirilen vakadan 1.427 ölüm vakası Ulusal Gıda Kaynaklı Hastalıkları Gözetim Ağı Tarafından rapor edilmiştir (Li et al., 2012).

ABD’ deki Center for Diseases Control’ ün (CDC-Hastalık Kontrol Merkezi) verilerinde 2006 yılı raporlarına göre sadece ABD’ de yıllık tahmini 1.4 milyon *Salmonella* olgusu rapor edildiği ve olguların 500’ ünden fazlasının hastalarda ölümle sonuçlandığı belirtilmektedir. Yine ABD’ de Center for Science in the Public Interest’ in (CSPI) 1990-2003 yılı verilerinde ABD’ de bakterilerin neden olduğu 554 salgının 111’ inde sorumlu etkenin *Salmonella* olduğunu bildirmişlerdir (İzgür, 2002).

Türkiye’de önemli halk sağlığı sorunlarından birini oluşturan *Salmonella*’nın en çok enterica subsp. enterica serotipi olduğu bilinmekle birlikte *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi* ve *Salmonella typhi* yaygın biçimde tespit edilmektedir (Üner, 2013).



Şekil 2.1. Salmonella'ların gıdalara bulaşma zinciri (Üner, 2013)

2.1.1.2. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyası üyesi olup fakültatif aerobik, gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, 2-5 µm boyunda çubuk şeklinde, *S.gallinarum* ve *S.pullorum* hariç olmak üzere hareketli bir bakteridir (Levinson et al, 2004). Gram negatif olmalarına rağmen metilen mavisi ve karbon fuksin boya ları gibi boya larla boyanabilirler (Gast, 2003).

Çevre koşullarında uzun süre canlı kalabilirler. Optimum üreme sıcaklığı 35-37 °C, üreme sıcaklık aralığı ise 25-47 °C arasında olan mezofilik bakterilerdir. Gelişebildiği minimum su aktivitesi 0.94, optimum su aktivitesi 0.99'dur. Minimum 3.8, optimum 7-7.5, maksimum 9.5 pH' da gelişebilir (Cui, 2004).

Oksidaz negatif, katalaz pozitifler, dekarboksilat, lisin ve ornitin üretirler (Cui, 2006)(Bkz. Çizelge 2.1). Laktoz veya sü krozu fermente etmezler. *S. typhi* ve *S.gallinarum* gaz üretmeden yalnız asit oluşturarak fermente ederler. Sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanırlar, H₂S üretirler (*S.paratyphi* A hariç). İndol negatif, metil red pozitif, voges proskauer negatif, sitrat pozitif reaksiyon

verirler. Üreyi parçalayamazlar (Bilgehan, 2002; Cui, 2004; Levinson et al., 2004).

Çizelge 2.1 Salmonella serotiplerinin biyokimyasal özellikleri

Reaksiyon	Genel	Typhi	Paratyphi A	Choleresuis	Gallinarum	Pullorum
Gaz oluşturma	+	-	+	+	-	+
Sitrat	+	-	-	+	+	-
H ₂ S	+	+	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	+	+	-	+	+	+
Ornitin dekarboksilaz	+	-	+	+	-	+
Hareket	+	+	+	+	-	-

* Zayıf pozitif reaksiyon

** TSI agarda zayıf pozitif reaksiyon

*** Bazı suşlar pozitif olabilir

Diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri gibi *Salmonella*’ lar da somatik O antijenlerine ve flajellar (kuyruk) H antijenlerine sahiptirler. O antijenleri hücre duvarının ısıya dayanıklı (ısıyla değişmeyen) lipopolisakkarid bileşkeleleriyle, H antijenleri faz 1 veya 2’de görülebilen ısıya dayanıksız (ısıyla değişen) proteinlerdir. *Salmonella* serotiplerini sınıflandırmada kullanılan kauffmann-white şeması O ve H antijenleri temelinde oluşturulmuştur (Bkz. Çizelge 2.2). *Salmonella*’ ların identifikasyonunda, antijenik özelliklerin dikkate alınması son derece önemlidir. Bu nedenle öncelikle “O” grubu antiserumların karışımı kabul edilen *Salmonella* polivalan antiserumu ile yapılan aglütinasyon testinde pozitif sonuç elde edilir ise, incelenen etkenin *Salmonella* spp. olduğu kabul edilip, daha sonra “O” spesifik grup antiserumları (A, B, C, D,..) ile tekrar aglütinasyona tabi tutulur. Hareketli *Salmonella*’ ların, bu testlere ilaveten Faz-1 ve Faz-2’ ye ait

antisserumlar da kullanılarak izole edilen etken serotip düzeyinde identifiye edilir (İzgür, 2002).

Çizelge 2.2. Kaufmann-White şemasına göre *Salmonella enterica*'nın antijenik formülleri (Poppoff and Le Minor, 2001).

Serotype	O-antigen(s)	H1-antigen(s)	H2-antigen(s)
S. Enteritidis	1, 9, 12	[f], g, m, [p]	[1, 7]
S. Dublin	1, 9, 12, [Vi]	g, p	-
S. Gallinarum	1, 9, 12	-	-
S. Typhimurium	1, 4, 5, 12	i	1, 2
S. Virchow	6, 7	r	1, 2
S. Infantis	6, 7, 14	r	1, 5

Serotiplerin tanımlanabilmesi, belirli serotiplerin spesifik klinik sendromlar oluşturmaya eğilimli olması ve olağandışı bir serotipin tespit edilmesiyle bir salgın başlangıcının fark edilmesi açısından önemlidir. *S.typhi*'de bulunan virülansı mevcut kapsüler bir polisakkarid (vi), *S.dublin* ve *S.paratyphi* (*S. hirschfeldii*)'de de mevcuttur (Le Minor, 1984).

2.1.1.3. Patojenitesi

Gıda zincirinde meydana gelen *Salmonella* kontaminasyonu, önemli tıbbi maliyetlere ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Majowicz et al., 2010). ABD' de yılda 1,4 milyon kadar vakaya sebep olduğu ve ekonomide 2 milyar dolardan fazla kayıplara sebep olduğu bilinmektedir. Kanada' da ise 1 milyar dolar olduğu bildirilmektedir. 1991 yılında Almanya' da salmonellozisin 1,5 milyar marklık bir kayba neden olduğu bildirilmektedir (Erol, 2007). 1992 yılında yaklaşık 200.000 vaka varken, 2013 yılında sayı 20.000 altına düşmüştür (Robert Koch-Institut, 2014).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılında yayınladığı rapora göre her yıl yaklaşık 200.000 kişi *Salmonella* kaynaklı ateşli hastalıktan dolayı hayatını kaybetmektedir (Malorny et al., 2009). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre bu enfeksiyonların yaklaşık 22 milyonunu tifo ateşi oluşturmaktadır ve yılda yaklaşık 200.000 insan bu enfeksiyonlar sonucu yaşamını yitirmektedir (Crump et al., 2004).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) vermiş olduğu istatistiklere göre 2000-2005 yılları arasındaki görülen insan kaynaklı en yaygın serotipin *S. enteritidis* (61%) ve insan kaynaklı olmayan serotipin *S. typhimurium* (23%) olduğu rapor edilmiştir (WHO, 2005).

Türkiye' nin birçok bölgesinde *Salmonella* enfeksiyonları endemik hatta hiperendemik olarak seyretmektedir (Bilgehan, 1992). Türkiye'de 2000-2002 yılları arasında en yaygın serotipler *S. enteritidis* (47,7%) and *S. typhimurium* (34,7%) olarak tespit edilmiştir (Erdem vd., 2005).

Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları ve gastroenteritiserin yurtdışında halen daha büyük bir dikkatle takip edildiği, değerlendirildiği ve rapor edildiği görülmektedir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İngiltere, Belçika, Fransa ve Kanada'da yapılan çalışmalar, gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları ve gastroenteritis vakalarının son yıllarda artış gösterdiğini ortaya koymaktadır (Archer and Kvenberg, 1985; Roberts, 2000).

Salmonella cinsi içinde yalnız insanlarda, yalnız hayvanlarda ve hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık yapan 2500' ün üzerinde serotipi bulunmaktadır. Bunlar; *S.typhi*, *S.cholerasuis* ve *S.enteridis*. Hastalık oluşturanlar dışında konakçı spesifik olmayan ve gıda kaynaklı enfeksiyonlarda rol oynayan serotipler büyük önem taşımaktadır. Primer olarak hayvanlar tarafından bulaştırılmasının yanında *Salmonella* enfeksiyonlarında çapraz kontaminasyon en yaygın bulaşma yoludur (Erol, 2010). *Salmonella* enfeksiyonlarının insanlara bulaşmasında, kontamine yumurta, süt ve et gibi hayvansal kaynaklı gıdalar önemli rol oynamaktadırlar (Koneman et al., 1992). Kontamine olmuş gıdalar ve kirli sular, zayıf sağlık önlemleri ve kötü hijyen koşulları *Salmonella* riskini arttırmaktadır. Gıda zehirlenmesi salgınlarının sayısındaki son artışın, kirlenmiş yumurta veya yumurta ürünlerinin bu enfeksiyonun başlıca kaynağı olduğu yapılan epidemiyolojik analizler sonucunda kabul edildi (Suzuki, 2002). Bu

patojen, kontamine olmuş gıdalarda çok düşük sayıda olsa bile önemli sağlık problemlerine yol açmaktadır (Bennett et al., 1998).

Salmonella türleri bağırsaktan yayılarak, sistemik bir dizi organda ciddi, bazen ölümcül enfeksiyonlara üretebilir. İnsanda hastalığa neden olan izolatlar Subspecies I' e aittir. Örneğin *Salmonella enterica*' nın yılda 93 milyon üzerinde enfeksiyona neden olduğu tahmin edilmektedir (Fluit, 2005).

İnsanlarda salmonellosis dört şekilde gözlenir. Bunlar, herhangi bir hastalık belirtisi görülmeyen taşıyıcı salmonellosis (asemptomatik), *Salmonella typhi*' nin sebep olduğu tifo (bağırsak humması), *S. typhi* dışında olan *Salmonella* serotiplerinin neden olduğu *Salmonella* gastroenteritsi veya enterocolitisi şeklidir. Hızla ortaya çıkıp hızla iyileşen gastrointestinal problemlere yol açar. İnsanlarda tifo ve paratifoya sebep olur. Bu enfeksiyonlar genellikle hayvanlara gerek kalmadan kişiden kişiye bulaşır. Tifo, *S.typhi* ile oluşan, yalnız insanlara özgü, akut ve sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. *S.typhi*' nin doğada tek ve gerçek rezervuarı insandır (Cui, 2004). Gelişmekte olan ülkelerde, yapılan kapsamlı bilimsel araştırmalara ve dünya çapında alınan güvenlik önlemlerine rağmen önemli bir halk sağlığı sorunu olan tifo, 17 milyon enfeksiyon ve her yıl 600.000 ölüme sebep olmaktadır. *S.gallinarum* (tavukta), *S.choleraesuis* (domuzda), *S.abortusovis* (koyunda) ve *S.dublin* (sığırdı) gibi hayvanlarda konak adaptasyonuna sahip serotiplerdir. Tüm bu sınıflandırmalara rağmen tüm hayvansal kökenli serotipler insanlar için potansiyel patojen olarak kabul edilir (Giannella, 1996).

Salmonella' ların virulans genleri sıklıkla kromozom üzerindeki *Salmonella* patojenite adaları (SPA) denilen bazı bölgelerde kümelenmiş şekilde lokalize olmuşlardır (Groisman and Ochman, 1996). *Salmonella* enfeksiyonunun intestinal kısmında görevli virulens genleri SPA-I ve SPA-II' de yer almaktadır. Diğer SPA' larda ise sistemik enfeksiyon, intrasellüler yaşam, fimbria oluşumu, antibiyotik dirençlilik, magnezyum ve demir tutulumu ile ilgili fonksiyonlar düzenlenmektedir (Groisman and Ochman, 1996; Buhania, 2008).

Salmonella' nın en önemli kaynağı, yemler, kontamine yem katkı maddeleri, kontamine sular, mezbaha atıkları, infekte yabani hayvanlar, kuşlar, fareler, rodentler ve insektlerdir (Adams and Moss, 1995). Kontamine olmuş ürün vücuda alındıktan sonra mide ortamına geçebilenler gastrointestinal sistemde kolonize olur. Bu bölgede bakteri çoğalabilir ve lokal hastalık meydana getirebilir

veya makrofajlar tarafından yok edilebilir ya da bölgesel lenf nodülleri, karaciğer ve dalak gibi daha derin dokulara yerleşerek sistemik enfeksiyonlara neden olabilir (Selander et al., 1996).

2.1.1.4. Salmonella izolasyonu

Kontamine olmuş gıdalarda patojenlerin miktarı genelde klinik örneklerden daha az sayıda olması, mikroorganizma gıdaya uygulanan teknoloji ya da muhafa yöntemi gereği (pH, ısı işlem, dondurma, antimikrobiyal ajanlar, tuz konsantrasyonu gibi) hasara uğrayabilmektedir. Bunun yanı sıra bazı gıdaların (yumurta albümini, kakao, baharat gibi) *Salmonella* belirlenmesini güçleştiren özelliklere sahiptir. Bu yüzden gıdalar da *Salmonella*' yı belirlemek oldukça güçtür (Swaminathan, 2006).

Gıdalardan *Salmonella*' ların belirlenmesi için ISO (The International Organization for Standardization), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), APHA (American Public Health Association), FDA (U.S. Food and Drug Administration), HPB (Health Protection Branch-Canada), ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), NAS (National Academy of Sciences), USDA (U.S. Department of Agriculture) gibi çeşitli kuruluşlar tarafından hazırlanan standartlar bildirilmektedir. Bu amaçla kullanılan çeşitli zenginleştirme sıvı ve katı besi yerleri bulunmaktadır (Tietjen and Fung, 1995).

ISO 6579 standardı gıda ve hayvan dışkılarından *Salmonella* izolasyonu için geçerlidir. Çok farklı kültür metotları önerilmesine rağmen, çoğu standart metota göre *Salmonella*' ların gıdalardan izolasyonu ve tanımlanmasında yararlanılan klasik kültürel yöntemleri temelde dört basamakta (Bkz. Şekil 2.2) gerçekleştirilmektedir;

1. Ön zenginleştirme aşaması
2. Selektif zenginleştirme aşaması
3. İzolasyon aşaması (selektif besiyerine ekim)
4. Doğrulama aşaması (Serolojik ve biyokimyasal testler)

1. Ön zenginleştirme aşaması

Zarar görmüş *Salmonella* hücrelerinin kendilerini yenilemesini ve sayıca az ise üreyerek sayılarının artırması için kullanılır.

Genel olarak ön zenginleştirme besiyeri olarak tamponlanmış peptonlu su (TPS) ve lactose broth (LB) önerilmektedir (Gast, 2003). Ancak çikolata gibi doğal inhibitör etkili gıdalarda hasara uğramış *Salmonella*' ların izolasyonunda ön zenginleştirme besiyerinin içine kazein eklenmesi önerilmektedir. Gram-pozitif bakteri sayısının fazla olduğu örneklerde ise ön zenginleştirme besiyerinin içine % 0,002 brilliant green veya % 0,01 malaşit yeşili eklenmesinin yararlı olacağı bildirilmektedir (Anonymous, 1998).

USDA ve FDA, ön zenginleştirme amacıyla Laktoz Broth, Triptik Soy Broth, Nutrient Broth, yağsız süt veya tamponlanmış peptonlu su gibi seçici olmayan brotlarda 6-24 saat süreli ön zenginleştirme aşamasını tavsiye etmektedir (Beckers et al., 1986). Ön zenginleştirmede *Salmonella* sayısının en az 10^5 /mL olması gerekir (De Boer, 1998).

2. Selektif zenginleştirme aşaması

Salmonella popülasyonunun artmasını sağlarken rekabetçi mikroorganizmaları baskılanmasını sağlar.

Son yıllarda en çok kullanılan besiyerleri Mueller-Kauffmann's Tetrathionate broth (MKTn), Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth (RVS) ve Selenit Sistein Broth' dur ve 24 saat süreli selektif zenginleştirme yapılır (Gast, 2003; Beckers et al., 1986).

3. İzolasyon aşaması (selektif besiyerine ekim)

Seçici agarla her biri tek bir bakteri hücresinden köken alan izole kolonileri elde edilir (Gast, 2003).

En çok kullanılan seçici besiyerleri, Hektoen Enteric Agar (HEA), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) ve/veya Brilliant Green Agar (BGA), Brilliant Green Fenol Red Laktoz Sukroz Agar (BPLS), Rambach Agar, *Salmonella Shigella* Agar (SS Agar), Bizmut Sülfid Agar (BSA) 'dır ve 24 saat süreli izolasyonla olası

Salmonella kolonilerinin tanımlanmasına olanak sağlar (Beckers et al., 1986). Klasik yöntemlerde tek bir selektif katı besiyeri kullanımının gıdada bulunabilecek *Salmonella*'nın belirlenmesi için yeterli olamayacağı dikkate alınarak bu aşama için birden fazla besiyerinin kullanımı önerilmektedir (Peng and Shelef, 1999).

4. Doğrulama aşaması (serolojik ve biyokimyasal testler)

Tipik *Salmonella* kolonisi görünüşüne sahip olan kolonilerin serotip ve genus identifikasyonu için serolojik ve biyokimyasal testler yapılır (Gast, 2003).

Şüpheli koloniler Triple Sugar Iron Agar ve Lysine Iron Agar' da 37°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra tipik *Salmonella* kolonilerini tanımlamak için biyokimyasal ve diğer testler yapılır (Quinn et al., 2004; Shivaprasad, 2003).

Saf kültürden Gram boyama, hareket muayenesi (Bilgehan, 2004; İzgür, 2002) ve bazı biyokimyasal testler yapılır: Bunlar, dekstroza, laktoza, sukroza, mannitol, maltoza, dulcitol, malonat, gelatin, üre, sitrat, ornithine dekarboksilaz, Metil-Red ve Voges-Proskauer, KCN, O-nitrophenyl-beta-D-galaktopyranside (ONPG), indol, hidrojen sulfid testleridir (Anonim, 1998).

Biyokimyasal özelliklerine göre *Salmonella* olduğu anlaşılan suşlara, bütün alt grupların antikorlarını bulunduran polivalan antiserum kullanılarak *Salmonella* olduğu doğrulanır. Önce polivalan O antiserumu ile lam aglütinasyon testi yapılır. Daha sonra hangi polivalan O antiserumu ile aglütinasyon görüldüyse o polivalan serumun içerdiği grup antiserumu ile lam üzerinde aglütinasyon yapılarak suşun serogrubu tayin edilir. Serolojik grubu tespit edilen suşun H antiserumu ile aglütinasyonu sonucu da serotipi saptanır (Koneman et al., 2006).

Ön zenginleştirme

25 ml örnek + 225 ml BPW - $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ / $18\pm 2\text{h}$



Selektif

zenginleştirme

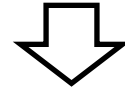
0,1 ml kültür + 10 ml RVS - 41.5°C / $24\pm 3\text{h}$

1 ml kültür + 10 ml MKTTn - $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ / $24\pm 3\text{h}$



İzolasyon

XLD ve BSA' da $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ / $24\pm 3\text{h}$ İnkübasyon



Doğrulama

Serolojik ve biyokimyasal testler

Şekil 2.2. *Salmonella* spp. İzolasyon şeması (ISO 6579:2002)

2.1.2. *Listeria monocytogenes*

2.1.2.1. Tarihçesi ve genel özellikleri

Listeria türleri ilk kez 1891 yılında Almanya’ da izole edilmesi ile bildirilmiştir. İsveç’ te, 1911 yılında bir tavşanın karaciğerinden, 1917 ve 1920 yıllarında da hastaların omurilik sıvılarından *Listeria monocytogenes* izole edilmiştir. 1926 yılında laboratuvar rodentlerinde çıkan bir salgından izole etikleri bakteriye mononükleer lökositoya neden olması sebebiyle *Bacterium monocytogenes* ismini vermişlerdir. 1927 yılında Pirie Güney Afrika’ da gerbilller üzerinde yaptığı çalışmalarda yeni bir bakteri izole etmiş ve bu yeni bakteriye Lord Lister anısına *Listerella hepatolytica* adını vermiştir. Murray ve Pirie aynı türden bakteri ile ilgilendiklerini fark ederek isimleri birletirmişler ve *Listerella monocytogenes* ismini oluşturmışlardır. Daha sonra yapılan taksonomik çalışmalarla 1940 yılında bakterinin ismi *L.monocytogenes* olarak değişmiştir (Ryser, 2007).

İlk insan listeriosis vakası 1936 yılında bildirilmiştir. Bu zamana kadar, listeriaların yalnızca hayvanlarda hastalık yapabildiği görüşü bilim dünyasında hâkimdir (Buchanan, 2004).

Gıda kaynaklı ilk listeriozis vakası ise 1953 yılında, *L. monocytogenes*’in sebep olduğu, mastitisli bir ineğin sütünü içen hamile bir kadının bebeklerinin ölmesiyle ile tanımlanmıştır (Anonim, 2000).

ABD’ de 1998- 2002 boyunca gıda kaynaklı hastalıkların neden olduğu ölümlerin yaklaşık % 43’üne *L. monocytogenes*’in sebep olduğu rapor edilmiştir. 2002 yılında Amerikada temmuz-kasım ayları arasında birçok eyalette görülen listeria salgınının 8 tanesi ölümle sonuçlanmıştır. 2004 yılında ABD’ de toplam 753 vaka bildirilirken bu rakam 2005 yılında 842’ ye yükselmiştir (Anonymous, 2005a).

1966 yılında Almanya’ da ve 1975-76 yılları arasında Fransa’ da sırasıyla 279 ve 166 insan listeriozis vakası gözlenmiştir (Fleming et al., 1985). Avrupada 1996–2002 yılları arasında Avrupa Birliği tarafından çeşitli ülkelere ait listeriozis vakaları rapor edilmiştir. Avrupa Birliği ülkelerinde 2003 yılı verilerine göre yıllık listeria insidensi 1 milyon vakada % 0.3-7.5, Avustralya’ da % 3’ tür (Hitckins, 2011)(Bkz. Çizelge 2.3).

1983 yılında Massachusetts'de pastörize süt tüketimi ile meydana gelen epidemide 14 kişi, 1985 yılında California' da görülen bir başka listeriozis vakasında ise Meksika tipi peynir tüketilmesi sonucu 48 kişi hayatını kaybetmiştir.

Çizelge 2.3. Avrupa Birliği raporunda bildirilen çeşitli ülkelere ait listeriozis vakaları (Şahiner, 2011).

	Yıllar					
Ülkeler	1996	1997	1998	1999	2000	2002
Almanya	32	27	41	31	33	213
Belçika	77	40	60	64	48	57
Danimarka	39	33	41	44	39	38
Finlandiya	29	53	46	46	18	28
Fransa	-	243	238	275	261	187
Hollanda	22	22	23	12	19	16
İngiltere	116	118	91	108	100	136
İrlanda	-	7	4	-	7	7
İtalya	32	64	45	17	13	31
İskoçya	11	6	13	7	11	15
İspanya	21	19	16	32	35	57
İsveç	28	18	32	27	46	67
Yunanistan	-	-	1	1	2	3

Türkiye’ de ilk listeriosis vakası Özcebe tarafından 1945’ te koyun beyrinde yaptığı çalışmayla bildirilmiştir. 1952 yılında Pendik Bakteriyoloji Enstitüsünde listeriosis hastalığı teşhis edilmiştir. Ancak 1961 yılında Türkiye’de FAO’ nun düzenlediği -Emerging Diseases-isimli kongre raporunda, önemli bir hastalık olmadığı bildirilmesi üzerine 1980’ lere kadar Dünya ile paralel şekilde üzerinde durulan bir hastalık olmamıştır (Doğuer, 1961).

1980’ lerden bu yana görülen seri salgınlar, *L. monocytogenes*’ in son derece tehlikeli, genellikle insan hayatını tehdit eden gıda kaynaklı hastalıklara neden olduğunu göstermiş ve bu özellikleri ile kamu sağlık kuruluşlarında ve gıda endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olduğu anlaşılmıştır (Liu, 2008).

Bir diğerkontaminasyon kaynağı ise sanitasyon uygulamalarının yetersiz olduğu gıda maddeleri üretim, taşıma ve tüketim prosesleridir. (Akkaya, 2006). Bu tür gıda işletmeleri birçok mikroorganizma için potansiyel biyofilm geliştirme merkezleridir. Özellikle taze ve işlenmiş, bitkisel, et ürünleri, tavuk, balık, süt ve süt ürünleri gibi hayvansal orijinli gıdaları işleyen işletmelerde rastlanmaktadır. *L. monocytogenes* özellikle, temizlenmesi zor olan grintilere sahip (çatlaklar, yıpranmış malzeme) ve / veya yanlış temizlenmiş süt ekipmanlarında tespit edilmiştir (Sheldon, 1995).

Gıda işleme tesislerinde *Listeria monocytogenes*' in girişı; topraktan çalışanların ayakkabıları vasıtasıyla, taşıma araçlarıyla, enfekte hayvanlarla, hayvan kaynaklı çiğ gıdalarla ve sağlıklı fakat etkeni taşıyan insanlarla olabilmektedir. Gıda işleme tesislerinde *Listeria monocytogenes*' in genellikle rutubetli yüzeylerden, kirli ve durgun sulardan, gıda kalıntılarından, alet ve ekipmanlardan izole edildiğı bildirilmiştir (Swaminathan et al., 1994).

Araştırmalar *Listeria* enfeksiyonlarının, özellikle *L.monocytogenes* ile bulaşmanın, gıdaların üretim aşamaları ile çiftçi ve hayvanlardan kaynaklandığını göstermektedir. Gıdalar *Listeria*' lar ile doğrudan kontamine olabildiğı gibi enfekte materyal veya kişiler tarafından gıdaların işlenmesi, muhafazası, paketlenmesi, satışı ve tüketimine kadar geçen süre içerisinde de kontamine olabilmektedirler (Sheldon, 1995).

2.1.2.2. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

L.monocytogenes, *Listeriaceae* familyasına ait olup, gram pozitif, aerobik, fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik olarak üreyebilen, 0,5 µm eninde ve 1-2 µm boyunda çubuk şeklinde, peritrik flagellaları ile 20-25°C' de hareketli, 35-37°C' de hareketsiz, kapsülsüz ve sporsuz patojen bakterilerdir (Jalali et al., 2008).

Olumsuz çevre koşullarına karşı geniş direnç aralığına sahiptirler. Optimum üreme sıcaklığı 30-37°C, üreme sıcaklık aralığı ise 0-45°C' dir. Optimum pH aralığı 6,0-8,0 olup 4.3-9.6 pH aralığında da üreyebilirler. Düşük su aktivitesinde (0.92) ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (%10) yaşayabilirler (Erol, 2007).

Hücre duvarı ve flagella oluşumuna temel teşkil edecek moleküllerin yanı sıra, *Listeria* ' ların canlı kalma yeteneğini ve stres ortamında pH, sıcaklık ve tuz

konsantrasyonu gibi faktörlere karşı dirençliliğini sağlayan, özel, amaca yönelik proteinler, (örneğin; BetL, Bsh, Lmol421, OpuB ve OpuC) sentezlediği bilinmektedir (Liu, 2008).

Listeria türleri, oksidaz negatif, katalaz pozitif, Voges-Proskauer ve Metil Red pozitif olup, indol ve H₂S oluşturmazlar. Sodyum hippuratu ve eskülini hidrolize ederler. Oksijenli ortamda hareketli olduklarından Sulphate Indol Motility (SIM) mediumda şemsiye tarzında üreme gösterirler. *L.monocytogenes* ramnozu fermente ederek asit oluştururken, ksiloz ve mannitolü fermente edemez (Swaminathan et al., 1994). Eskülin ve sodyum hippuratu hidrolize ederler (Arda, 1997). Üre, jelatin, kazein ve sütü hidrolize etmezler (Bkz. Çizelge 2.4). *L. monocytogenes* suşları penisilin veya glisin içeren ortamlarda üretilirse L-formları meydana gelmektedir (Swaminathan et al., 1994). *Listeria*' ların üremeleri için besiyerinde 6 aminoasite (arginin, histidin, lösin, izolösin, sistein, valindir) ve 4 vitamine (biotin, tiamine, riboflavin ve tioktik asit) gereksinimleri vardır (Glaser, 2001).

Listeria' ların somatik (O-faktör) ve flagella (H-faktör) antijenlerinin spesifik antiserumlarla verdiği serolojik reaksiyonlara göre *Listeria* türleri 4 serotiplere ayrılmıştır (Liu, 2008). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e,5,7,6a, 6b gibi değişik serotipler tespit edilmiştir. Bunlar arasında da insanlarda en sık hastalık oluşturan serotipler 1/2a, 1/2b ve 4b' dir (Graves et al., 2001).

Çizelge 2.4. *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri (Donnelly, 2001)

Biyokimyasal Testler Listeria Türleri	B-hemoliz	Takla Hareketi	CAMP	CAMP (R.Equi)	Şemsiye Hareketi	Katalaz	Oksidaz	Üre	TSI	Glucose	Eskülin	MR-VP	NO ₂	Mannitol	Ksiloz	Ramnoz
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	a/a	+/-	+	+/+	-	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	a/a	+/-	+	+/+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	a/a	+/-	+	+/+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	a/a	+/-	+	+/+	-	-	-	+/-
<i>L. grayi</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	a/a	+/-	+	+/+	-	+	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	a/a	+/-	+	+/+	-	+	-	+/-

a/a: Asidik reaksiyon (Tüp dibi).

2.1.2.3 Patojenitesi

1980 yıllardan itibaren özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde *L.monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların tüketimi sonucu büyük epidemiler meydana gelmiş ve bunların %30' u ölümle sonuçlanmıştır. Kontamine olmuş gıdalar arasında; lahana salatası, startersiz üretilen taze peynirler, yumuşak peynirler, kanatlı etleri, tüketime hazır yiyecekler, ısıtılmış jambon, çeşitli sosis ve salamlar, vakum paketli jele içinde domuz dili sayılabilir (Tunail, 2000).

L.monocytogenes enfeksiyonları ile ABD' de her yıl yaklaşık 2500 kişi hastalanmakta ve ortalama 500 kişinin ölümüne neden olmaktadır (Mead et al., 1999). 2004 yılında ABD' de toplam 753 vaka bildirilirken bu rakam 2005 yılında 842' ye yükselmiştir (CDC, 2012).

Listeria cinsi 6 tür içermekte, bunlar; *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.ivanovii*, *L.welshimeri* ve *L.grayi*' dir. Bunlar içinde sadece *Listeria monocytogenes* insanlara patojendir. İstisna olarak *L.ivanovii*, *L.seeligeri* ve *L.welshimeri*' ri kayanıklı hastalıklar da tespit edilmiştir. *Listeria* türleri içerisinde yalnızca *L.monocytogenes*, *L.seeligeri* ve *L.ivanovii* kırmızı kan hücrelerini (eritrositleri) parçalayan bir hemolizin üretirler (Doğan, 2002).

L.monocytogenes konağın farklı dokularına kolonize olarak farklı klinik semptomlara neden olan multisistemik invaziv bir patojendir. Listeriozis hastalığı, menenjit, septisemi, birincil bakteremi, endokardit, menenjit olmayan merkezi sinir sistem enfeksiyonu, konjunktivit ve grip benzeri hastalık (ates, bitkinlik, kırıklık, bulantı, kramplar, kusma ve ishal) invaziv sendromlarla karakterize edilir. İnvaziv sendromlarda ortalama inkübasyon devresi semptomların başlamasından önce yaklaşık 30 gündür. Ateşli gastroenteritisle sonuçlanan listeriozisin invaziv olmayan formu birkaç salgında belgelenmiştir. Listeriozisin invaziv olmayan formunda ortalama inkübasyon süresi kısadır, tipik olarak 18 – 20 saattir. Ateşli gastroenteritisin semptomlarına neden olacak infekte edici doz miktarı bilinmemektedir. Ancak hastalığın invaziv formundakinden daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Donnelly, 2004).

Düşük miktarlarda *Listeria monocytogenes* ile kontamine gıdanın tüketimi ile sağlıklı yetişkinlerde herhangi bir klinik belirtiye yol açmaz iken çocuk ve bebek, yaşlı, hamile, ilaç veya hastalık nedeniyle bağışıklık sistemi bozuk olan kişilerin bu canlıya daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Hastalığın insidensi düşük olmasına rağmen özellikle risk grubundakilerde yüksek mortalite (yaklaşık %30) görülebilmektedir. Vakaların %10-20' si hamile ve yeni doğanlarda görülmektedir. Özellikle hamilelerde listeriozis enfeksiyonları, grip benzeri semptomlar göstermekte ve plasenta yolu ile fetusa geçebildiği için erken sancı, abortus, ölü doğum, yeni doğan bebeğin erken ölümüne veya konjenital anomali doğumlara neden olabildiği ve ölüm oranı oldukça yüksek olduğu (bebeklerde %50 ve diğer gruplarda en az %25' dir) belirlenmiştir (Rhoades et al., 2008).

L.monocytogenes ile kontamine olmuş gıdaların tüketildikten 12 saat sonra ateş, karın krampları, diyare, yorgunluk, baş ağrısı ve kusma ile seyreden gastrointestinal bir sendrom meydana gelmekte ve Listeriyal menenjit ve bakteriyemi gibi daha ciddi durumlar ancak günler veya haftalar sonra ortaya çıkmaktadır (Donnelly, 2004).

Enfeksiyonun giriş noktası sindirim sistemi olup, inkübasyon periyodu sindirimi takiben bir gün içerisinde oluşmaktadır. *L.monocytogenes* organizmaya girdikten sonra ilk gün karaciğer ve dalakta kalmakta, bu süre içerisinde makrofajlara girerek 48 saat içerisinde logaritmik olarak çoğalmakta ve makrofajları parçalamaktadır. Daha sonra granülomatoz lezyonların oluşmasına neden olmakta ve sepsisemi ile enfeksiyon, vücudun diğer kısımlarına da yayıldığı saptanmıştır (Rhoades et al., 2008).

2.1.2.4. *L.monocytogenes* izolasyonu

Listeria gıdalarda en zor belirlenen bakteriler arasındadır. Diğer mikroorganizmalar ile yoğun kontamine materyallerde ve gıdalarda Listeriozis etkenlerinin izolasyonu amacıyla zenginleştirme yöntemi tercih edilmektedir (Glaser, 2001).

Listeria spp.' nin gıdalardan, çevresel kaynaklardan ve dışkıdan izolasyonu için günümüzde çok çeşitli selektif broth ve agarlar bulunmaktadır. ISO 11290-1, 2 tarafından *Listeria* spp.' nin izolasyonu için 1996 ve 1998 yıllarında PALCAM ve OXFORD selektif agarları primer ve sekonder besi yeri olarak tavsiye edilmistir. Söz konusu agarlarda ortası bombeli tipik üremelerin (öküzgözü veya balıkgözü kolonileri) görülebilmesi mümkün olabilmektedir. Yapılan çalışmalarla son yıllarda 'RAPID' L.MONO, ALOA, BCM *Listeria monocytogenes*' gibi isimlere sahip kromojenik besi yerleri üretilmiştir. Kromojenik besi yerlerinin, standart besi yerlerine göre izolasyon performanslarının daha iyi olduğu ve daha hızlı sonuca gidildiği pek çok literatürde bildirilmiştir.

L. monocytogenes' in gıdada var/yok şeklinde aranmasında; ABD Gıda ve İlaç Kuruluşu (FDA), Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF), Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO), Campden ve Chorleywood Gıda Araştırma Birliği (CCFRA), ABD Tarım Bakanlığı (USDA), Almanya Sağlık Kuruluşu tarafından önerilen 35 LMBG standart yöntemi (35 LMBG Test Yöntemleri Koleksiyonu), Avustralya ve Yeni Zelanda standart test yöntemi bulunmaktadır. Bu standart yöntemlerden yalnızca ISO, 35 LMBG, Avustralya ve Yeni Zelanda standart yöntemlerinde, *L.monocytogenes*' in kantitatif olarak belirlenmesi de yer almaktadır.

FDA ve BAM yalnızca içerisinde zenginleştirme basamağı içeren bir metottur. Bu zenginleştirme basamağında acrifilavin, nalidixic asit ve cycloheximide selektif ajanlarını içeren *Listeria* Enrichment Broth (LEB) kullanılır. LEB’ de 30°C de 48 saat inkübe edilir ve ardından Oxford, PALCAM, MOX gibi selektif *Listeria* agara ekim yapılır.

ISO 11290 standardı gıda ve hayvan dışkısından *Listeria monocytogenes*’ in kültürel metotla tespit ve sayımı için geçerlidir. Temelde dört basamakta gerçekleştirilmektedir;

1. Ön zenginleştirme aşaması
2. Selektif zenginleştirme aşaması
3. İzolasyon aşaması (selektif besiyerine ekim)
4. Doğrulama aşaması (Biyokimyasal testler)

1. Ön zenginleştirme aşaması

Bu aşamada selektif inhibitörlerin yarım konsantrasyonda kullanılması ile zarar görmüş *Listeria* hücrelerinin kendilerini yenilemesini ve sayıca az ise üreyerek sayılarının artırması için kullanılır.

En çok tercih edilen ön zenginleştirme besiyerleri Half Fraser Broth (ISO’ ya göre) ve *Listeria* Enrichment Broth (FDA ve IDF’ ye göre) dir. Bunun haricinde et ve tavuk etleri için University of Vermont Medium (USDA’ ya), Buffered *Listeria* Enrichment Broth, *Listeria* Test Broth’ da kullanılmaktadır.

2. Selektif zenginleştirme aşaması

Listeria popülasyonunun artmasını sağlarken rekabetçi mikroorganizmaları baskılanmasını sağlar.

ISO’ ya göre selektif zenginleştirme için Fraser Broth kullanılmaktadır.

3. İzolasyon aşaması (selektif besiyerine ekim)

Selektif katı besiyerlerinde *Listeria* tipik koloniler ile tanımlanır (Gast, 2003).

İzolasyon için selektif katı besiyerleri: Lityum Klorür-Feniletanol Moksalaktam Agar (LPM), Oxford Agar (OXA), Modifiye Oxford Agar (MOX), Akriflavin Seftazidim Agar (ASA), Lityum Klorür Seftazidim Agar (LSA), Polikarışımı n-Akriflavin-Lityumklorid-Seftazidim-Eskülin-Mannitol Agar (PALCAM), CHROM agar *Listeria* Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (ALOA Agar) dir (Gast, 2003).

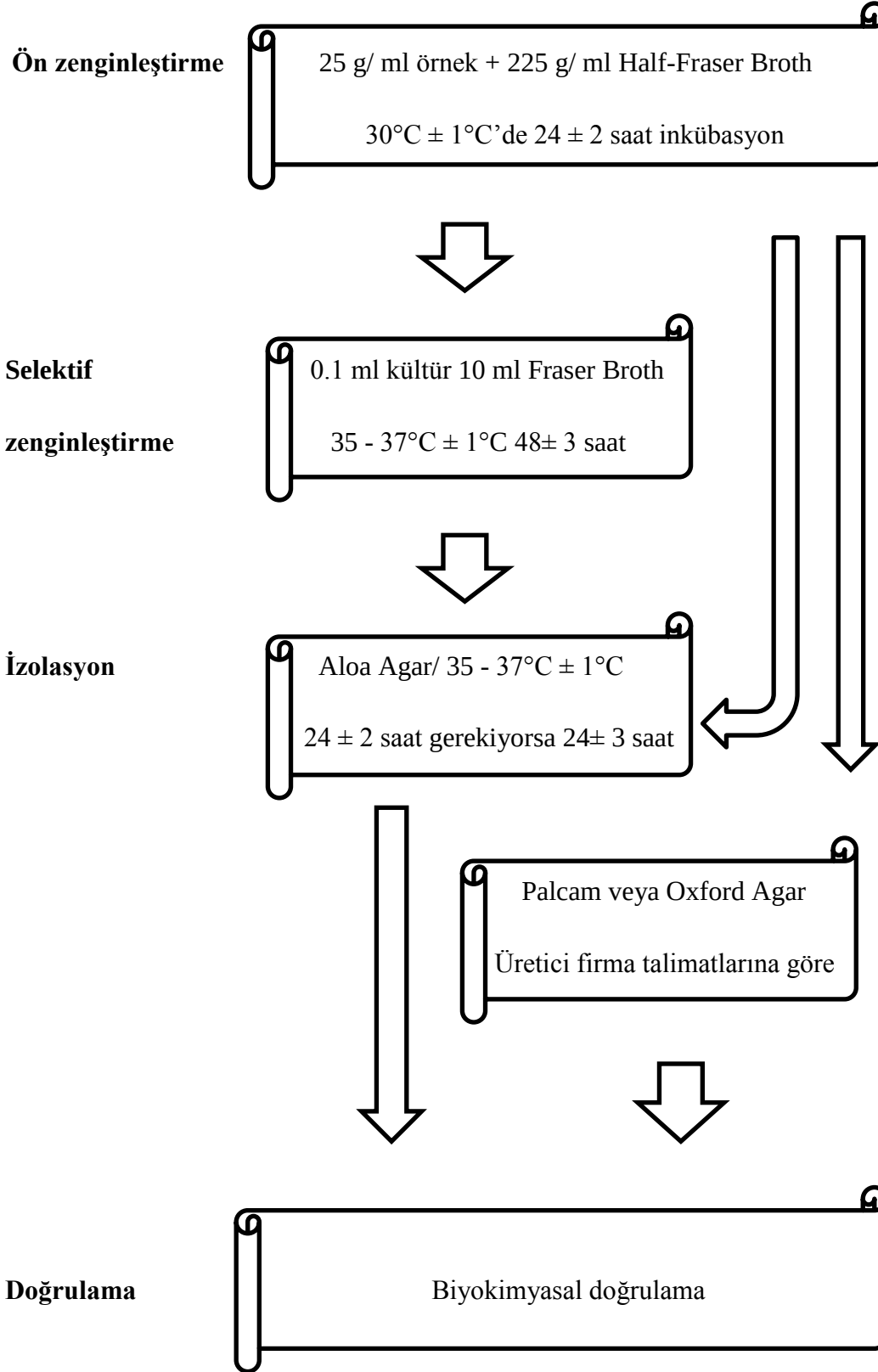
4. Doğrulama aşaması (Biyokimyasal testler)

Selektif katı besiyerinde elde edilen tipik koloniler TSA besiyerine geçilerek 35-37° C' de 18-24 saat inkübasyonun sonunda konveks, renksiz ya da opak düzgün kenarlı saf koloniler oluşturulur. TSA besiyerindeki tipik saf *Listeria* kolonilerine biyokimyasal testler uygulanır.

Listeria' nın biyokimyasal identifikasyonunda başta API olmak üzere minyatürize hazır ticari kitler kullanılmaktadır. API *Listeria* Test Kiti' nde ise bir strip üzerinde aynı anda 10 adet biyokimyasal test yapılmakta ve 18-24 saat içerisinde *Listeria* spp. ayrımı gerçekleştirilmektedir. Testte hemoliz gibi ek testlere ihtiyaç duyulmamaktadır.

Bu reaksiyonlar şeker fermentasyon, aminoasit peptidaz, lipolitik ve hemolitik aktiviteler veya CAMP testine dayanmaktadır.

İdentifikasyon için de immunomanyetik ayırma, Clearview (Oxoid) *L.monocytogenes* Hızlı Test Kiti, Pathalert (Merck) *Listeria* Hızlı Test Kiti, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılan yöntemlerdir.



Şekil 2.4. *L.monocytogenes* İzolasyon Şeması (ISO 11290-1/A1:2004:2004-10)

2.1.3. *Cronobacter sakazakii*

2.1.3.1. Tarihçesi ve genel özellikleri

Son yapılan polifazik taksonomik çalışmalar sonucu *E.sakazakii*, *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde *Cronobacter* olarak adlandırılan yeni bir cins altında sınıflandırılmıştır (Iversen et al., 2007, 2008).

Cronobacter spp. önceleri *Enterobacter cloacae*' nın sarı pigment veren bir tipi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan DNA-DNA hibridizasyonu, biyokimyasal reaksiyonları, pigment üretimi ve antibiyotik duyarlılıklarındaki farklılıklar nedeniyle yeni bir tür olarak 1980 yılında adlandırılmıştır. Adını yapmış olduğu katkılardan dolayı Japon bir mikrobiyolog olan Riichi Sakazaki'den almıştır (Iversen and Forsythe, 2003).

E.sakazakii isminin kayıtlara geçmiş ilk kullanımı, Farmer ve Brenner (1977) tarafından yapılmıştır (Gurtler et al., 2005).

Bu bakterinin yeni doğanlarda sebep olduğu ölüm oranının yüksekliği nedeniyle Yunan mitolojisindeki yeni doğan bebekleri yutan “Cronos” adındaki tanrıdan esinlenerek *Cronobacter* adı verilmiştir. Günümüz bilimsel literatüründe, bakteri tanımlanırken hem *Cronobacter* spp. hem de *E.sakazakii* ismi kullanılmaktadır (Iversen, 2008).

1958 yılında, İngiltere'nin St. Albans bölgesinde meydana gelen menenjit etmeninin *E. sakazakii* olarak bilinen bu bakterinin sebep olduğunu ilk kez Urmenyi ve Franklin (1961) tarafından yapılmıştır (Iversen and Forsythe, 2003).

2008 yılında ABD' nin New Mexico eyaletinde ve Japonya' da kayıtlara geçen *Cronobacter* spp. enfeksiyonları bildirilmiştir. Kore' de sürekli bebek gıdalarından *C.sakazakii* izolasyonu gerçekleştirilse de herhangi bir salgın raporu kaydedilmemiştir (Iversen, 2008).

E.sakazakii 2002 yılında ICMSF (International Commision on Microbiological Specification for Food) tarafından kronik veya uzun süre etkili, hayatı tehdit eden, belirli bir kesim için aşırı tehlikeli sınıfa dahil edilmiştir (Iversen and Forsythe, 2003).

Türkiyede de *C.sakazakii* çeşitli gıda maddelerinden izole edilmiş olmasına rağmen, riskli gıda grubunu bebek mamalarının oluşturması sebebiyle, Türk Gıda Kodeksi' nde yapılan değişiklikler ile bebek maması formülleri ve devam formüllerinde *E.sakazakii*' nin analizinin yapılması zorunluluğu getirilmiştir (Anonim, 2009).

Cronobacterin doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber, bakteri çevrede ve gıdalarda bulunabilmektedir. *C.sakazakii* enfeksiyonlarının özellikle toz bebek mamalarından kaynaklandığı ifade edilmektedir. Epidemiyolojik araştırmalar bebek mamasının yanı sıra, hastane ortamlarında mamaların hazırlanması için kullanılan araç-gereçleri de kontaminasyon kaynağı olarak göstermiştir. Amerika ve Avrupa' da kontamine toz bebek maması ile ilişkili 5 adet *Enterobacter sakazakii* salgını rapor edilmiştir. Yapılan bir araştırmada 13 ülkeden toplanan toz bebek formüllerinden *E.agglomerans*, *E.cloacae* ve *C.sakazakii* yüksek miktarda izole edilmiştir (Iversen and Forsythe, 2004).

Bu bakteri bebek mamalarının dışında peynir, et, sebze, süttozu, UHT süt, fermente edilmiş ekmek, tofu, ekşi çay, sosis eti, tahıllar, baharat ve sebzeler de dahil olmak üzere bir dizi gıdadan izole edilmektedir. Bunların yanı sıra fabrika ortamlarından, süttozu üretim tesislerinden, ev tipi elektrik süpürgesinden de izole edildiği bildirilmiştir. Bakterinin lateks, polikarbonat, silikon ve paslanmaz çelikte tutunabildiği ve gelişebildiği belirtilmektedir. *Cronobacter* spp.' nin gıdalarda ve çevrede, klinik ortamlarda olduğundan daha yaygın olduğu belirtilmiştir. Gıda maddelerine kemirgenler ve sinekler gibi vektörlerle de sonradan bulaşabilmektedir (Kuzina et al., 2001; Iversen and Forsythe, 2003).

Bu bakteri kurutmaya, ısıl işlemlere, düşük pH' a karşı dirençlidir ve biofilm oluşturabilirler. Ayrıca *Enterobacter sakazakii* ortamdaki azot kaynağı sınırlı olduğunda kapsül üretir (Iversen and Forsythe, 2003).

2.1.3.2. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Cronobacter sakazakii, *Enterobacteriaceae* familyasına ait olup, gram negatif, fakültatif anaerob, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan, peritrik flagella ile hareketli bir bakteridir (Farmer et al., 1980).

Cronobacter spp. 6-47 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmekle beraber optimum üreme sıcaklığı 41-45°C' dir (Iversen et al., 2004a). Yapılan

başka bir araştırmada *Cronobacter* spp.'nin üreyebildiği en düşük pH değerlerinin 37 °C'da pH 3.9-4.1 olduğu bildirilmiştir. Gelişebildiği ideal pH ise 7.0±0.2'dir (Dancer et al., 2009).

C.sakazakii'nin genel biyokimyasal özellikleri indol, dulcitol ve malonat negatiftirler. Oksidaz, laktoz, sorbitol, maltitol, palatinoz, putresin ve turanoz pozitifler. *E.cloacae*'nin aksine, *E.sakazakii*, D-sorbitolu fermente edememekte, DNaz enzimi üretimi daha geç olmaktadır. Enzim aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda *E.sakazakii*'nin diğer *Enterobacter* türlerinden farklı olarak a-glukosidaz ve tween esteraz aktivitesi gösterirken, fosfoamidaz enzimini üretmediği bildirilmiştir (Iversen and Forsythe, 2003).

2.1.3.3. Patojenitesi

Menenjit, neonatal *Cronobacter* spp. enfeksiyonlarında rapor edilen en sık görülen durumdur. *Cronobacter* spp. enfeksiyonları bebeklerde hayati tehlike yaratan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit (NEC) vakalarının önemli bir sebebidir. *Enterobacter sakazakii* en çok düşük doğum ağırlıklı, prematüre ya da savunma sistemi baskılanmış bebeklerde risk oluşturmakta ve bebeklerde % 50-75 gibi yüksek oranda ölümlere neden olmaktadır. Canlı kalan hastalarda hidrosefalus, kol ve bacaklarda paraliz (kuadropleji), ve gelişmede gerilik gibi çeşitli nörolojik anomaliler görülmektedir. Salgınlar da çoğunlukla yenidoğan bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir. Yetişkinlerde ise çok daha az sayıda *Cronobacter* spp. enfeksiyonu bildirilmiştir ve genellikle enfeksiyonun hayati tehlike yaratmadığı saptanmıştır (Nazarowec-White and Farber, 1997a).

Bakterinin, yeni doğmuş bebeklerin üst gastrointestinal sistemlerinde düşük pH koşullarıyla karşılaşmayacağı ve hızla ince bağırsaklara geçerek enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir. Bakteri, en çok yeni doğmuş bebekler ve 3 günlük ile 4 yaş arası çocuklarda hastalığa neden olarak kendini göstermiş olup, şimdiye kadar bebek ve çocuklarda yaklaşık 156 adet *Cronobacter* spp. enfeksiyonu vakası ve 29 adet ölüm (% 19) rapor edilmiştir.

Gram negatif özellikte olan *Enterobacter* türlerinin endotoksin üreten fırsatçı patojen oldukları belirtilmektedir. Proteaz, fosfataz ve lipaz aktivitelerinin, *C.sakazakii* enfeksiyonu sırasında hücre ölümlerine yol açtığı, üremenin farklı fazlarında insan epiteline adhezyon özelliğinin olduğu, Caco-2 hücrelerine

tutunma ve invaze olma özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir (Pagotto et al., 2008).

C.sakazakii' nin patojenik mekanizması ya da virulens faktörleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır (Nazarowec-White and Farber, 1997a).

Bugüne kadar *Cronobacter* spp. enfeksiyonu saptanmış neonatal vakalarda bulaşıcı doz belirlenmemiştir. Enfektif doz, organizmanın geçmişi, konakçının durumu ve gıda matrisine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Iversen and Forsythe, 2003).

1958 yılında, İngiltere' de yeni doğmuş iki bebekteki menenjit vakasında ve daha sonra Danimarka' da menenjitten sağ kurtulan fakat çeşitli zihinsel ve nörolojik bozukluklar yaşayan bir çocukta hastalık etmeni atipik sarı pigmentli *E.cloacae* olarak kaydedilmiştir (Iversen and Forsythe 2003; Gurtler et al., 2005).

İzlanda' da sağlıklı, zamanında doğmuş bir bebeğin, hastaneden çıkarılmadan önce hasta olduğu ve *Cronobacter* spp. enfeksiyonunun kalıcı nörolojik bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir.

Yeni Zelanda' da 2004' te erken doğan bir bebekte *Cronobacter* spp. kaynaklı menenjit belirlenmiş ve ölümle sonuçlanmıştır (Drudy et al., 2006) .

2.1.3.4. C.sakazakii izolasyonu

E.sakazakii analizlerinde genel *Enterobacteriaceae* sayımı ve izolasyonuna yönelik besiyerleri kullanılmaktadır. Çeşitli araştırmacılar tarafından önerilen yöntemler: zenginleştirme, izolasyon ve biyokimyasal tanımlamayı içermektedir.

Gıdalarda *Enterobacter sakazakii* tespitine yönelik mevcut FDA metodu *E. sakazakii*' nin sarı pigment üretimine dayalıdır. FDA (2002)' nin önerdiği yöntem: ön zenginleştirme, selektif sıvı besiyerinde (EE broth) zenginleştirme, selektif katı besiyerine (VRBG) ekim, doğrulama aşamalarıdır. Ancak bu protokol yalnızca *Enterobacteriaceae* için seçici olup, *Cronobacter* spp. için belirleyici değildir. En muhtemel sayı tekniğinin kullanıldığı bu yöntem ile beş günde sonuç alınmaktadır (Heuvelink et al., 2001).

C.sakazakii enterik bakterilerin izolasyonunda kullanılan MacConkey, eosin methylene blue ve deoxycholate agar vb. besiyerlerinde üreyebilir (Iversen and Forsythe, 2003). Bunun dışında *E.sakazakii*' nin direkt belirlenmesine yönelik çeşitli besiyerleri mevcuttur. Gıdalardan *E.sakazakii* izolasyonu için kullanılan kromojenik besiyerleri *E. sakazakii*' nin sahip olduğu α -glucosidase aktivitesine dayalıdır. Günümüzde gıdalardan *E. sakazakii* izolasyonu için XaGlc içeren besiyerlerinden en yaygın kullanılanları; Druggan-Forsythe-Iversen agar (DFI agar) ve *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA)'dır (Druggan and Iversen, 2009). Bunların dışında son dönemde geliştirilen besiyerlerine örnek olarak Kim-Rhee (KR) Agar ve Al-Holy-Rasco (AR) Broth verilebilir (Al-Holy et al., 2008; Kim and Rhee, 2011).

ISO (International Organization for Standardization) ve IDF (International Dairy Federation) tarafından 2006 yılında süt ve süt ürünlerinde *Cronobacter spp.*' nin belirlenmesine yönelik standart bir analiz yöntemi yayınlanmıştır (Anonymous, 2006). Standartta bildirilen yöntem, ön zenginleştirme ve zenginleştirme işlemleri ile izolasyonda kullanılan kromojenik boya içeren selektif katı besiyeri ve inkübasyon sıcaklık dereceleri bakımından FDA' nın yönteminden oldukça farklıdır. ISO 22964 standardına göre *C.sakazakii* izolasyonu temelde dört basamakta gerçekleşmektedir.

1. Ön zenginleştirme aşaması
2. Selektif zenginleştirme aşaması
3. İzolasyon aşaması (selektif besiyerine ekim)
4. Doğrulama aşaması (biyokimyasal testler)

1. Ön zenginleştirme aşaması

Zarar görmüş *C.sakazakii* hücrelerinin kendilerini yenilemesini ve sayıca az ise üreyerek sayılarının artırması için kullanılır.

Ön zenginleştirme sıvı besiyeri olarak FDA' de steril saf su, ISO 22964' e göre Tamponlanmış peptonlu su (BPW) kullanılmaktadır.

2. Selektif zenginleştirme aşaması

C.sakazakii popülasyonunun artmasını sağlarken rekabetçi mikroorganizmaları baskılanmasını sağlar.

Selektif zenginleştirme besiyeri olarak FDA' e göre EE Broth (*Enterobacteriaceae* Enrichment Broth), ISO 22964' e göre ise mLST Broth-vankomisin (Modifiye Lauryl Sulphate Broth) kullanılmaktadır.

3. İzolasyon aşaması (selektif besiyerine ekim)

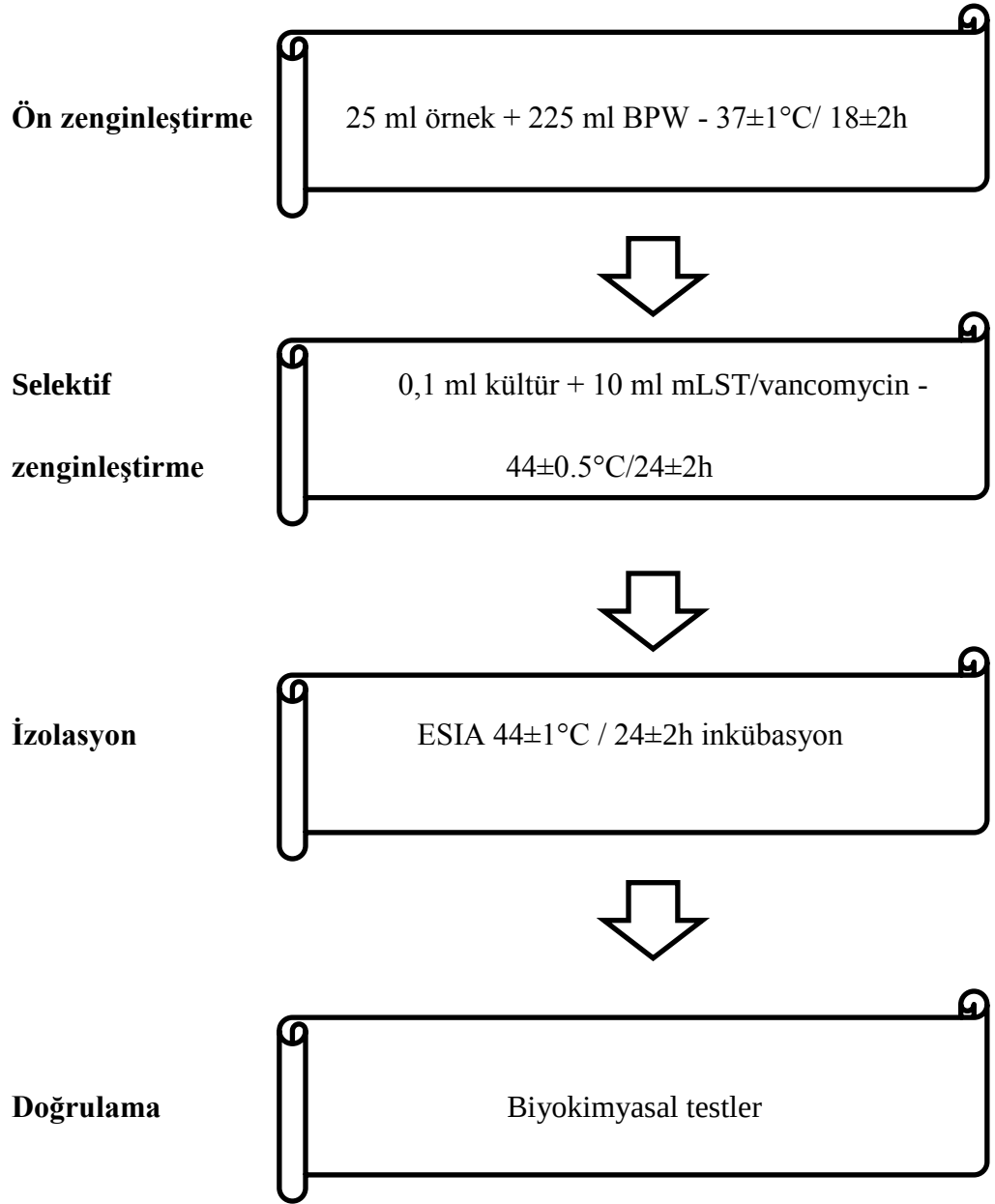
Seçici agarla her biri tek bir bakteri hücresinden köken alan izole kolonileri elde edilir.

Selektif katı besiyeri olarak FDA' e göre VRBG Agar, ISO 22964' e göre ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) kullanılmaktadır. İzolasyonda kullanılan besiyerinin (VRBG Agar) bakteri için seçici ve ayırt edici olmaması nedeniyle son yıllardaki çalışmalarda *Cronobacter spp.* izolasyonu için kromojenik substratlar içeren besiyerleri (Kim-Rhee (KR) Agar ve Al-Holy-Rasco (AR) Broth) geliştirilmiştir (Restaino et al., 2006).

4. Doğrulama aşaması (biyokimyasal testler)

Selektif katı besiyerinde elde edilen tipik koloniler TSA besiyerine geçilerek 25° C' de 44-48 saat inkübasyonun sonunda sarı renkli saf koloniler oluşturulur. TSA besiyerindeki tipik saf *C.sakazakii* kolonilerine biyokimyasal testler uygulanır.

C.sakazakii' nin biyokimyasal identifikasyonunda API 20E ya da API ID 32 hızlı test kitleri kullanılmaktadır. API 20E Test Kiti' nde ise bir strip üzerinde aynı anda 20 adet biyokimyasal test yapılmakta ve 18-24 saat içerisinde sonuç elde edilmektedir. API ID 32 Hızlı test kiti ile tanımlama için ise 4 saat yeterlidir. Ancak bu test sistemi tanımlama yapmaktan ziyade enzim aktivitesi hakkında bilgi vermeye yöneliktir. Bu testler: alkalın fosfotaz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), lipaz (C14), lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin, alfa-çimotripsin, asit fosfataz, naftol-AS-Bifosfohidrolaz, alfa-galaktozidaz, beta-galaktozidaz, alfa-glukozidaz, beta-glukozidaz, Nasetil-beta-glukozaminidaz, alfa-mannozidaz ve alfa-fukozidazdır.



Şekil 2.5. *C.sakazakii* İzolasyon şeması (ISO 22964:2006)

2.2. Gıda Patojenlerinin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Mikrobiyolojik yöntemler; geleneksel ve hızlı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Geleneksel yöntemler halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Hızlı yöntemlerle ise 1960' ların ortalarına doğru ortaya çıkmaya başlamışlardır. Son yıllarda daha fazla zaman ve iş gücü gerektiren maliyeti yüksek klasik yöntemlerin yerine kullanılabilecek daha ucuz basit ve hızlı yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Boer et al., 1999).

Hızlı yöntemler; biyokimyasal, immünolojik, nükleik asit tabanlı yöntemler ya da biyosensörler gibi çeşitli varyasyonları mevcuttur. Bu test yöntemleri manuel, yarı otomatik veya tam otomatik olabilmektedir (Boer et al., 1999).

Hızlı yöntemler; klinik, gıda ve çevresel örneklerde bulunan bakteri, mantar, virüs ve protozoon gibi mikroorganizmalar ile onlara ait metabolitlerin izolasyonu, identifikasyonu, erken tanısı, sayımı ve bakterilerin antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Boer et al., 1999).

2.2.1. Biyokimyasal tabanlı yöntemler

Biyokimyasal yöntemler, hazır bulunan çeşitli sıvı veya katı besiyerlerine saf kültürler inoküle edilip inkübe edilerek, enzim-substrat ilişkisine bağlı olarak sonuç alınan sistemlerdir (Boer et al., 1999).

- Kromojenik ve Florojenik Besiyerleri:

Kromojenik besiyerlerinde gelişmesi istenen bakterilerin enzimatik faaliyetleri sonunda belirli bir veya birkaç substrattan renkli maddelerin oluşarak kolonilerin bu renkte görünmesi ile gelişmesi istenen bakterinin ayrımı sağlanmaktadır. Bu testlerde şüpheli koloniler yönünden doğrulanması tavsiye edilir. Örneğin ALOA Chromogenic Agara vb.

Florojenik besiyerlerinde ise gelişmesi istenen bakterilerin enzimatik faaliyetleri sonunda belirli bir veya birkaç substrattan kolonilerde floresan ışıma oluşması ile hedef bakterinin ayrımı sağlanmaktadır. Örneğin Readycult Coliforms (su analizleri için) vb.

- Minyatürize Biyokimyasal Yöntemler:

Dehydrate substratlar içeren birçok mikrotüpten oluşmaktadır. Bu testler ortamın yeniden hazırlanmasını sağlayan bir bakteriyal süspansiyon ile inoküle edilir. İnkübasyon sırasında, metabolizma sonucu spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle renk değişimi oluşmaktadır. Sonuçlar database ile kodlanıp okunur. Örneğin API, Rapid, CRYSTAL ID vb.

- Otomatize-Minyatürize Biyokimyasal Yöntemler:

Minyatür biyokimyasal testleri içeren test kartlarının cihazda okunarak, database ile analitik karşılaştırma, antibiyogram, sonucun otomatik olarak verilmesine dayanan testlerdir. Panellere şüpheli koloni süspansiyonu eklendikten sonra diğer tüm işlemler otomatiktir. Örneğin Vitek 2, BD Phoneix vb.

2.2.2. İmmunolojik tabanlı yöntemler

Mikroorganizmaların belirlenmesi ve karakterizasyonunda ya da gıda kontaminantlarının belirlenmesinde antikor-antijen ilişkisine bağlı olarak sonuç alınan sistemlerdir (Boer et al., 1999).

- Lateks Aglütinasyon Testi:

Bu yöntemde partiküler antijen olarak lateks boncuklar kullanılır ve lam veya özel karteksler üzerinde antijen antikor birleşmesi sonucu gözlenen kümeleşme ile gerçekleştirilen testlerdir. Antijen ile antikorun birleşmesi sonucu gözle görülür aglütinasyon şekillenir. Her çalışmada mutlaka pozitif ve negatif kontrol kullanılması gerekir. Örneğin Slidex Staph Kit, Staphyloslide Kit, *Salmonella* Latex Kit, Dryspot *E.coli* O157 test kiti vb.

- Lateral Flow Testler:

Analiz edilecek antijene spesifik, gözenekli genelde nitroselüloz bir membran içinde hareket edebilen antikor ve analiz edilecek analite spesifik antijen veya etkene spesifik antikorların tutturulduğu partikülleri (renkli lateks partikülleri veya altın) içeren kurutulmuş bir konjugat pedinden oluşan sistemlerdir. Bu testlerde testin sonucunun pozitif olduğunu gösteren bir çizgi veya bant ve testin tamamlandığını, düzgün çalıştığını gösteren kontrol çizgisi mevcuttur. Örneğin Singlepath *E. coli* O157 (Oxoid) Rapid Test vb.

- Enzimle İşaretlenmiş İmmunosorbent Testler (ELISA):

Solid bir faza antijen veya antikorun absorpsiyonuna dayanan testte, örnek ve gerekli reagentlerin ilavesinin ardından, yıkama, işaretli antikor veya antijenin ilavesi, spesifik substratın ilavesi ve reaksiyonun durdurulması gibi işlemlerin

sırayla gerçekleştirilmesiyle tamamlanır ve sonuçlar otomatize ELİSA cihazlarında değerlendirilir.

- Enzimle İşaretli Floresan Testleri (ELFA):

Antijenin tanımlanmasında kromojenik substrat yerine florojenik substratın kullanıldığı yöntemde, hedef antijene spesifik bir yakalayıcı antikör ve ikinci konjuge bir antikora ilaveten floresan reaksiyonu oluşturan substrat bulunmaktadır. Örneğin Vitek Immuno Diagnostik Assay System (VIDAS) vb.

- İmmuno Manyetik Ayırma:

Hedef maddelerin (bakteri, hücre, protein, nükleik asit vb.), yüzeyi antikör ile kaplı manyetik partiküllere bağlanmasına ve alan içerisinde manyetik güç uygulamasıyla karışımdan ayrılmasına dayanan sistemdir. İMA tek başına bir tayin yöntemi olmasa da, seçici zenginleştirmeye dayalı tüm tayin yöntemleri için zaman kazandıran önemli bir aşamadır.

2.2.3. Nükleik asit tabanlı yöntemler

Çeşitli materyallerden izole edilen etkenlere ait nükleik asitlerin (DNA / RNA) veya spesifik sekanslarının in vitro koşullarda enzimatik olarak çoğaltılması (amplifikasyonu) temeline dayanan, nükleik asit amplifikasyon yöntemleridir.

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

İzole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak, sayısal çoğaltılması ve uygun bir şekilde görüntülenmesine dayanan sistemdir. Örneğin Touchdown, Nested, Multiplex, AFLP, RFLP ve Real-Time PCR vb.

- Gen-çip (Microarray) Teknolojisi:

Cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarını içeren çiplerdir. Çipler, işaretlenmiş cDNA fragmentleriyle bağlanmak üzere kullanılırlar.

2.2.4. Elektriksel sinyal ölçümü tabanlı yöntemler

Bünyesinde biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş ve analiz edilecek madde miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üreten analitik cihazlarla çalışan sistemlerdir (Ramsay, 1998).

- Biyosensör Teknolojisi:

Biyolojik algılayıcı ile analiz edilecek hedefin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üreten transduser' in kombinasyonundan oluşan bir cihazdır. Örneğin Malthus 2000, BiaCore T100, Detex System vb.

2.2.5. ATP ölçüm tabanlı yöntemler

Tüm yaşayan hücrelerde mevcut olan ATP nin spesifik enzimle reaksiyona girmesi sonucu açığa çıkan ışığın ölçülmesi esasına dayanan sistemlerdir (Edinger et al., 2002).

- ATP Biyoluminesans Ölçümü:

Canlı organizmalar tarafından kimyasal reaksiyonlarla ışık (Biyoluminesans) üretilmesi lusiferaz enzimiyle gerçekleşir ve bu enzim inaktifken ATP' ye bağlı bulunur. Ortamdaki ATP miktarına bağlı olarak enzim-koenzim kompleksi (lusiferaz – lusiferin) ile reaksiyon başlatılıp lüminometrik cihaz ile ölçüm yapılır. Monitörize HACCP uygulamaları için elverişlidir. Örneğin LUM Giene-2004, novaLUM Audit Features 2009 vb.

- Adenilat Kinaz Ölçümü:

ATP ve AMP' den iki ADP oluşum reaksiyonunu katalize eden Adenilat Kinaz (AK) enziminin cihaz ile ölçümesidir. Hijyen kontrollerinde sıklıkla kullanılır. Örneğin BIOTRACE – Clean Trace vb.

2.3. Real-Time PCR

PCR tekniği 1980 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından bulunmuştur ve 1993' te Nobel ödülü almıştır. PCR' ın

keşfedilmesinden sonra, PCR yöntemi bazı modifikasyonlara uğratılmış ve Nested PCR, RT PCR, Real-Time PCR gibi on dörtten fazla kullanışlı PCR metodu elde edilmiştir (Patrinos, 2005).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PZR) tekniği nükleik asitlerin in-vitro olarak (canlı organizma dışında) uygun koşullarda çoğaltılmasına dayanmaktadır (Patrinos, 2005).

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. 1992 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilen real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) termal cyclus cihazından elde edilen bilgilerin bilgisayara aktarılması ile PCR ürünlerinin gerçek zamanlı tespitini sağlayarak teşhis çalışmalarına hız kazandırmış ve sistemin güvenliği ve tekrarlanabilirliğini artırmışlardır (Mackay et al., 2002).

‘Real-time’ PCR da her bir döngüde sadece bir izleme yapılır. Sıcaklık değişirken floresans izlendiğinde, erime eğrileri hangi ürünlerin amplifiye edildiğini ortaya koyar ve tek bir baza kadar dizilim değişimlerini saptayabilir. Real-Time PCR ile PCR ürünlerinin floresan probalar yardımı ile gerçek zamanlı görüntülenmesi sağlanmıştır (Valasek and Repa, 2005; Wittwer et al., 2006). Real-time PCR’ da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle belirlenir (Günel, 2007).

Basit olarak bir PCR reaksiyonu hedef DNA, iki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, eşit olarak karıştırılmış deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), MgCl₂, KCl ve bir Tris-HCl tampon içermektedir. Taq-DNA polimerazın kullanılması ile her denatürasyon işleminden sonra yeniden enzim ilave edilmesi zorunluluğu ortadan kalkmıştır (Patrinos, 2005; Hanna et al., 2005).

PCR’ IN TEMEL BİLEŞENLERİ

- **Hedef DNA-** Hedef DNA’ nın ekstraksiyonunda önemli olan nokta amplifiye edilecek mikroorganizma DNA’ sının fonksiyonel özellikte olmasıdır. Bu nedenle hazırlık aşamasında DNA bütünlüğünün

bozulmamasına özen gösterilmelidir. Mikroorganizma türlerinin yüksek sayıda temsil edildiği mikroflora içerisinde çok az sayıda bulunması veya doku örnekleri içerisinde yüksek düzeyde konakçı DNA' sının bulunması, hedef DNA ekstraksiyonunu güçleştirmektedir (Candrian, 1995).

- **Primerler-** PCR uygulamaları için kalıp DNA' ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Kısa, tek sarmallı DNA molekülleri olup, bu moleküller, DNA matrisinin belirli bir bölümünün sonu ile komplementer yapıya sahiptirler. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan primerler, özellikle primer dimer adı verilen spesifik olmayan bantların oluşmasına yol açar. Primer dimerler küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirine bağlanması yada DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotidleri kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşan bantlardır. Hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi ve bunlar üzerindeki spesifik bölgelerin seçilmesi ve başka bir ajanda bulunmamasına gayret gösterilmelidir (Arda, 2000).
- **DNA Polimeraz Enzimi-** DNA polimeraz enzimi, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit dNTP' den uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz eder. Günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlardan en yaygın olanı *Thermus aquaticus*' dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Taq-polimeraz enziminin, sıcaklığa duyarlı enzimlere karşı 2 önemli üstünlüğü vardır: Birincisi her denatürasyon siklusunu takiben yeni enzim ilavesine gerek kalmaması, ikincisi primerlerin hedef DNA' ya bağlanmasının yüksek sıcaklıklarda daha spesifik ve DNA sentezinin de daha hızlı olmasıdır (Saiki et al., 1988).
- **dNTP Karışımı-** Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. dNTP karışımı liyofilize formda veya sulu çözelti halinde bulunmaktadır. dNTP karışımı 20 °C' de birkaç ay stabil özelliğe sahiptir (Gassen et al., 1994).
- **Tampon ve MgCl₂ -** PCR' da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Tampon, pH' ın korunmasını sağlar. Mg⁺² iyonları dNTP' ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA' nın T_m değerini (çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin

yarısının ortadan kalkmasını sağlayan sıcaklık derecesi) arttırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar.

PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Bu döngüler klasik olarak üç basamağı içerir:

1. Denatürasyon (90°C-95°C): Deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılmasıdır.
2. Hibridizasyon-Annealing (40°C-65°C): Sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasıdır.
3. Polimerizasyon-Extension (72°C): Zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzamasıdır (Bkz. Şekil 2.6).

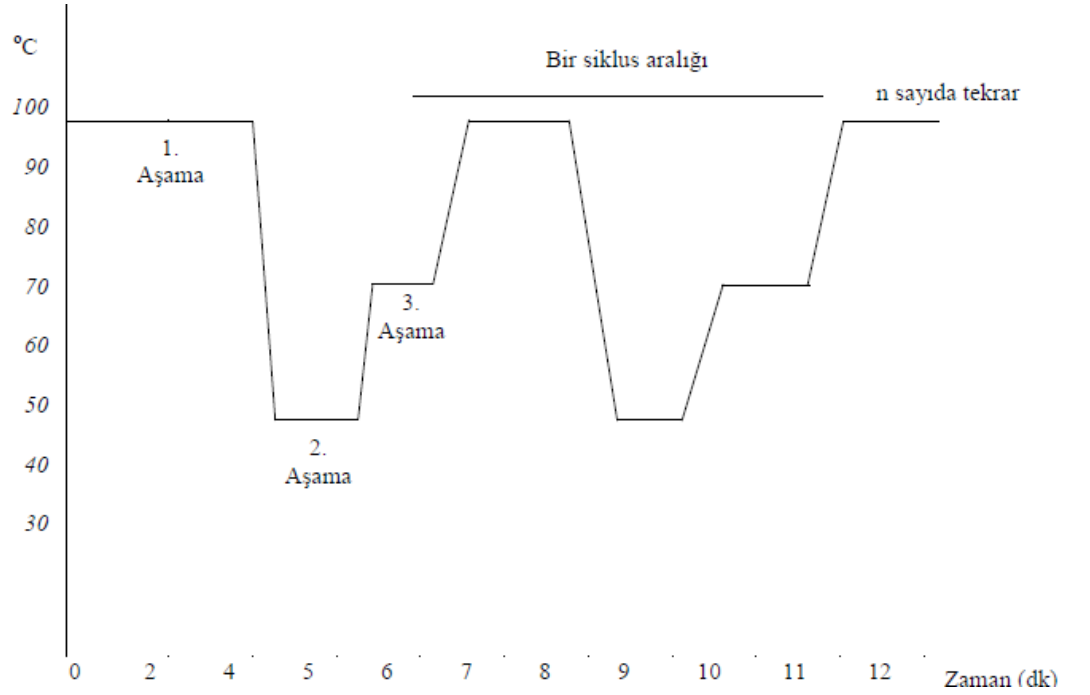
Denatürasyon basamağında karışım hedef DNA' nın iki zincirinin birbirinden ayrılması için gerekli sıcaklığa (90°C-95°C) kadar ısıtılır ve tek iplikli DNA elde edilir. DNA' nın zarar görmesi durumunda PCR' da yanlış yapıli nükleotidler oluşacağından, denatürasyon aşamasında çok yüksek ısı uygulamalarından sakınılmalıdır. Çift iplikli DNA' nın yarısının tek iplikli hale geldiğı sıcaklığa erime noktası (Tm) denir. Bu sıcaklık genellikle 40-65 derece arasındadır ve primer olarak kullanılan oligonükleotit sekanslarının dizaynına bağılıdır (Boer et al., 1999; Verkuil et al., 2008).

Hibridizasyon-Annealing basamağında önce oligonükleotitlerin hedef DNA' nın uygun bölgelerine bağlanmaları için ısı (40°C-65°C) düşürölür. İki komplementer DNA ipliğı tekrar iki iplikli DNA molekülünü oluşturur (Boer et al., 1999).

Polimerizasyon-Extension basamağında ise primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık tekrar termostabil DNA polimerazın DNA ipliklerini sentezleyebilmesi için gereken optimum sıcaklık olan 72 dereceye çıkar. dNTP' lerin varlığında DNA polimeraz enzimi kalıbı 3'-5' ucunda okur, dNTP' leri 5'-3' ucunda ekler. Bu şekilde 5'-3' yönünde DNA sentezi meydana gelir. Uzama fazıyla bir döngü tamamlanmış olur. Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur (Boer et al., 1999; Verkuil et al., 2008).

İşlem tekrar başa döner ve orijinal hedefler gibi her bir ürün bir sonraki aşamalarda oluşacak bağlanma ve uzamalarda kalıp olarak kullanılır. Her bir reaksiyonun sonunda PCR ürünleri teorik olarak çift zincir şeklinde oluşur.

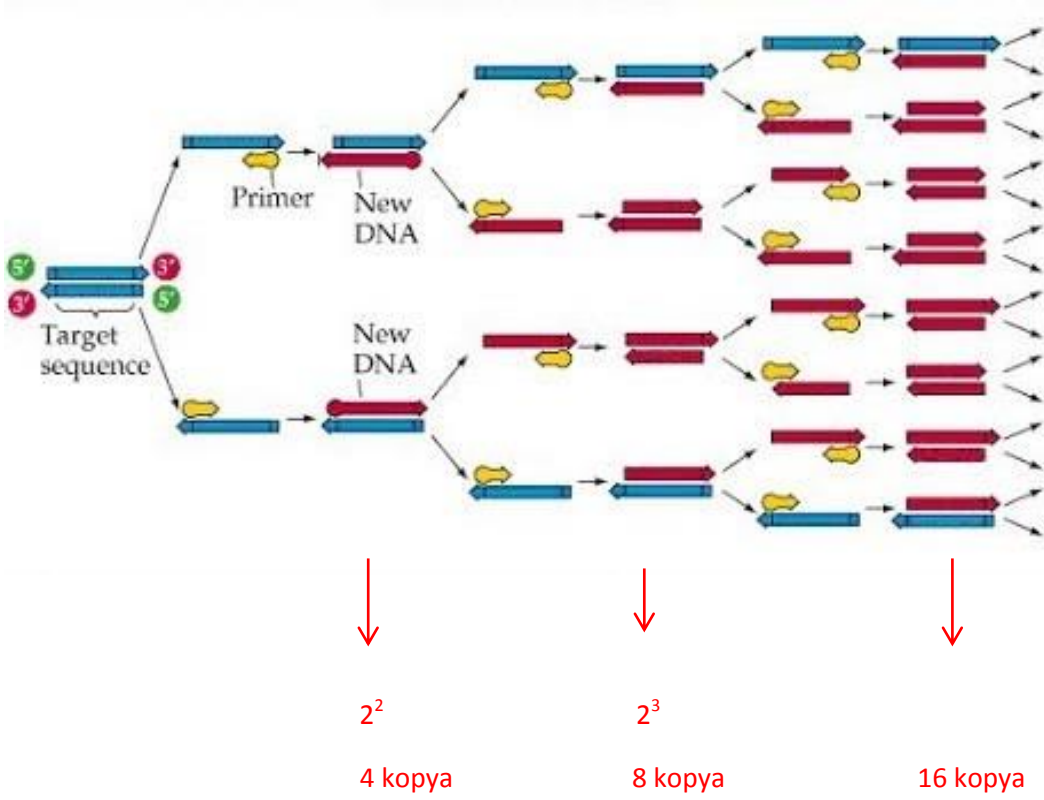
Böylece hedef dizi reaksiyon sonunda 2^n kat (n = siklus sayısı) amplifiye edilmiş olur (Verkuil et al., 2008).



Şekil 2.6. PCR tekniğinde sıcaklık akış döngüsü

Real-Time PCR’ da florasan işaretli ve işaretli olmak üzere iki adet prob kullanılmaktadır. İşaretsiz primer, istenen DNA parçasının ucuna, işaretli olansa ortasına bağlanmaktadır. Uca bağlanan işaretli primerden başlayan polimerizasyon işlemi esnasında ortaya bağlanan florasan işaretli prob (quencher) ayrılarak ortama atılmakta ve florasan parlamaya vermektedir. Oluşan PCR ürünü arttıkça, ayrılarak ortama atılan florasan işaretli primer sayısı da artmakta ve bu artışın florasan parlamaya duyarlı bir video kamera ile tespit edilerek bilgisayara parabol şeklinde bir eğri olarak yansıtılması ile sonuçlar görüntülenmektedir (Lee et al., 1993a).

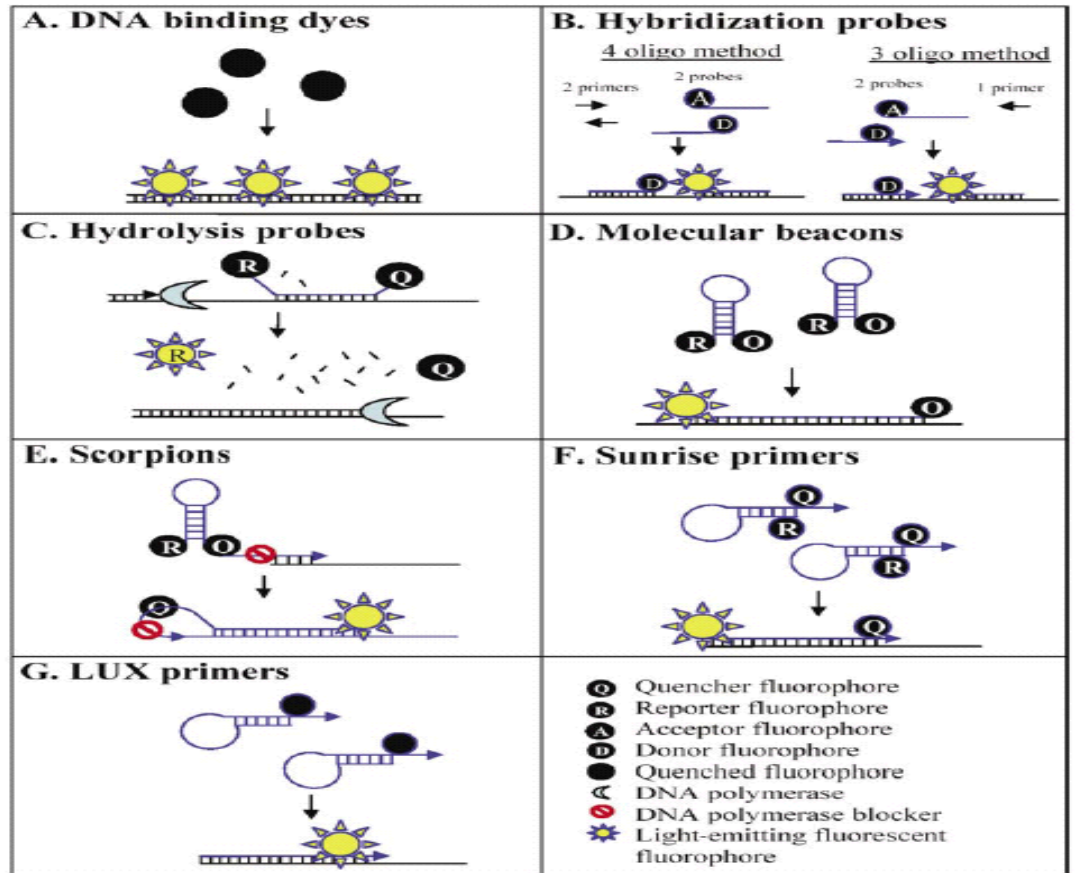
PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (CT- threshold cycle) hedef template’ in başlangıç miktarı ile orantılıdır (Bkz. Şekil 2.7).



Şekil 2.7. PCR başmakları 1. Denatürasyon 2. Annealing 3. Extension (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:PCR.png>).

REAL-TİME PCR' DA KULLANILAN PROB SİSTEMLERİ VE BOYALAR

- **Özgül floresan işaretli probalar-** Tek iplikle belirleme yöntemleridir. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), Taqman, Molecular Beacons, Scorpion Primerleri, Hibridizasyon Probları, Sunrise primerleri gibi.
- **Özgül olmayan floresan işaretli probalar-** Spesifik olmayan çift ipliğin arasına bağlanan boyalardır. Syber Green I ve Etidyum Bromid gibi (Bkz. Şekil 2.8).



Şekil 2.8. PCR’ da kullanılan prob ve primer çeşitleri (http://en.wikipedia.org/wiki/Real-time_polymerase_chain_reaction).

Günümüzde Real-time PCR’ la moleküler klonlama, DNA’nın in vitro mutagenesi, parmak izi (finger printing), genetik hastalıkların teşhisi ve değişik hayvanlara ait proteinlerin saptanması, mikroorganizmaların saptanması, gıdalarda patojen bakterilerin tespiti gibi birçok alanda başarıyla kullanılmaktadır.

Gıda orijinli patojenlerin spesifik olarak saptanmasında, Real-time PCR gıda üretim zincirinin her safasında kontamine olan ürünlerin kontrolü için güvenilir, hızlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Seo et al., 2004). Özellikle gıda üretim tesisleri gibi sürekli üretimden laboratuvara numune akışının olduğu diyagnostik laboratuvarlarda hızlı sonuç alınmasını sağlaması açısından Real-time PCR’ ın önemi artmıştır. Böylece kirli olan ürün hızlıca tespit edilerek gıda dağıtım zincirine ulaşmadan önlem alınarak riskler ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi sağlanmaktadır. Ham maddeden final ürüne kadar daha kontrollü ve sağlıklı üretim yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Klasik metotla patojen bakterilerin analizi ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, izolasyon, biyokimyasal ve serolojik doğrulama gibi yoğun ve uzun süre süren basamakları içermesinden dolayı hızlı ürün sürkülasyonlarının olduğu gıda üretim tesisleri için dezavantajdır. Bu yüzden gıda üretim tesisleri gibi hızlı sonuç alınması gereken yerlerde Real-time PCR büyük avantaj sağlamaktadır. Piyasada mevcut patojen bakteri tespit PCR kitleri de oligonukleotit primerleri seçimi ve dizayn edebilmeden kaynaklı hataları ortadan kaldırırken, zaman alan analiz işlemleri kısaltarak büyük ölçüde uygulama kolaylığı ve daha çok sayıda numune ile çalışma olanağı tanır (Wittwer et al., 2006).

Gıdalarda patojen mikroorganizmaların PCR tekniği ile saptanmaları mikroorganizmaların nükleik asitlerinin amplifikasyonuna dayanır ve hedef nükleik asitlerin ekstraksiyonu, çoğaltılması ve amplifikasyon ürünlerinin analizi olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilir. Real-time PCR' da mikroorganizmaların saptama, ölçüm ve analizleri tek bir döngü içinde gerçekleştirilebilir (Wittwer et al., 2006).

REAL-TİME PCR' IN AVANTAJLARI

- Spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmez.
- Az miktarlarda hedef molekül olduğu durumlarda bile sonuca ulaşılabilmesi sağlamaktadır.
- Kapalı bir sistemde ürünler belirlendiği için amplifikasyon sonrası kontaminasyonlar engellenmiş olur.
- Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek son derece az bir kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir.
- Real-time PCR' da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle hem daha kısa sürede sonuç alınabilmekte hem de klasik PCR tekniğinde ihtiyaç duyulan agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.
- Real-time PCR ürünlerinin analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmasından dolayı sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler otomatik olarak devam edebilmektedir.

- Spesifik erime eğrisi analizleri ile spesifik amplifikasyonların tanımlanmasına olanak sağlar.
- Duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği yüksektir (Sarmiento et al., 2003; Kubista et al., 2006).

REAL-TİME PCR' IN DEZAVANTAJLARI

- PCR' ın prosedürü karışıktır. Buyüzden teknik donanım, alt yapı, beceri ve tecrübe gerektirmesi gibi zorlukları vardır. Fakat son gelişmelerle birlikte PCR rutin kullanım için daha elverişli hale getirilmeye başlanmıştır (Boer et al., 1999).
- Gıdadaki patojen bakteriyi tespit etmeyi sağlar fakat gıdadaki toksinlerle ya da virulensle ilgili herhangi bir bilgi vermez (Boer et al., 1999).
- PCR' ın dizaynında ve sonuçlarının yorumlanmasında özenli olmak gerekmektedir (Mackay, 2004).
- PCR' ın bir başka dezavantajı da ölü ve canlı hücrelerin birbirinden ayıramamasıdır ve nadiren yanlış pozitif sonuçlar gözlemlenebilir. Bu yüzden pozitif sonuçların kültürel yöntemle doğrulanması tavsiye edilir.

SIK KULLANILAN REAL-TİME PCR CİHAZLARI

- ABI 7700 (Applied Biosystems)
- Applied Biosystems® 7500 fast systems
- Roche Light Cycler
- BioRad I-Cycler IQ
- Corbett Research Rotor-Gene 3000
- Stratagene

En çok bilinenleri bunlar olmakla birlikte başka özelliklere sahip birçok Real-Time PCR cihazı ticari olarak elde edilebilir.

2.4. Çikolata ve Sıtlı Kremalı Keklerde Patojen Bakteri Riski

ÇİKOLATA

Çikolata üretiminde birçok hammadde ve katkı maddeleri kullanılır. Başlıca kakao, kakao tozu, süt tozu, şeker, lesitin gibi maddelerden meydana gelmektedir ve yapısı gereği mevcut nutrientler, asidite değeri, su aktivitesi,

redoks potansiyeli vb. antimikrobiyal ajanlardan dolayı mikroorganizmalar için oldukça kısıtlı bir ortamdır. Bu yüzden çikolataya mikroorganizmalar büyük oranda hammaddeden ya da üretim esnasında bulaşmaktadır. Özellikle hammadde ve katkı maddelerinin saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Bunlar, birçok patojen ve indikatör mikroorganizmayı içerebilmekte ve son ürüne kadar geçebilmektedir (Speck, 1976; Anon, 1980; Yıldırım, 1998). Bir diğer önemli kontaminasyon kaynağı üretimde kullanılan alet-ekipman ve üretimde çalışan personeldir. En çok gözlenenler *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* ve *Salmonella*'dır. Bu mikroorganizmalar arasında en fazla *Salmonella* türleri enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Çikolatadaki mikroorganizmalar arasında kseroofilik küfler ve osmofilik mayalar düşük su aktivitesine olan dayanıklılarından dolayı bakterilerden daha ön plana çıkmaktadırlar (Sinel, 1980; Troller, 1983). Bakterilerden ise *Shigella*, *Klebsiella* ve *Salmonella* düşük nem düzeyine olan toleranslarından dolayı çikolatada öne çıkan risk oluşturduğu belirtilmektedir (Anon, 1980; Meursing, 1983).

Çikolatanın temel hammaddesi olan kakao tanesi fermantasyon işleminden geçtiği için yapısında doğal olarak mikroorganizma barındırabilir (Meursing, 1983; Minifie, 1979).

Bozulma yapan mikroorganizmaların gelişmesiyle birlikte çikolatada istenmeyen tat, koku, kırılma ve kabarma gibi belirtilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Söz konusu bozulmaya üretimde kullanılan yağların lipolitik mikroorganizmaların hidrolizasyonu ile meydana gelebileceği gibi normal ve osmofilik mayalar, *Bacillus* suşları, *Laktobacil* mikroorganizmaların meydana getirdiği alkolik fermantasyonlar sonucunda da meydana gelebilmektedir. Patojen bakteriler ise üründe değişiklik yapmaz fakat insan sağlığı açısından önemli risk teşkil ederler (Speck, 1976; Topal, 1991).

Çikolata, çikolata tozu ve kakao tozu için bildirilen mikrobiyolojik muayene kriterleri; toplam mezofilik aerobik bakteri, *Enterobacteriaceae*, *S.aureus*, *Salmonella*, küf-mayalar ile termofilik sporlu basillerdir (Less et al., 1973).

Kakao ve çikolatalı ürünlerde mikrobiyal bozulmalar çok görülmemektedir. Literatürlerde çikolata kaynaklı gıda zehirlenmesi de çok azdır.

En dikkat çeken olay, 1973 yılında bildirilen Kanada’ da üretilip USA’ a ithal edilen çikolataları tüketen 79 kişide *Salmonellosis* vakasıdır. Etken *Salmonella eastborne* olarak teşhis edilmiş ve kaynağı olarak da kontamine hammadde ve ingredientler ile üretimdeki ekipman ve çalışan personel olarak bildirilmiştir (Speck, 1976). Çikolata yapımı sırasında ilave edilen süt ve şekerde bulunan *Salmonella* yeterli ısısal işlemler uygulanmadığı için tamamen yok edilememektedir. Birçok çalışmada *Salmonella* türlerinin kakao tanecikleri içinde 60°C’ de canlı kalabildiği gösterilmiştir.

Çikolatanın yapımında kullanılan hammaddelerin mikrobiyolojik kalitesinin dikkat edilmeli, üretim sırasında gerekli hijyen kurallarına uyulmalı, taşıma ve depolamada gerekli özenin gösterilmesi insan sağlığı açısından önemlidir.

SÜTLÜ-KREMALI KEKLER

Sütlü kremalı kekler de ürün iki dilim kek arasında sütlü kremanın bileşmesi ile meydana getirilmektedir. Sade ve üzeri çikolata kaplı olmak üzere iki çeşit şeklinde üretilmektedir. İçeriğindeki krema gibi mikrobiyal açıdan riskli bir ürün barındırması ve soğuk olarak tüketilmesi gerekli olduğundan kullanılan hammadde kalitesi ve üretim prosesi sırasında maruz kaldığı riskler, ürünün mikrobiyal kalitesi için çok önemlidir.

Ürünün kek kısmı uygulanan pişirme işleminden dolayı mikrobiyel yükleri önemli ölçüde azalır ve büyük sorunlar oluşturmazken krema kısmı risk grubunu teşkil etmektedir. Krema, besin maddeleri yönünden zengin bileşimleri, uygun pH ve su aktivitesi değerleri ile birçok patojen mikroorganizmanın gelişimi için ideal bir ortam niteliğindedir (G'enigeorgis, 1989; Notermans et al., 1984). Sütlü-kremalı kekin yapımında krema pastörizasyon işleminden sonra üretimde kullanıldığından patojen bakteri mevcudiyeti beklenemez fakat kremalı ürün oldukça elverişli yüzeyel bir yapıya sahiptir ve üretim aşamasında kullanılan hammadde, personel, üretim yeri koşullarından kaynaklı kontaminasyona çok elverişlidir.

Krema ve ürünleri için bildirilen mikrobiyolojik muayene kriterleri; Maya ve küf *Enterobacteriaceae*, *S.aureus*, *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes*’ dir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2009). Tartlar ve yaş pastalar için ise; Maya ve

küf, *S.aureus*, *E.coli*, *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes*' dir. Çalışmada incelediğimiz sütlü-kremalı kekler her iki grubuda içermektedir.

2.4.1. Hammadde kaynaklı riskler ve tespiti

Çikolatanın yapımında kullanılan hammaddelerin mikrobiyolojik kalitesi çok önemlidir. Çikolata üretim aşaması esnasında yüksek ısılarla maruz kalmaz bu yüzden hammaddeler mikroorganizmaların en önemli kontaminasyon kaynağını oluşturmaktadırlar.

Bu çalışmada kullanılan çikolatanın (kakaolu fındık kreması) hammaddeleri; yağı azaltılmış kakao tozu, bitkisel yağ (palm), şeker, yağsız süt tozu, peynir altı suyu tozudur. Emülgatör olarak lesitin (soya), aroma verici olarak ise vanilin kullanılmaktadır. Bunların içerisinde yağ ve şeker yapısı gereği patojen mikroorganizma içermezler. Doğal mikroflorası bile yok denecek kadar azdır. Kullanılan hammaddeler içerisinde risk teşkil edenler; kakao, yağsız süt tozu, peynir altı suyu tozu ve lesitindir.

Sütlü kremalı kekler taze olarak satışa sunulan, soğuk olarak muhafaza edilmesi ve tüketilmesi tavsiye edilen ürünlerdir. Bu yüzden yapımında kullanılan hammaddelerin mikrobiyolojik kalitesi çok önemlidir.

Bu çalışmada kullanılan sütlü kremalı keklerin hammaddeleri; pastörize edilmiş süt, bitkisel yağ (palm), şeker, tam yağlı süt tozu, buğday unu, sıvı yumurta, bal, yağsız süt tozu, yağı azaltılmış kakao tozu, buğday kepeğidir. Çikolata kaplı sütlü kremalı kek için ilave olarak bitter çikolata kullanılmaktadır.

Üretim tesisinde açıklanan bu hammaddelerin her lotta örnek alma talimatlarına uygun olarak hazırlanan kompozit numunelerle, hammaddenin çeşidine göre risk teşkil eden patojen bakteri yönünden analizleri yapılmaktadır. Bunun yanı sıra çevre kontrol prosedüründe belirtilen sıklıklarda, hammaddelerin depolandığı alanlarda, hava ve yerlerden alınan örnekler patojen bakteri yönünden incelenerek hammadde kaynaklı riskler en aza indirgenmektedir.

KAKAO TOZU

Olgunlaşan kakao meyveleri toplandıktan sonra sırasıyla fermentasyon, kurutma, kavurma, çekirdeklerin kırılması ve kabuklar ayrılması ile elde edilen çekirdek parçalarının değirmenlerde öğütülmesi ile kakao tozu elde edilir.

Kakao tanesi fermentasyon işleminden geçtiği için yapısında doğal olarak mikroorganizma barındırabilir. Patojen bakteri riski ise kakao tanesi elde edilmesi sırasında geçirilen kurutma ve kavurma işlemlerinden ve su aktivitesinin çok düşük olmasından dolayı oldukça azdır.

Pearson ve Marth sütlü çikolata yapımında kullanılan kakao tozunun mikroflorasının muhtemelen fermentasyon sonrası kontaminasyondan kaynaklanan bacillus ve micrococcus türlerini içerdiğini saptamışlardır (Pearson and Marth, 1990).

Kakao tozu üzerine yapılan bakteriolojik bir araştırmada *Salmonella*' ların negatif/100 g' da olması gerektiği vurgulanmaktadır (Meursing, 1983).

YAĞSIZ/TAM YAĞLI SÜT TOZU

Tam yağlı, kısmen veya tamamen yağı alınmış sütün suyunun uçurulmasıyla elde edilen, süt kuru maddesinin meydana getirdiği beyaz bir toz karışım. Silindir ya da püskürtme metoduyla elde edilebilmektedir. İşlem sırasında yüksek sıcaklıkta su buharı ya da sıcak hava akımı kullanılmaktadır.

Uygulanan ısı işlemler ve nem değerinin çok düşük olması nedeniyle mikroorganizma için uygun ortamlar ortadan kalmış olsada gerek sütün yapısında mevcut olan karbonhidrat, yağ, vitamin ve mineraller bakımından gerekse de süt tozu elde edilmesi esnasında işlem basamakları arasında gerçekleşen soğutma ve kullanılan malzemede meydana gelen kontaminasyon yüzünden yüksek mikroorganizma riski teşkil etmektedir.

El-Sharoud ve ark. Mısır' da yaptıkları bir çalışmada 37 adet yağsız süt tozu numunesinin 5 adedinde *C.sakazakii* pozitif olarak tespit etmişlerdir (El-Sharoud et al., 2009).

Kandhai ve ark. İsviçre' de dört ayrı süt tozu fabrikasında gerçekleştirdikleri çalışmalarında toplam 68 adet numunenin 14' ünde *C.sakazakii* pozitif olarak tespit etmişlerdir (Kandhai et al., 2004).

Muytjens ve ark. (1983) ve Muytjens, van Der Ros-van de Repe, ve van Druten (1984) tarafından yapılan çalışmalarda yeni doğanlarda, süt tozu ve kullanılan ekipman kaynaklı *C.sakazakii* enfeksiyonu rapor edilmiştir. Toplam 35 ülkede 141 örneğin 20' sinden *C.sakazakii* izole etmişlerdir (Muytjens et al., 1988).

Craven ve ark. Avustralyada 5 süt tozu fabrikasında Kasım 2006-Mart 2007 tarihleri arasında yapmış oldukları çalışmada, 100 farklı lokasyondan alınan 126 örneğin 49 adedinde *C.sakazakii* izole etmişlerdir (Craven et al., 2010).

Jacobs ve ark. Almanyada süt tozu fabrikasında dört yıl boyunca (2005-2009) yürüttükleri çalışmada çevre ve final üründe yapmış oldukları analizlerde 81 adet *C.sakazakii* izole etmişlerdir (Jacobs et al., 2011).

Licari and Potter (1970) , Jung and Beuchat (1999) yapmış oldukları çalışmalarda yağsız süt tozunda *Salmonella* spp. tespit etmişlerdir.

PEYNİR ALTI SUYU TOZU

Peynir altı suyu (whey) tozu, peynir oluşumu sırasında, çöktelden süzülerek elde edilen sıvının ısıtılıp işlemlerle toz haline getirilmesinden elde edilir.

Peynir altı suyu tozu içeriğindeki süt şekeri laktoz ve serum proteinlerince zengin gıda olması nedeniyle mikroorganizmalar içinde uygun bir ortamdır. Üretim aşamasında kullanılan malzeme ve ekipmanlar kontaminasyona açısından risk teşkil eder.

LESİTİN

Çikolatalarda karıştırıcı (emülgatör) olarak kullanılır ve kakao ile kakao yağının birbirinden ayrılmasını önler ve soya fasulyesinden elde edilir.

Kanada' da bir çikolata fabrikasında soya lesitinlerinin *Salmonella* ile kontamine olması sonucu ürünler geri çağırılmıştır ve ürünlerin tüketilmesinden kaynaklı herhangi bir hastalık bildirilmemiştir (PHAC, 2006; Reynolds, 2006).

PASTÖRİZE SÜT

Pastörize süt, sütün 63 derecede 30 dakika ya da 72 derecede 15 saniye işlem görmesi ile içindeki zararlı mikroorganizmaların öldürülmesi ile elde edilen süt ürünüdür.

Sütte bulunan protein, mineral maddeler ve vitaminler organizma tarafından kolayca alınabilecek ve sindirilebilecek şekilde olup, organizmanın gelişebilmesi için gerekli organik ve anorganik maddeleri içerir. Bu yüzden mikroroganimalar için süt mükemmel bir besin ortamı oluşturmaktadır (Kıvanç, 1992).

Listeria' lar düşük pH' ya, sıcaklığa, tuza, toleranslı olmaları ve buzdolabı sıcaklığında üreyebilmeleri nedeniyle günümüzde süt endüstrisi için risk teşkil eder. *L.monocytogenes*' in bugüne kadar çiğ ve pastörize sütlerden izolasyonu yapılmıştır (Demirci, 2000).

Süt işletmelerindeki süt toplama tanklarından alınan örneklerde *L.monocytogenes* varlığının araştırıldığı çeşitli çalışmalara göre; Hollanda' da Beckers ve ark. (1987) yaptığı çalışmada %4.4, İskoçya' da Fenlon ve ark. (1979) yaptığı çalışmada %3.8, Kuzey İrlanda' da Harvey ve ark. (1992) yaptığı çalışmada %5.3, İngiltere' de Greenwood ve ark. (1991) yaptığı çalışmada %3.6, Fransa' da Bastian ve ark. yaptığı çalışmada %1.2 oranında *L.monocytogenes* ile kontamine olduğu ortaya konmuştur. Steele ve ark., Ontario' da yaptıkları çalışmada 1720 çiğ süt örneklerinin 47 (%2,73)' sinde *L.monocytogenes* izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Özkaya, 2010; Üzüm, 2006).

Yapılan birçok çalışmada süt kaynaklı salmonelloz vakası rapor edilmiştir. Ontario' da yapılan bir çalışmada 1720 çiğ süt örneği çalışılmış ve test edilen örneklerin %0,17' sinde *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S.thompson*, *S. muenster*) izole edilmiştir (Steele, 1997). Jayaro ve Henning, Güney Dakota' da yaptıkları çalışmada, 131 süt örneğinin %4,6' sından *Salmonella* izole ettiklerini bildirmişlerdir (Jayaro, 2001). Avrupa ülkelerinde 1977-1984 yılları arasında görülen salmonellozis salgınlarının %4,5' i çiğ süttten kaynaklandığı rapor edilmiştir (Beckers, 1987).

Bu bulgular dahilinde, sütte mikroorganizmaların kontaminasyonunun en aza indirilmesi için kötü sanitasyon koşullarının, yetersiz veya yanlış pastörizasyon uygulamaları, pişirme ve pastörizasyon sonrası tekrar bulaşmanın önlenmesi gerekmektedir (Akçelik, 2000).

BUĞDAY UNU

Buğday çekirdeklerinin öğütülmesiyle elde edilen üründür. Türk Gıda Kodeksi Buğday Unu Tebliği'nde (2013/9) buğday unu; kum, toprak, taş ve metal gibi inorganik ve hayvan, bitki ve böcek kalıntıları gibi organik yabancı maddelerden temizlenmiş buğdayın tekniğine uygun olarak hijyenik şartlarda öğütülmesiyle elde edilen ve yabancı tat, koku ve madde içermeyen, kendine özgü renk ve görünüşe sahip un olarak tanımlanmış. İçeriğinde %80 karbonhidrat olmak üzere protein, yağ, B vitamini, çinko, kalsiyum, folik asit, demir, fosfor, magnezyum, potasyum, az miktarda sodyum ve diğer geçiş elementlerini içerir.

Un güvenliğini tehlikeye atan en önemli biyolojik risklerden biri mikroorganizmalardır. Tahıllar; üretim, hasat ve nakliye koşulları gereği mikroorganizma kontaminasyonuna oldukça açık ürünlerdir. Bu kontaminasyonlar nedeniyle tahılların üzerinde önemli miktarda bakteri, maya ve küf yükü bulunmaktadır. Bakteri ve mayalara kıyasla küfler, fizyolojileri gereği düşük su aktivitesi ve sıcaklık şartlarında gelişebildikleri ve ısıl direnci yüksek tehlikeli mikotoksinler oluşturabildikleri için un güvenliği üzerinde daha önemli riskler oluşturmaktadır. Patojen bakterilerden *Salmonella* spp. riski yönünden incelenmelidir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2009).

1989' da toplam 4796 adet farklı çeşitlerdeki un örneklerinde ortalama *E.coli* ve *Salmonella* spp. da sırasıyla %12.8 (N = 3350) ve %1.32 (N = 3040) olarak tespit edilmiştir (Richter et al., 1993). Avustralya ve Kuzey Amerika' da yapılan anket sonuçlarına göre buğday ununda *Salmonella* spp. kontaminasyonu prevalansı %0,0-1,3 arasında olduğu kaydedilmiştir. Yeni Zelanda' da meydana gelen salgında unda yapılan analizlerde çok az konsantrasyonda *Salmonella* spp. tespit edilmiştir (Lake et al., 2010).

YUMURTA

Yumurta, insan gıdası olarak tüketilen, sindirimi kolay, biyolojik açıdan değerli, yüksek kaliteli protein kaynağı olan besindir.

Uygun olmayan koşullarda üretilen, depolanan ve taşınan yumurtaların mikroorganizmaların üreyip gelişebilmeleri için mükemmel bir besiyeri olması nedeniyle halk sağlığı açısından bazı riskler bulunmaktadır. Sağlıklı tavukların

yumurtladığı andaki yumurtanın taze, içi ve dışının genellikle %90' ının steril olduğu kabul edilmektedir. Ancak, yumurta kümeste fekal meteryal, alet, ekipman, çevre vb. etkişi ile ya da kabukta meydana gelen çatlama sonucunda çok farklı mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir.

İnsanlarda Salmonelloz için en önemli kaynak yumurta ve yumurta ürünleri kabul edilir (EFSA, 2005). Bir yumurtanın *Salmonella* ile enfeksiyonu için iki yol vardır; yumurtanın iç yumurta oluşumu sırasında enfekte tavuktan kontamine olması ya da yumurta yüzeyinin enfekte tavuk dışkısından enfekte olmasıdır (De Reu et al., 2006). *Salmonella* yumurta kabuğundan yumurtanın iç kısımlarına doğru nüfus edebilir (Baker, 1990; De Reu et al., 2006).

2011 yılında Almanya Salmonelloz vakalarında %45 inin kaynağı *Salmonella enteritidis* olarak rapor edilmiştir (Robert Koch Institut (RKI), 2012). Birçok ülkede yapılan araştırmada, depolama ile ilgili değişiklikler sonucu yumurta başına >50 *Salmonella enteritidis* kontaminasyonu gözlenmiştir (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, 2001).

Sofralık yumurtalarda soğuk alanlarda muhafaza yöntemi *Salmonella* spp. gibi patojenlerin önlenmesi için tavsiye edilmektedir (EFSA, 2005). Gıda yönetmeliğine (EC- No. 853/2004/ Regulation, 2004) göre yumurtalar hijyen için en garanti olan sıcaklıkta muhafaza ve transfer edilmelidir. Alman mevzuatına göre yumurta, yumurtlamadan sonra 18 gün boyunca 5-8°C' de muhafaza edilmelidir (Animal food hygiene regulation (Tier-LMHV), 2007). Yumurtalarda raf ömrü yumurtlamadan sonraki 28 gündür (EC- No.589/2008/ Regulation, 2008).

BUĞDAY KEPEĞİ

Tahıl tanelerinin en dış kısmını oluşturan kabuğa verilen addır. Öğütülen tahıllar elekten geçirildiğinde elek üzerinde kalan pul şeklindeki kabuk deridir.

Patojen bakterilerden *Salmonella* spp. riski yönünden incelenmelidir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2009).

2.4.2. Üretim esnasında ve sonrasındaki riskler ve tespiti

Gıdaların üretimi sırasında hammaddeden sonra ikincil önemli mikroorganizma kontaminasyon kaynağı üretim esnasında meydana gelmektedir. Bu yüzden üretim esnasında yarı ürünlerin analiz edilmesi, sorun olması durumunda erken müdahale edilmesine ve tehlike büyümeden önlenmesine imkan tanır. Son olarak da ürünün final hali analiz edilerek riskler en aza indirgenmiş olur.

Çikolata sürekli bir proses olduğundan yarı ürün olarak sadece, içerisine katılan kavrulmuş fındık ezmesi düşünülebilir. Final üründe elde edilen kakaolu fındık ezmesi, risk teşkil eden *Salmonella* spp. patojen bakteri yönünden analiz edilmiştir. (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2009).

Sütlü kremalı kekler için yarı ürün kek ve kremadan oluşmaktadır. Fakat kek yüksek sıcaklıkta pişirildiğinden, kremada pastörize edildiğinden risk olarak görülmemekte ve sadece final üründe risk teşkil eden *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes* patojen bakteri yönünden analiz edilmiştir (Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, 2009).

Tesiste üretim esnasında kontaminasyonu en aza indirmek ve riskleri ortadan kaldırmak için kullanılan ekipmanların ve personelin hijyenine dikkat edilmektedir. Sütlü kremalı keklerin üretimi clean room/temiz oda (18°C) adı verilen bölgede gerçekleştirilirken, çikolata ise tamamen kapalı sistemle yapılmakta ve bu alanlarda çevre kontrol prosedüründe belirtilen sıklıklarda hijyen kontrolleri gerçekleştirilmektedir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1. Çalışma materyali

Bu çalışmada, 01.11.2013-30.04.2014 tarihleri arasında bir gıda üretim tesisinde üretilen çikolata (kakaolu fındık ezmesi) ve sütlü- kremalı keklerin; hammadde, yarı ürün ve son ürün halleri materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler aseptik koşullarda ve soğuk zincir altında (sütlü-kremalı kek final hali, yumurta, süt gibi ürünlerde) laboratuvara getirilmiş ve analize alınmıştır.

3.1.2. Cihaz ve ekipmanlar

Otoklav

Real-time PCR cihazı

Etüv (37 °C, 25°C ve 44°C' ye ayarlı)

3.1.3. Kullanılan besiyerleri

Besiyeri 1: Buffered Peptone Water

Pepton (kazein)	10,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1,5 g
Di-sodyum hidrojenfosfat dodekahidrat	9,0 g
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 1.07228.5000) 25.5 gramı 1 litre distile suda çözülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu besiyeri *Salmonella* ve *C.sakazakii* ön zenginleştirmesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Fraser Broth Base

Proteaz pepton	5,0 g
Trypton	5,0 g
‘Lab-Lemco’ powder	5,0 g
Sodyum klorid	20,0 g
Yeast extract	5,0 g
Di-sodyum hidrojen fosfat	12,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1,35 g
Esculin	1,0 g
Lityum klorid	3,0 g
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Oxoid CM0895) 129 gramı 2,25 litre distile suda çözülmüş, 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Yaklaşık 50°C’ ye soğutulduktan sonra 1 vial Half Fraser Selective Supplement (Oxoid SR0166G) aseptik koşullarda ilave edilerek karıştırılmıştır. Besiyeri *L.monocytogenes* ön zenginleştirmesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) Broth

Et ekstraktı	4,3 g
Pepton (kazein)	8,6 g
Sodyum klorid	2,6 g
Kalsiyum karbonat	38,7 g

Sodyum tiyosülfat susuz	30,5 g
Ox bile	4,78 g
Brillant green	0,0096 g
Novobiocin	0,040 g
Potasyum iyodin	5,0 g
İyodin	4,0 g
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen hazır besiyerine (Biomérieux AEB121609) (10 ml), BPW' da 16-20 saat ön zenginleştirmesi tamamlanmış örnekten 1 ml aktarılmış ve $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 ± 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Besiyeri 4 : Brain Hearth Infusion Broth (BHI)

Nutrient Supusturat (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar)	27,5 g
D(+) Glucose	2,0 g
NaCl	5,0 g
Na_2HPO_4	2,5 g

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 1.10493.0500) 37 gramı 1 litre distile suda çözündürülmüş ve tüplere 9 ml' e aktarıldıktan sonra 121°C ' de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri genel sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 5: Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar

Maya ekstraktı	3,0 g
NaCl	5,0 g

D(+) Ksiloz	3,75 g
Laktoz	7,5 g
Sükroz	7,5 g
L(+) lizin	5,0 g
Sodyum deoksikolat	1,0 g
Sodyum tiyosülfat	6,8 g
Amonyum demir (III) sitrat	0,8 g
Fenol red	0,08 g
Agar-agar	14,5 g
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 1.05287.0500) 55,0 gramı 50 mL damıtık su içine ilave edilip, karıştırıldıktan sonra üzerine 950 mL damıtık su eklenmiştir. Topaklanma olmadığından emin oluncaya kadar iyice karıştırılmıştır. Sonra agar eriyinceye kadar kaynar su banyosunda tutulmuştur. Besiyeri otoklavlanmadığı için kaynayan suda ısıtılarak steril edilmiştir. Yaklaşık 45-50°C' a soğutulup steril petri kutularına 12,5' er mL aktarılmıştır. Besiyeri *Salmonella* spp.' nin ayırt edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 6 : Brilliant Green Phenol Red Lactose Agar (BPLS)

Pepton (et)	7,0 gr
NaCl	5,0 gr
Laktoz	15,0 gr
Fenol red	0,04 gr

Brillant green	0,005 gr
Agar-agar	13 gr
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 1.07236.0500) 40 gramı 1 litre distile suda çözülmüştür. 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Yaklaşık 50°C' ye soğutulduktan sonra 12,5' er ml steril petrilere aktarılmıştır. Besiyeri *Salmonella spp.*' nin ayırt edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 7 : Enterobacter Sakazakii Agar (ESIA)

Pepton	6,0 g
Sodyum kloride	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,0 g
Laktoz	10,0 g
Sükroz	10,0 g
Fenol red	0,08 g
Brilliant green	0,0125 g
Agar-agar	12,0 g
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 100873.0500) 24,6 gramı 1 litre distile su içinde eritilmiş ve otoklavda 121°C' da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrasında 45-50°C' ye soğutulduktan sonra 15' er ml steril petrilere aktarılmıştır. Besiyeri *Cronobacter sakazakii*' nin ayırt edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Rapid *L.mono* Agar

Pepton	30g
Et ekstraktı	5g
Maya ekstraktı	1g
Lityum kloride	9g
Ksiloz	10g
Fenol Red	0.12g
Agar	13g
Kromojenik solüsyon	1ml
Selektive solüsyon	20 ml
Distile su	1000 ml

Ticari olarak elde edilen hazır besiyeri (Biorad 3563694) direk olarak kullanılmıştır. Besiyeri *Listeria monocytogenes*' in ayırt edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 9 : Nutrient Agar

Pepton (et)	5,0 g
Maya ekstraktı	3,0 g
Agar agar	12,0 g
Distile su	1 litre

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 1.05450.0500) 20,0 gramı 1 litre distile su içinde eritilmiş ve otoklavda 121°C' da 15 dakika sterilize

edilmiştir. Otoklav sonrasında 45-50°C' ye soğutulduktan sonra 12,5' er ml steril petrilere aktarılmıştır. Besiyeri genel katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 10 : Tryptic Soy Agar (TSA)

Pepton (kazein)	15,0 g
Peptone (soymeal)	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g

Ticari olarak elde edilen besiyerinin (Merck 1.05458.0500), 40,0 gramı 1 litre distile su içinde eritilmiş ve otoklavda 121°C' da 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklav sonrasında 45-50°C' ye soğutulduktan sonra 12,5' er ml steril petrilere aktarılmıştır. Besiyeri genel katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Real-Time PCR ile *Salmonella spp.* analizi

3.2.1.1. Ön zenginleştirme

Zenginleştirme için Çizelge 3.1' de belirtilen farklı miktarlardaki örnekler 1:9 (g/ml) oranında BPW ilave edilerek 37°C' de 16-20 saat inkübe edilmiştir.

Yumurta örneklerinde PCR' da daha iyi sonuç elde edebilmek için, BPW' da ön zenginleştirilmesi tamamlanmış örneklerden 1 ml alınıp 9 ml BHI içeren tüplere aktarılmış ve 37°C' de 3 saat daha inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.1. *Salmonella spp.* için numune ve 1:9 oranındaki BPW miktarları

Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	BPW Miktarı ml	Metot
Çikolata ham maddesi	Yağsız süt tozu	750 g	6750 ml	BAM/FDA Chapter 5
	Peynir altı suyu tozu	750 g	6750 ml	
	Lesitin (soya)	250 g	2250 ml	
Çikolata yarı ürün	Fındık ezmesi	250 g	2250 ml	Laboratuvar içi metot
Çikolata son ürün	Çikolata (Kakaolu fındık kreması)	250 g	2250 ml	Laboratuvar içi metot
Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	BPW Miktarı ml	Metot
Sütlü-kremalı kek hammaddesi	Pastörize edilmiş süt	25 ml	225 ml	BAM/FDA Chapter 5
	Pastörize yumurta	125 ml	1125 ml	
	Yağsız süt tozu	750 g	6750 ml	
	Tam yağlı süt tozu %26	750 g	6750 ml	
	Buğday unu	125 g	1125 ml	
	Buğday kepeği	125 g	1125 ml	
Sütlü-kremalı kek son ürün	Sütlü-kremalı kek	750 g	6750 ml	Laboratuvar içi metot

Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	BPW Miktarı ml	Metot
Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı) hammaddesi	Pastörize edilmiş süt	25 ml	225 ml	BAM/FDA Chapter 5
	Pastörize yumurta	125 ml	1125 ml	
	Yağsız süt tozu	750 g	6750 ml	
	Tam yağlı süt tozu %26	750 g	6750 ml	
	Buğday unu	125 g	1125 ml	
	Bitter çikolata %20	750 g	6750 ml	
Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı) son ürün	Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı)	125 g	1125 ml	Laboratuvar içi metot

3.2.1.2. DNA izolasyonu

DNA İzolasyonu için Rapid Spin Sample Preparation Kit (PrepSEQ™) kullanılmıştır.

Ön zenginleştirme sonucunda elde edilen kültürlerden, falcon tüplerine 10 ml aktararak DNA izolasyonuna geçilmiştir. Bu falcon tüplerinden, içerisine spin kolon yerleştirilen ependorf tüplerine 750 µl aktarılmıştır. Tüpler 13,000 × g hızda 3 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası spin kolon ve supernatant atılmıştır. Pelletlerin üzerine 50 µl Lysis Buffer (Lizis tamponu) ekledikten sonra pipet ve vorteks yardımıyla karıştırılarak tekrar süspansiyon hale getirilmiştir. Kapaklar sıkıca kapatılıp, 95°C’ de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından tüpler oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiş ve 12,000 x g 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüplere 250 µL steril su (nuclease-

free water / nükleaz içermeyen) ilave edilmiş ve 12,000 x g 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Santrifüjün ardından reaksiyon tüpleri saflaştırılmış DNA içermektedir ve reaksiyon tüpleri bekletilmeden PCR aşamasına geçilmiştir.

3.2.1.3. Real-Time PCR prosedürü

Real-time PCR'la *Salmonella* spp. belirlenebilmesi için 'MicroSEQ® *Salmonella* spp. detection kit' Applied Biosystems firmasından ticari olarak elde edilmiş ve kullanılmıştır.

Kit içeriği:

MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit reaktifleri liyofilize haldedir ve her bir reaksiyon karışımı ; muhtemel PCR inhibüsyonlarını ayırt etmek için Internal Positive Control (IPC) Probu, *Salmonella* spp.' ye spesifik prob ve primerler, kalıp IPC, enzim, primerler ve diğer tampon bileşenleri içermektedir.

Patojen Detection Negative Control; *Salmonella* spp. negatif kontrolü olarak kullanılır.

PCR için kitin hazırlanması:

Liyofilize haldeki kit reaktiflerini içeren tüpler standa gereken sayıda yerleştirilmiştir. Her bir tüpe 30 µl örnek DNA' sı koyulmuş ve köpük yapmamasına özen göstererek pipetle aşağı yukarı hafifçe karıştırılmıştır. Negatif kontrol için ayrılan tüpe de 30 µl Negatif kontrol reaktifinden koyulmuştur.

Tüplerin ağzı optik kapak ile sıkıca kapatılmış ve Applied Biosystems 7500/7500 Fast cihazına, programın öngördüğü konumlara yerleştirilmiştir.

Sonuçların analizi:

Real-Time PCR sonuçları RapidFinder™ Express Software Version 1.1 kullanılarak analiz edilmiştir ve sonuçlar aşağıdaki tabloya göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme yapılırken amplifikasyon eğrileri de dikkate alınmıştır.

 Positive Result	Pozitif sonuç
 Negative Result	Negatif sonuç
 Result Warning	Hatalı sonuç sinyali / geçersiz sonuç
 Negative Control	Negatif kontrol çalışmış
 Control Warning	Hatalı negatif kontrol sinyali / geçersiz sonuç

Pozitif sonuç veren örneklerde sonuçlar kültürel ve biyokimyasal testler ile doğrulanmıştır. Hatalı sonuç sinyali görülen örneklerde, hatanın numune yapısı ya da pipetleme gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülerek PCR analizi tekrar edilmiş ve kültürel test ile doğrulanmıştır. Hatalı negatif kontrol sinyali veren örneklerde hatalı uygulama ya da negatif kontrolün çalışmadığı düşünülerek PCR analizi tekrar edilmiştir.

3.2.1.4. Doğrulama

PCR’ da *Salmonella* spp. pozitif olan ya da hatalı sonuç sinyali (Result Warning) veren örnekler, kültürel ve biyokimyasal testler ile doğrulanmıştır.

1. Ön zenginleştirme

DNA izolasyonu için hazırlanan ön zenginleştirme ortamı direk olarak kullanılmıştır.

2. Seçici zenginleştirme

Ön zenginleştirme tamamlanmış ortamdan 1 ml alınıp, 10 ml MKTT içeren tüplere aktarılmıştır ve 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir.

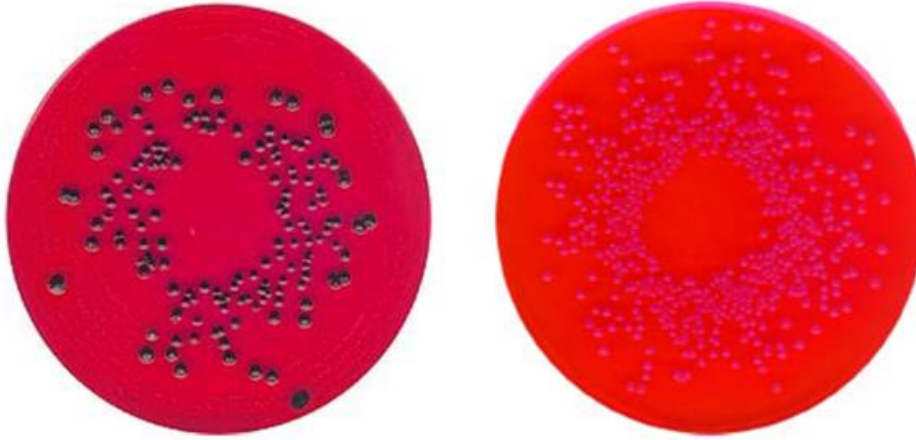
3. Ayırt edici besiyerlerine ekim

Her bir tüpten XLD agar ve BPL agara ekim yapılmış ve petriler 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından şüpheli görülen kolonilere Api Testi uygulanmıştır.

4. Biyokimyasal testler:

XLD ve BPL Agar besiyerinde görülen şüpheli kolonilere (Bkz. Şekil 3.1) API 20E hızlı test kiti uygulanmıştır.

Testin Prensipleri: API 20E stribi dehidrate substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Bu testler ortamın yeniden hazırlanmasını sağlayan bir bakteriyal süspansiyon ile inoküle edilir. İnkübasyon sırasında, metabolizma sonucu spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle renk değişimi oluşmaktadır.



Şekil 3.1.

Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)
agarda *Salmonella enteritidis* NCTC
5188

(http://www.merckmillipore.com/chemicals/xld-agar/MDA_CHEM-11052870500/p_uuid)

Brilliant Green Phenol Red Lactose
(BPLS) agarda *Salmonella typhimurium*
ATCC 14028

(http://www.merckmillipore.com/chemicals/bpls-agar-modified/MDA_CHEM-1107470500/p_NQsb.s1LuXcAAAEWUeEfVhTI)

Kit içeriği:

-25 API 20 E stripleri

-25 İnkübasyon kutusu

-25 Sonuç kağıtları

API 20 E Stribinde ki biyokimyasal testler:

2-nitrofenil-βD-galaktopiranozid, L-arjinin, L-lizin, L-ornithin, trisodium sitrat, sodium thiosülfat, üre, L-triptofan, L- triptofan(indole üretimi), sodium pirüvat, jelatin, D-glikoz, D-mannitol, inositol, D-sorbitol, L-rhamnoz, D-sukroz, D-melibioz, amygdalin, L-arabinoz, oksidazdır.

Testin hazırlanması:

-Şüpheli beş adet koloni seçilerek Nutrient Agara çizgi ekim yapılmış ve 37°C' de 24 saat inkübe edilerek taze kültürler (18-24 saat) elde edilmiştir.

-Kültürler öze yardımı ile alınmış ve %0,85' lik fizyolojik tuzlu su (5 ml) içinde homojenize edilerek test gözeneklerine aşılanmıştır.

-İnkübasyon kutusu kapatılıp, 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir.

Stribin okunması ve değerlendirilmesi:

-İnkübasyon süresinden sonra, strip okuma tablosuna göre okunmuştur (Bkz. Şekil 3.2).

-Sonuçlar <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/ident/index.jsp> sitesinde yer alan yazılıma göre değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. API 20E test kitindeki tipik *Salmonella enteritidis* reaksiyonları

3.2.2. Real-Time PCR ile *Listeria monocytogenes* analizi

3.2.2.1.Ön zenginleştirme:

Zenginleştirme için Çizelge 3.2’ de belirtildiği gibi 25 g örnek üzerine 225 ml HFB ilave edilerek 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.2. *L.monocytogenes* için numune ve 1:9 oranındaki BPW miktarları

Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	HFB Miktarı ml	Metot
Çikolata ham maddesi	Yağsız süt tozu	25 g	225 ml	ISO 11290-1/A1:2004 :2004-10
	Peynir altı suyu tozu	25 g	225 ml	
Çikolata yarı ürün	Fındık ezmesi	25 g	225 ml	
Çikolata son ürün	Çikolata (Kakaolu fındık kreması)	25 g	225 ml	
Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	HFB Miktarı ml	Metot
Sütlü-kremalı kek hammaddesi	Yağsız süt tozu	25 g	225 ml	ISO 11290-1/A1:2004 :2004-10
	Tam yağlı süt tozu %26	25 g	225 ml	
Sütlü-kremalı kek son ürün	Sütlü-kremalı kek	25 g	225 ml	

Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	HFB Miktarı ml	Metot
Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı) hammaddesi	Yağsız süt tozu	25 g	225 ml	ISO 11290-1/A1:2004 :2004-10
	Tam yağlı süt tozu %26	25 g	225 ml	
Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı) son ürün	Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı)	25 g	225 ml	

3.2.2.2. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Rapid Spin Bead-Beating Sample Preparation Kit (PrepSEQ™) kullanılmıştır.

Ön zenginleştirme sonucunda elde edilen kültürlerden, falcon tüplerine 10 ml aktararak DNA izolasyonuna geçilmiştir. Bu falcon tüplerinden, içerisine spin kolon yerleştirilen Zirkonyum boncuk bulunan ependorf tüplerine 750 µl aktarılmıştır. Tüpler 13,000 × g hızda 3 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası spin kolon ve supernatant atılmıştır. Tüplere 500 µL steril su ilave edilerek 3-5 saniye vorteksledikten sonra tüpler 13,000 × g hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve pelletlerin üzerine 50 µl Lysis Buffer (Lizis tamponu) ekledikten sonra pipet ve vorteks yardımıyla karıştırılarak tekrar süspansiyon hale getirilmiştir. Ardından 5 dakika boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. Çalkalama sonrası mikrosantrifüjde 12,000-14,000 × g hızda 10 saniye santrifüjledikten sonra kapaklar sıkıca kapatılıp, 95°C’ de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından tüpler oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiş ve 12,000 x g 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüplere 250 µL steril su (nuclease-free water / nükleaz içermeyen) ilave edilmiş ve 12,000 x g 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Santrifüjün ardından reaksiyon tüpleri saflaştırılmış DNA içermektedir ve reaksiyon tüpleri bekletilmeden PCR aşamasına alınmıştır.

3.2.2.3. Real-Time PCR prosedürü

Real-time PCR' la *Listeria monocytogenes* belirlenebilmesi için 'MicroSEQ® *Listeria monocytogenes* detection kit' Applied Biosystems firmasından ticari olarak elde edilmiş ve kullanılmıştır.

Kit içeriği:

MicroSEQ® *Listeria monocytogenes* Detection Kit reaktifleri liyofilize haldedir ve her bir reaksiyon karışımı ; muhtemel PCR inhibüsyonlarını ayırt etmek için İnternal Positive Control (IPC) Probu, *Listeria monocytogenes* ' e spesifik prob ve primerler, kalıp IPC, enzim, primerler ve diğer tampon bileşenleri içermektedir.

Patojen Detection Negative Control; *Listeria monocytogenes* negatif kontrolü olarak kullanılır.

PCR için kitin hazırlanması:

Liyofilize haldeki kit reaktiflerini içeren tüpler standa gereken sayıda yerleştirilmiştir. Her bir tüpe 30 µl örnek DNA' sı koyulmuş ve köpük yapmamasına özen göstererek pipetle aşağı yukarı hafifçe karıştırılmıştır. Negatif kontrol için ayrılan tüpe de 30 µl Negatif kontrol reaktifinden koyulmuştur.

Tüplerin ağzı optik kapak ile sıkıca kapatılmış ve Applied Biosystems 7500/7500 Fast cihazına, programın öngördüğü konumlara yerleştirilmiştir.

Sonuçların analizi:

Real-Time PCR sonuçları RapidFinder™ Express Software Version 1.1 kullanılarak analiz edilmiştir ve sonuçlar aşağıdaki tabloya göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme yapılırken amplifikasyon eğrileride dikkate alınmıştır.

 Positive Result	Pozitif sonuç
 Negative Result	Negatif sonuç

 Result Warning	Hatalı sonuç sinyali / geçersiz sonuç
 Negative Control	Negatif kontrol çalışmış
 Control Warning	Hatalı negatif kontrol sinyali / geçersiz sonuç

Pozitif sonuç veren örneklerde sonuçlar kültürel ve biyokimyasal testler ile doğrulanmıştır. Hatalı sonuç sinyali görülen örneklerde hata numunenin yapısı ya da pipetleme hatası gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülerek PCR analizi tekrar edilmiş ve kültürel test ile doğrulanmıştır. Hatalı negatif kontrol sinyali veren örneklerde hatalı uygulama ya da negatif kontrolün çalışmadığı düşünülerek PCR analizi tekrar edilmiştir.

3.2.2.4. Doğrulama

PCR da *Listeria monocytogenes* için pozitif sonuç tespit edilmemiştir. Fakat hatalı sonuç sinyali veren örnekler kültürel testler ile doğrulanmıştır.

1. Ön zenginleştirme

DNA izolasyonu için ön zenginleştirme ortamı direk olarak kullanılmıştır.

2. Seçici zenginleştirme

ISO 11290-1/A1:2004:2004-10' a göre ön zenginleştirilmesi tamamlanan örnekten Fraser Broth' a aktarılır ve 35°C-37°C' de 48±3 saat inkübe edilir.

3. Ayırt edici besiyerlerine ekim

Ticari firma talimatlarına göre ön zenginleştirilmesi tamamlanan örnekten Rapid *L.mono* agara aktarılmış, seçici zenginleştirme uygulanmamıştır. Petriler 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir.

4. Biyokimyasal Testler:

Rapid *L.mono* agarda tipik ya da şüpheli *L.monocytogenes* kolonilerine Api Listeria hızlı test kiti uygulanır fakat analiz sonuçlarında petride hiçbir üreme gözlenmediğinden bu basamak uygulanmamıştır.

3.2.3. Real-Time PCR ile *Cronobacter sakazakii* analizi

3.2.2.1.Ön zenginleştirme

Zenginleştirme için Çizelge 3.3’ de belirtilen farklı miktarlardaki örneklerle 1:9 (g/ml) oranında BPW ilave edilerek 37°C’ de 16-20 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.3. *C.sakazakii* için numune ve 1:9 oranındaki BPW miktarları

Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	BPW Miktarı ml	Metot
Çikolata ham maddesi	Yağsız süt tozu	750 g	6750 ml	ISO 22964:2006
Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	BPW Miktarı ml	Metot
Sütlü-kremalı kek hammaddesi	Yağsız süt tozu	750 g	6750 ml	ISO 22964:2006
	Tam yağlı süt tozu %26	750 g	6750 ml	

Ürün Açıklaması	Ürün İsmi	Numune Miktarı g/ml	BPW Miktarı ml	Metot
Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı) hammaddesi	Yağsız süt tozu	750 g	6750 ml	ISO 22964:2006
	Tam yağlı süt tozu %26	750 g	6750 ml	

3.2.2.2. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Rapid Spin Sample Preparation Kit (PrepSEQ™) kullanılmıştır.

Ön zenginleştirme sonucunda elde edilen kültürlerden, falcon tüplerine 10 ml aktararak DNA izolasyonuna geçilmiştir. Bu falcon tüplerinden, içerisine spin kolon yerleştirilen ependorf tüplerine 750 µl aktarılmıştır. Tüpler 13,000 × g hızda 3 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası spin kolon ve supernatant atılmıştır. Pelletlerin üzerine 50 µl Lysis Buffer (Lizis tamponu) ekledikten sonra pipet ve vorteks yardımıyla karıştırılarak tekrar süspansiyon hale getirilmiştir. Kapaklar sıkıca kapatılıp, 95°C’ de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından tüpler oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiş ve 12,000 x g 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüplere 250 µL steril su (nuclease-free water / nükleaz içermeyen) ilave edilmiş ve 12,000 x g 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Santrifüjün ardından reaksiyon tüpleri saflaştırılmış DNA içermektedir ve reaksiyon tüpleri bekletilmeden PCR aşamasına alınmıştır.

3.2.1.3. Real-Time PCR prosedürü

Real-time PCR’ la *Cronobacter sakazakii* belirlenebilmesi için ‘TaqMan® *Cronobacter sakazakii* Assay’ kiti Applied Biosystems firmasından ticari olarak elde edilmiş ve kullanılmıştır.

Kit içeriği:

TaqMan[®] *Cronobacter sakazakii* Assay Kit reaktifleri liyofilize haldedir ve her bir reaksiyon karışımı ; muhtemel PCR inhibüsyonlarını ayırt etmek için Internal Positive Control (IPC) Probu, *Cronobacter sakazakii*’ e spesifik prob ve primerler, kalıp IPC, enzim, primerler ve diğer tampon bileşenleri içermektedir.

Patojen Detection Negative Control; *Cronobacter sakazakii* negatif kontrolü olarak kullanılır.

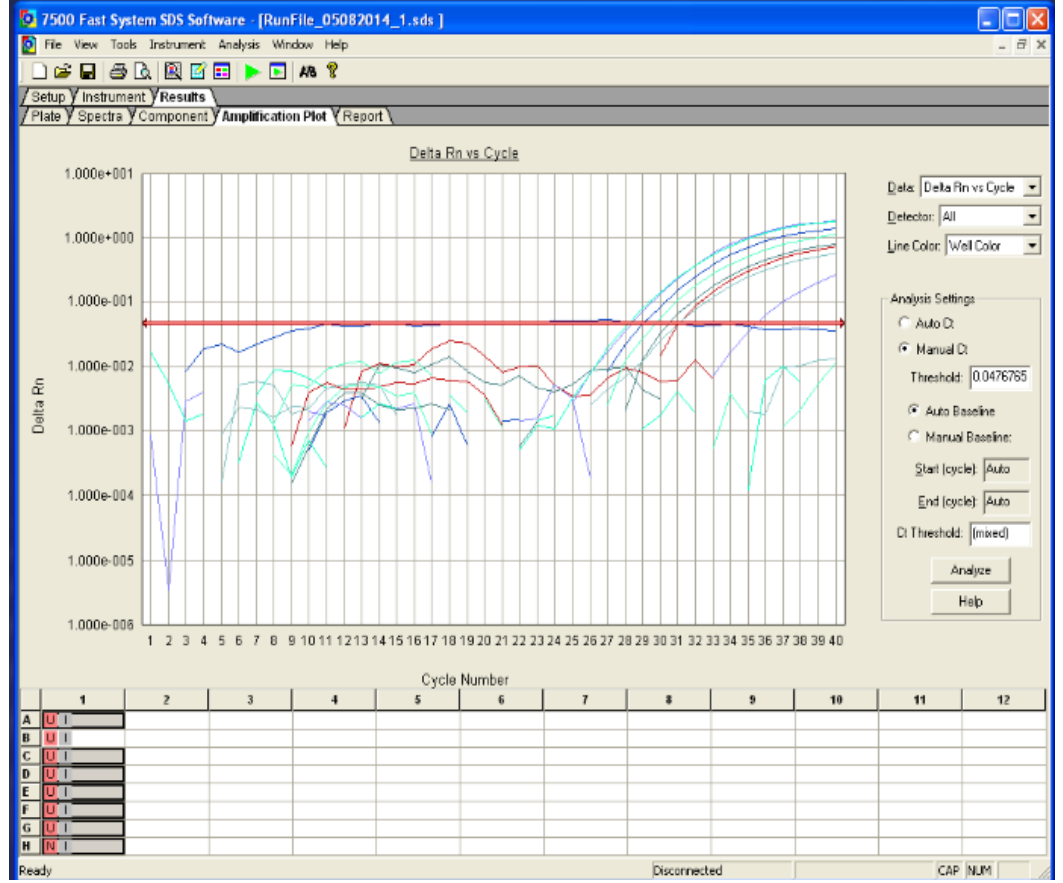
PCR için kitin hazırlanması:

Liyofilize haldeki kit reaktiflerini içeren tüpler standa gereken sayıda yerleştirilmiştir. Her bir tüpe 30 µl örnek DNA’ sı koyulmuş ve köpük yapmamasına özen göstererek pipetle aşağı yukarı hafifçe karıştırılmıştır. Negatif kontrol için ayrılan tüpe de 30 µl Negatif kontrol reaktifinden koyulmuştur. Tüplerin ağzı optik kapak ile sıkıca kapatılmış ve Applied Biosystems 7500/7500 Fast cihazına, programın öngördüğü konumlara yerleştirilmiştir.

Sonuçların analizi :

Real-Time PCR sonuçları 7500 Fast System SDS Software Version 1.4.2 kullanılarak analiz edilmiştir ve sonuçlar aşağıdaki tabloya göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme sırasında, Şekil 3.3’ te belirtildiği gibi amplifikasyon eğrileride dikkate alınmıştır.

(+)	Pozitif sonuç
(-)	Negatif sonuç
(?)	Hatalı sonuç sinyali / geçersiz sonuç



Şekil 3.3. Real-Time PCR’ da amplifikasyon eğrileri

3.2.2.4. Doğrulama

PCR’ da *Cronobacter sakazakii* için pozitif ya da hatalı sonuç sinyali veren örnek gözlemlenmediğinden kültürel ve biyokimyasal testler ile doğrulama yapılmamıştır.

ISO 22964:2006’ ya göre *Cronobacter sakazakii* analizi, kültürel ve biyokimyasal test basamakları şunlardır:

1. Ön zenginleştirme

Örnek 1: 9 oranında BPW’ da seyreltilerek $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ de 18 ± 2 saat inkübe edilir.

2. Seçici zenginleştirme

Ön zenginleştirmesi tamamlanan örnek mLST/ vancomycin aktarılır ve 44°C±0,5° de 24±2 saat inkübe edilir.

3. Ayırt edici besiyerlerine ekim

Seçici zenginleştirmesi tamamlanan örnekten *Enterobacter Sakazakii* Isolation Agara (ESIA) aktarılır ve petriler 44°C±1° de 24±2 saat inkübe edilir.

4. Biyokimyasal testler:

ISO 22964:2006' ya göre *Enterobacter Sakazakii* Isolation Agar (ESIA) da tipik kolonilerden 1-5 arası sayıda seçilerek TSA agara aktarılır ve 25°C±1° de 44-48 saat inkübe edilir.

Elde edilen 18-24 saatlik taze kültüre API 20E hızlı test kiti uygulanır.

4.BULGULAR

Çalışmanın gerçekleştirildiği üretim tesisinde 01.11.2013-30.04.2014 tarihleri arasında üretilen ürünlerin patojen bakteri analizleri real-time PCR ile gerçekleştirilmiştir.

Altı ay boyunca çikolata (kakaolu fındık ezmesi) ve sütlü-kremalı keklerin yapımında kullanılan toplam 213 hammaddede, hammaddenin çeşidine ve risk potansiyeline göre katagorize edilerek, *Salmonella* spp, *L.monocytogenes* ve *C.sakazakii* analizleri yapılmıştır. Yarı ürün kontrollerinde toplam 62 adet fındık ezmesinde *Salmonella* spp. analizleri gerçekleştirilmiştir. Final ürünlerde ise 87 adet çikolata (kakaolu fındık ezmesi) numunesinde *Salmonella* spp. analizleri yapılırken, 35 adet sütlü-kremalı kek ve 39 adet çikolata kaplı sütlü-kremalı kek numunelerinde *Salmonella* spp. ve *L.monocytogenes* analizleri yapılmıştır. Tüm numune sayıları ve sonuçlar Çizelge 4.1’ de gösterilmiştir.

Yarı ürün ve final ürünlerde hiç patojen bakteri tespit edilmemiştir. Hammaddelerden ise sadece iki ayrı lota ait pastörize yumurtada *Salmonella* spp. tespit edilmiştir. İki pozitif sonuç için yapılan doğrulamalarda sadece bir örnekte *Salmonella* spp. olduğu doğrulanırken diğer örneğin yapılan kültürel metot analiz sonuçlarına göre hatalı pozitif olduğu tespit edilmiştir. Doğrulaması yapılan yumurta numunesindeki *Salmonella*’nın *Salmonella enteritidis* olduğu anlaşılmıştır.

Çevre kontrol prosedüründe belirtilen sıklıklarda, hammaddelerin depolandığı alanlarda, hava ve yerlerden alınan örnekler patojen bakteri yönünden yapılan analizlerde negatif sonuç elde edilmiştir. Yağlı-yağsız süt tozu ve peynir altı suyu tozu hammaddelerinin depolandığı depolarda ürünlerin proses kanalına aktarımı sırasında yerlere dökülen örnekler özel vakumlu süpürge ile toplanarak gerçekleştirilen *Salmonella* spp. analizlerinde de negatif sonuç elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. 01.11.2013-30.04.2014 / 6 ay' lık patojen bakteri analiz sonuçları

Ürün Açıklaması	Ürünün ismi	Salmonella spp.				Listeria monocytogenes				Cronobacter sakazakii			
		Analiz sıklığı	Analize Al.Ür.Say.	Pozitif	%	Analiz sıklığı	Analize Al.Ür.Say.	Pozitif	%	Analiz sıklığı	Analize Al.Ür.Say.	Pozitif	%
Hammaddeler	Yağsız süt tozu	Her lotta	24	0	0	Her lotta	24	0	0	Yılda 4 kez	2	0	0
	Tam yağlı süt tozu %26	Her lotta	18	0	0	Her lotta	18	0	0	Her lotta	18	0	0
	Bitter çikolata %20	Her lotta	22	0	0	Her lotta	22	0	0				
	Pastörize edilmiş süt	Her lotta	60	0	0	Ayda 1 kez	6	0	0				
	Peynir altı suyu tozu	Her lotta	10	0	0	Yılda 4 kez	2	0	0				
	Pastörize yumurta	Her lotta	58	2	3								
	Buğday unu	Her lotta	13	0	0								
	Buğday kepeği	Ayda 1 kez	3	0	0								
	Lesitin (Soya)	Her lotta	5	0	0								
Yarı ürün	Fındık ezmesi	Her lotta	62	0	0								
Son ürün	Çikolata (kakaolu fındık ezmesi)	Her lotta	87	0	0								
	Sütlü-kremalı kek	Her lotta	35	0	0					Yılda 4 kez	2	0	0
	Sütlü-kremalı kek (çikolata kaplı)	Her lotta	39	0	0					Yılda 4 kez	2	0	0
Toplam			436	2	0,5	Toplam	76	0	0	Toplam	20	0	0

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada bir üretim tesisinde üretilen çikolata (kakaolu fındık ezmesi) ve sütlü-kremalı keklerden, hammaddeden final ürüne kadar tüm üretim aşamalarında alınan örneklerde, bu gıda maddeleri için risk potansiyeli en yüksek olan üç patojenin (*L.monocytogenes*, *C.sakazakii* ve *Salmonella* spp.) varlığı Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda yarı ürün olan fındık ezmesi ve final ürün olan çikolatada (kakaolu fındık ezmesi) *Salmonella* spp. rastlanmamıştır. Yine final ürün olan sütlü-kremalı kek ve çikolata kaplı sütlü kremalı keklerin hiçbirinde *L.monocytogenes* ve *Salmonella* spp. rastlanmamıştır.

Çikolatanın mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada *Salmonella*' ların negatif/100 g'da olması gerektiği bildirilmektedir (Minifie, 1979). Çikolatalar üzerine yapılmış bir çalışmada toplam 9 çikolata numunesi incelenmiş, 2' sinde $4,3 \times 10^1$ ve $1,0 \times 10^1$ kob/gr koliform grubu mikroorganizmalar ve birinde *E.coli* saptanmış, hiçbirinde *Salmonella* saptanmamış (Akçin, 1988). Bu sonuçlarda bizim bulgularımızla örtüşmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada yerli ve ithal orijinli 30' ar adet sütlü çikolata örnekleri mikrobiyolojik açıdan incelenmiş, yerli çikolata numunelerinde 20 numunede koliform grubu bakteri $2,8 \times 10$ kob/gr, 7 numunede *E.coli* 2 kob/gr bulunurken, ithal çikolata numunelerinde ise koliform grubu bakteriler 1.8 kob/gr, *E.coli* sayısı 1 numunede 0,33 kob/gr olarak tespit edilmiş. Numunelerin hiçbirinde *S.aureus* ve *Salmonella* tespit edilmemiştir (Lees et al., 1973).

Sütlü-kremalı kekler tamamen üretici firmaya ait olup piyasada benzeri bir ürün bulunmamaktadır. Yapısının kek ve sütlü kremadan oluşturulmasından dolayı yaş pasta ve vb. ürünlerle aynı katagoride değerlendirebiliriz. Bu bağlamda Ferron ve Michard, Belçikada 100 farklı pastaneden alınan 300 kremalı pasta örneğinin 30' unda *L.monocytogenes* tespit etmişlerdir (Ferron et al., 1993). Greenwood (1991) İngiltere ve Galler' de içlerinde kremanın da bulunduğu süt ve süt ürünlerinde *Listeria* varlığını araştırmışlardır. İncelenen 48 adet çiğ krema örneğinin 2' sinde *L.monocytogenes* varlığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada pastörize krema örneklerinde ise *Listeria* varlığına rastlanmamışlardır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ile bizimde çalışmada kullandığımız sütlü-kremalı kek ürünlerinde ki kremanın pastörize olarak kullanılması, elde edilen sonuçları doğrular niteliktedir ve pastörize krema kullanılmasının önemini vurgulamaktadır

(Özkaya, 2010). Şireli ve ark. Ankara’ da 90 adet pasta örneğini analiz etmişler ve %2.2 oranında *L.monocytogenes* tespit etmişlerdir (Şireli vd., 2000). Mersinde yapılan bir çalışmada ise farklı pastanelerden alınan 50 adet pasta örneği *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, koagülaz (+) *Staphylococcus aureus* ve *E.coli* bakımından incelenmiştir ve pasta örneklerinin hiçbirinde *Salmonella* ve *L.monocytogenes* tespit edilmemiştir (Can vd., 2011). Akgün ve ark. yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise 30 kremalı pasta örneğinin hiç birinde *Salmonella* tespit etmemişlerdir (Akgün vd., 1997). Bu bulgular bizim bulgularımızla uyum içerisindedir. Bursa’da incelenen 100 pasta örneğinin birinde *Salmonella* tespit edildiği belirtilmiştir (Yücel vd., 1992). İspanya’ da yapılan bir araştırmada, yaş pastaların mikrobiyolojik kalitesi incelenmiş ve toplam 311 örnekten; 2 tanesinde *Salmonella* ya rastladıklarını vurgulamışlardır (Pla et al., 1996).

Hammadelerden ise pastörize yumurtaya ait iki ayrı lotta Real-Time PCR ile yapılan analiz sonuçlarında *Salmonella* spp. pozitif olarak tespit edilmiştir. Pozitif sonuçlar klasik kültürel metotla doğrulamaya gidilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarında bir örneğin *Salmonella* spp. olduğu kültürel metotla doğrulanırken, diğer lotta ait örneğin kültürel metotla analizi sonucunda *Salmonella* spp. kolonisi gözlenmemiştir. Bu da bize Real- Time PCR’ da ölü hücre DNA ‘sının tespit edilmiş olduğunu düşündürmüştür. Düşük bir yüzdeyle de olsa Real-Time PCR’ da ölü hücre DNA’sı tespit edilebilmektedir. Bu yüzden tüm pozitif sonuçların kültürel metotla doğrulanması tavsiye edilir. Bu analizler sayesinde her iki lotta ait pastörize yumurtalar hiç kullanılmadan tedarikçilere iade edilmiştir. Böylece muhtemel riskler sıfırlanmıştır.

Pastörizasyon sonrası yumurtada patojen bakteriler canlı kalmaz fakat pastörizasyon sonrası işlemler sırasında kontaminasyon yaşanabilir. Yumurtanın aktarıldığı, taşıma için kullanılan tankların yeterince iyi temizlenmemiş olması ya da temizlik sonrası tankların hijyenik koşullarda bekletilmemiş olmasından kaynaklanabilir. Bunların yanı sıra dolum sırasında yapılan hatalı uygulamalar sonucunda ve personelin kaynaklı da ürün tekrar kontamine olabilir. Elde ettiğimiz sonuç, *Salmonella* spp. tespit ettiğimiz lottun bu tür hijyenik olamayan proselere maruz kaldığını bize göstermektedir.

Real-Time PCR sonucu pozitif olan fakat kültürel metotla yapılan analizler sonucunda hatalı pozitif olduğu anlaşılan örneğin ait olduğu lottun ise pastörizasyon öncesi *Salmonella* spp. ile kontamine olduğu fakat uygulanan pastörizasyon sonrasında canlı kalamadıklarını düşünebiliriz. Üretim için

kullanılan yumurtanın mikrobiyal kalitesi önemlidir. Çiğ yumurta kabuğu *Salmonella*' ların birincil kontaminasyon kaynağıdır. 1998-2002 yılları arasında 55 adet *Salmonella* zehirlenmesi vakasının kontaminasyon kaynağının yumurta kabuğu olduğu gösterilmiştir (WHO, 2005). Bu yüzden pastörizasyon öncesi kullanılan hammadde (yumurta) mikrobiyal yükünün en düşük seviyelerde tutulması, pastörizasyon sonrası ürünün kalitesini artırır.

Tek bir lotta ait örnekte hem Real-Time PCR hemde kültürel metotla tespit ettiğimiz *Salmonella* spp.' nin yapılan doğrulama analizleriyle (biyokimyasal) *Salmonella enteritidis* olduğu tespit edilmiştir. Avrupa çapında sofralık yumurtalarda en çok gözlenen serovarin *Salmonella enteritidis* olarak tespit edilmiştir (EFSA, 2007). Almanya' da 2010 yılında rapor verilerine göre sofralık yumurtalardaki tek serovar *Salmonella enteritidis* olduğu belirtilmiştir. Elde ettiğimiz bulgu bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir. *Salmonella enteritidis* yumurta kabuğuna dışkıdan ya da yumurtlama sırasında kontamine olduğu tespit edilmiştir (Gantoiset et al., 2009).

Bu çalışmada birçok kişinin özellikle de çocukların çok sık tükettikleri çikolata ve soğuk olarak muhafaza edilen sütlü-kremalı keklerin, sağlık açısından risk potansiyelleri belirtilmiştir. Tesiste üretilen çikolata (kakaolu fındık ezmesi) ve sütlü-kremalı keklerin mikrobiyolojik kaliteleri hakkında ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmaların sonuçları ile yerli ve yabancı standartlarda belirtilen değerlere göre öne çıkan üç patojen (*L.monocytogenes*, *C.sakazakii* ve *Salmonella* spp.) yönünden Real-Time PCR kullanılarak incelenmiştir.

Gıda güvenliğini yüksek oranda sağlamanın temel şartlarından birinin düşük riskli hammadde temini olduğunu elde edilen analiz sonuçları doğrulamaktadır. İnsanlarda sağlık problemi oluşturmeyen güvenli bir gıda üretimi için üretimden tüketime kadar her basamakta alınması gereken tedbirler vurgulanmıştır. Hijyen ve sanitasyonu temel alan bir sistemin uygulandığı bu üretim tesisinde gıda güvenliğinin en üst düzeyde sağlandığı yapılan çalışma ve elde edilen bulgular ile kanıtlanmıştır.

Yapılan bu çalışmayla, araştırmanın kaynağını oluşturan gıdaların tüketiminin fazla olması, tüketici profilinin ise önemli ölçüde genç tüketicilerden oluşması, üretiminde gıda güvenliğine verilmesi gereken önemi ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, M.R. and Moss, M.O.**, 1995, *Salmonella*. In : Food Microbiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 192-200p.
- Adlam, B., King, N., Lake, R., Sexton, K. and Lim, E.**, 2010, Attribution of potentially foodborne enteric diseases, human salmonellosis - an epidemiological approach, Report FW10008 for the New Zealand Food Safety Authority. Institute of Environmental Science and Research (ESR) Ltd.
- Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food**, 2001, Second Report on *Salmonella* in Eggs. London: The Stationery Office.
- Akça, D., ve Sahin, M.**, 2011, Kars yöresi sığırlarından alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Listeria* türlerinin araştırılması, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 17: 987- 993s.
- Akçelik, M., Ayhan, K. ve Çakır, 2000**, “Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları”, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık Ltd. Sti., Ankara, 2:20-38s.
- Akçin, S.A.**, 1988, Piyasada Bulunan Sütlü Çikolata Çeşitleri ve Özellikleri üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Analizleri Bilim Dalı, İstanbul
- Akgün, S., Soyutemiz, E., Anar, Ş. ve Çıbık, R.**, 1997, Tüketime Sunulan Kremalı Pastaların Mikrobiyolojik Niteliklerinin Saptanması, Gıda Teknolojileri Derneği, 22 (6), 433-438s.
- Akkaya, L., Alisarlı, M., Kara, R. ve Telli, R.**, 2006, Afyonkarahisar’da tüketime sunulan kremalı pastalarda *Listeria* türlerinin varlığının belirlenmesi, YYÜ Vet. Fak. Derg, 17: 93-97s.
- Aldridge, K.E., Gardener, B.B., Clark, S.J. and Matsen, J.M.**, 1978, Comparison of Micro-ID, API 20E, and conventional media systems in identification of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 7, pp. 507-13p.
- Al-Holy, M.A., Lin M., Al-Qadiri, H.M. and Rasco, BA.**, 2008, A comparative study between overlay method and selective-differential media for recovery of stressed *Enterobacter sakazakii* cells from infant formula. *Food Microbiol.*, 25, 22-28p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Animal food hygiene regulation (Tier-LMHV)**, 2007, Regulation of the demands on hygiene for production, manipulation and marketing of distinct foodstuffs of animal origin, Federal Law Gazette (BGBl) I 1816, 1828 and 2233 (modification from Nov. 2011).
- Anon**, 1980, Microbial Ecology of Foods Vol.II. The International Commission on Mikrobiological Spesifications for Foods.Academic Press.New York,London.
- Anon**, 1980, Microorganisms in Foods.Vol.I. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Assocaiaon of Microbiological Societies, Universty of Toranto Press. Toranto, Buffalo, London.
- Anon**, 2005a, *Salmonellosis*, Institute for International Cooperation in Animal Biologics,http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/nontyphoidal_salmonellosis.pdf, (Erişim tarihi: 30.03.2011).
- Anonim**, 1998, American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20.th Edn. APHA Inc. Washington, DC.
- Anonim**, 2001, Diagnosis and management of foodborne illnesses: A primer for physicians. Foodborne illnesses table, Bacterial agents-Centers for disease control and prevention (CDC), United States 2000, MMWR., 0: 9-15p.
- Anonim**, 2009, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği 2009/6. T.C. Resmi Gazete 06.02.2009 Sayı: 27133. Ankara).
- Anonim**, Microbiology manuel, Merck KGaA, Darmstadt, 2006.
- Anonymous**, 1998, Food-borne pathogens, Monograph number 1, Salmonella, D.E. Post, Technical Support Manager, Oxoid, 40p, Unipath Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG248PW, Englang.
- Archer, D.L. and Kvenberg, J.E.**, 1985, Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the US. J.Food Protection.
- Arda, M.**, 1997, Temel Mikrobiyoloji, *Medisan Yayınevi*, No:5,Ankara.
- Arda, M.**, 2000, Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, genişletilmiş 1kinci Baskı, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ayhan, K.**, 2000, Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2. Baskı. Ankara: Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 37-80s.
- Baker, R. C.**, 1990, Survival of *Salmonella* Enteritidis on and in shelled eggs, liquid eggs, and cooked egg products. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 10(5), 273e275p.
- Beckers, H.J., Soentoro, P.S.S. and Delfgou-van Asch, E.H.M.**, 1987, The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat, Int. J. Food Microbiol, 4:249-256p.
- Beckers, H.J., Tips, P.D., Delfgou-van Asch, E. and Peters, R.**, 1986, Evaluation of an enzyme immunoassay technique for the detection of *Salmonellas* in minced meat, Lett Appl Microbiol., 2:53-56p.
- Bell, C. and Kyriakides, A.**, 2002, *Salmonella*: A Practical Approach to the Organism and Its Control in Foods, First Edition, London, Blackwell Science, 1-330p.
- Bennett, A. R., Greenwood, D., Tennant, C., Banks, J. G. and Betts, R. P.**, 1998, Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR, *Letters in applied microbiology*, 26, 437-441p.
- Bilgehan, H.**, 2004, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Barış Yayınları, İzmir.
- Bilgehan, H.**, 2002, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Fakülteler Kitabevi Levinson, W., Jawetz, E., 2004, *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji*, Lange Tıp Kitapları, 134-137 Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W., 2000, *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Springer, 2080 p. 90.
- Bilgehan, H.**, 1996, *Klinik mikrobiyoloji* (9. baskı), Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir, 425-504s.
- Boer, E. and Beumer R.R.**, 1999, Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms, *International Journal of Food Microbiology*, 50, 119-130p.
- Brackett, R.E.**, 1988, Presence and Persistence *L. monocytogenes* in Food and Water, *Food Technol*, 4: 162-164p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Buchanan, R., Lindqvist, R., Ross, T., Smith, M., Tod and Whiting, R.,** 2004, Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods, Technical Report, Microbiological risk assessment series, no. 5. WHO/FAO.
- Buhania, A.K.,** 2008, Foodborne Microbial Pathogens. Springer Science-Business Media, New York, 11: 201-216p.
- Can, Ö.P. ve Yalçın, H.,** 2011, “Mersin’de Tüketime Sunulan Kremalı Pastaların Mikrobiyolojik Kalitelerinin Değerlendirilmesi” Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 6(3) 42-48s.
- Candrian, U.,** 1995, Polymerase chain reaction in food microbiology. *J. Microbiol. Meth.*, 23: 89-103p.
- Centers for Disease Control and Prevention,** 2012, CDC update: Investigation of *Cronobacter* infections among infants in the United States, <http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/cronobacter/investigation.html>.
- Centers of Disease Control and Prevention.,** 2004, *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2003., Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- Craven, H. M., McAuley, C.M., Duffy, D.D. and Fegan, N.,** 2010, Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories, *J. Appl. Microbiol.* 109:1044–1052p.
- Crump, J.A., Luby, S.P. and Mintz, E.D.,** 2004, The global burden of typhoid fever, *Bulletin of the World Health Organization*, 82 (5), 346-353p.
- Cui, S.,** 2004, Detection and Characterization of *Esherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in food, Doctoral Thesis, University of Maryland, 116 p.
- Curd, H., Liu, D. and Reeves, P.R.,** 1998, Relationships among the O-Antigen Gene Clusters of *Salmonella enterica* Groups B, D1, D2 and D3. *J Bacteriol*, 1002-7.
- Çelik, H.,** 2008, Gıda güvenliği ve hijyen, <http://www.thasak.org/gidaguvvehijyen.doc>. (Erişim tarihi 12 Nisan 2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dancer, G.I., Mah, J.H., Rhee, M.S., Hwang, I.G. and Kang, D.H.,** 2009, Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. J. Appl. Microbiol., 107, 1606-1614p.
- De Boer, E.,** 1998, Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. Int. J Food Microbiology.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M. and Debevere, J.,** 2006, Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*, International Journal of Food Microbiology, 112(3), 253e260p.
- Demirci, M.,** 2000, “Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri”, Ankara, 20.
- Doğan, H.B., Çakır, İ., Başpınar, E. ve Halkman, A.K.,** 2002, Comparison of LST + MUG broth technique and conventional method for the enumeration of *Escherichia coli* in foods, Lett Appl Microbiology, 34(4): 274-8s.
- Doğuer, M.,** 1961, Türkiye’de Listeriosis, FAO Emerging Diseases Congress, Ankara.
- Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G. and Fanning, S.,** 2006, *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. Clin. Infec. Dis., 42, 996-1002p.
- Edinger, M., Cao, Y., Hornig, Y.S., Jenkins, D.E., Verneris, M.R., Bachmann, M.H., Negrin, R.S. and Contag, C.H.,** 2002, European Journal of Cancer, 38, 2128-2136p.
- EFSA,** 2005, Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the Microbiological risks on washing of Table Eggs. EFSA Journal, 269, 1e39p.
- EFSA,** 2007, The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA Journal, 130, 2e352p.
- El-Sharoud, W.M., O'Brien, S., Negredo, C., Iversen, C., Fanning, S. and Healy, B.,** 2009, Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. BMC Microbiol, 9, 24p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, B., Ercis, S., Hascelik, G., Gur, D., Gedikoglu, S., Aysev, A.D., Sumerkan, B., Otkun, M. ve Tuncer, I.,** 2005. Antimicrobial resistance patterns and serotype distribution among *Salmonella enterica* strains in Turkey, 2000-2002, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 24, 220-225s.
- Erkmen, O.,** 2010, Gıda Kaynaklı Tehlikeler ve Güvenli Gıda Üretimi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg., 53: 220-235s.
- Erol, İ.,** 2007, Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, Pozitif matbaacılık, Ankara, Türkiye.
- Erol, İ.,** 2010, *Salmonella* Enfeksiyonlarının Zoonotik Önemi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1(2).
- Erol, İ.,** 2007, Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Birinci Baskı. Ankara, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti.
- Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W. and Brenner, D.J.,** 1980, *Enterobacter sakazakii*, new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 569-584p.
- Ferron, P. and Michard, J.,** 1993, Distribution Of *Listeria* Spp. In Confectioners Pastries From Western France: Comparison Of Enrichment Methods, International Journal Food Microbiology, 18 (4), 289-303p.
- Fleming, D.W., Coehi, S.L, MacDonald, K.L., Brondum, Hayes, B.S., Plikaytis, B.D., Holmcs, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L.,** 1985, Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Engl J Med, 312. 404-407p.
- Fluit, A.C.,** 2005, Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella* FEMS Immunology and Medical Microbiology, 43, 1-11p.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J. and Immerseel, F.V.,** 2009, Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol. Rev. 33, 718–738p.
- Gassen, H.G., Sachse, G.E. and Schulte, A.,** 1994, PCR. Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, NY.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gast, R.K.**, 2003, Salmonella Infections. In: *Diseases of poultry 11. Ed. Ed:* SAİF, Y.M. Iowa State Press, 567-613p.
- G'enigeorgis, C.A.**, 1989, *Presmt state ol knowledge on staphylococUll intoxicatiou.* Int 1 Food Microbiol, 9.327-360p.
- Giannella R.A.**, 1996, *Salmonella* In: Baron S.(eds.), Medical Microbiology. Galveston, University of Texas Medical Branch, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.chapter.1221/>.
- Glaser, P., Frangeul, L. and Buchrieser, C.**, 2001, Comparative genomics of *Listeria* species. Science, 294: 849-852p.
- Graves, L. M., and B. Swaminathan**, 2001, PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol, 65:62p.
- Grimont, P.A.D. and Weill, F.X.**, 2007, Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.
- GroismaN, E.A. and Ochman, H.**, 1996, Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps, *Cell.*, 87: 791–794p.
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L. and Beuchat, L.R.**, 2005, *Enterobacter sakazakii* A coliform of increased concern to infant health. Int J Food Microbiol, 104, 1-34p.
- Günel, T.**, 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 27: 763-767s.
- Hanna, S.E., Connor, C.J. and Wang, H.H.**, 2005, Real-time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations, Journal of Food Science, 70, 49-53p.
- Heuvelink, A.E., Kodde, F.D., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M. and de Boer, E.**, 2001, *Enterobacter sakazakii* in Melkpoeder. Project number OT 0110, Keuringsdienst van Waren Oost.
- Hitckins, A.D.**, 2011, *Listeria monocytogenes*, In: FDA Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 10, <http://www.cfsan.fda.gov>. (Erişim tarihi 20.02.2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iversen, C. and Forsythe, S.J.**, 2003, Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula, Trends Food Sci. Technol., 14, 443-454p.
- Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H.**, 2007, The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. BMC Evol. Biol., 7,64p.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R. and Joosten, H.**, 2008, *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58(6), 1442-1447p.
- İzgür, M.**, 2002: *Salmonella* *İnfeksiyonları*, In: Kanatlı Hayvan Hastalıkları. M İzgür, M Akan (Ed), Medisan Yayınevi, Ankara, 41-53s.
- Jacobs, C., Braun, P. and Hammer, P.**, 2011, Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant, Journal of Dairy Science, 94, 3801e3810p.
- Jalali, M., Abedi, D., Pourbakhsh, S.A. and Ghoukasin, K.**, 2008, Prevalence Of *Salmonella* spp. In Raw And Cooked Foods In Isfahan- Iran, J Food Safety, 28: 442-452p.
- Jayaro, B. M. and Henning, D. R.**, 2001, “Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk”, *J. Dairy Sci.*, 84:2157-2162p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kandhai, M. C., Reij, M. W., Gorris, L. G. M., Guillaume-Gentil, O. and Van Schothorst, M.**, 2004, Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households, *Lancet*, 363, 39-40p.
- Karapınar, M., ve Gönül, A.**, 1998, Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar, Gıda Mikrobiyolojisi, Ünlütürk, A., ve Turantaş, F., (edt.), Birinci baskı, Mengi Tan Basımevi, 140, 112-122, 134-135s.
- Kıvanç, M., Kunduhoglu, B. ve Ayaz, B.**, 1992, “Eskisehir’de tüketilen çiğ sütlerin bakteriyolojik kalitesinin halk sağlığı yönünden incelenmesi”, *Gıda*, 17 (5):327-333s.
- Kim, S.A and Rhee, M.S.**, 2011, A new cost-effective, selective and differential medium for the isolation of *Cronobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, 136, 169-178p.
- Koneman, E., Washington, W.J., Allen, S., Janda, W., ProcoP, G., Schreckenberger, P. and Woods, G.**, 2006, *Koneman' s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology sixth edition*. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 6.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C.**, 1992, *Diagnostic Microbiology Fourth Edition*. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. p.105-184.
- Kubista, M., Andrade, M., Forootan, A., Jonak, J. and Lind, K.**, 2006, The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med.*, 27: 95-125p.
- Kuzina, L.V., Peloquin, J.J., Vacek, D.C. and Miller, T.A.**, 2001, Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), *Curr Microbiol*, 42, 290-294p.
- Lado, B.H. and Yousef, A.E.**, 2007, Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, London, New York, CRC Press, p.157-213.
- Le Minor, L.**, 1984, *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1, Williams & Wilkins Publishers, Baltimore, United States, p. 427-458. 73.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, L.G., Connell, C.R. and Bloch, W.,** 1993a, Allelic discrimination by nicktranslation PCR with fluorogenic probs. *Nucl.Acids Res.*, 21: 3761-3766p.
- Lees, R.,** 1973, Food analysis Analytical and Quality Control Methods for the Food Manufacturer and Buyer. Leonard Hill Publishers Ins. Aylesburg.
- Li, C., Liu, D., Zhou, G., Xu, X., Qi, J. and Shi, P.,** 2012, Meat quality and cooking attributes of thawed pork with different low field NMR T21. *Meat Science*, 92(2), 79-83p.
- Liu, D.,** 2008, Handbook of *Listeria monocytogenes*, USA: CRC Press by Taylor & Francis Group, LLC.
- Mackay M.I., Arden, E.K. and Nitsche, A.,** 2002, Real-time PCR in virology. *Nucl. Acids Res.*, 6: 1292-1305p.
- Mackay, I.M.,** 2004, Real-time PCR in the microbiology laboratory, *Clinic Microbiological Infections*, 10, 190-212p.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. and Hoekstra RM.,** 2010, The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis, *Clin Infect Dis*, 50(6):882-889p.
- Malorny, B., Löfström, C., Hoofar, J., Schelin, J. and Rådström, P.,** 2009, *Salmonella*. In Molecular detection of foodborne pathogens, Bölüm 32, 447-458p. CRC Press.
- Mead, P.S., Slutsker, L. and Dietz, V.,** 1999, Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.*, 5:607–25p.
- Meursing, E.H.,** 1983, Cacao Powders for Industrial Processing, Cacao fabriek de zaan b.v.Koog Aan de Zaan.Holland.
- Minifie, B.W.,** 1979, Chocolate, Cocoa and Confectionery Science and Technology. The Avi Publishing Company Connecticut.Westport.
- Muytjens, H.L., Roelofs-Willemse, H. and Jaspar, G.H.,** 1988, Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 743-746p.
- Nazarowec-White M. and Farber, J.M.,** 1997, Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, Vol. 60, No.3, 226-230p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- NIAID** (National Institute of Allergy and Infectious Disease), <http://www.broad.mit.edu/seq/msc/> (Erisim tarihi: Temmuz, 2013).
- Notermans, S. and Hcuvclman, K.J.**, 1984, *Lin/-luss der Milil'u-Bediugwigm auldas W, lislUln voil S aurms uund die Eintall/oxiu-Bildung.* Flcischwirtsch., 64. i490- 1496p.
- Özkaya, K.**, 2010, Kayseri’de satışa sunulan çiğ süt numunelerinde *Listeria* spp. varlığının klasik kültür yöntemi ile belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Pagotto, F., Farber, J.M. and Lenati, R.**, 2008, Pathogenicity of *Enterobacter sakazakii*. In: *Enterobacter sakazakii*, Ed By: Jeffrey M. Farber, Stephen J. Forsythe. 127-144p., ASM Press, Washington.
- Patrinos, G.P. and Ansorge, W.**, 2005, Molecular diagnostics, Academic Press, 461p.
- Pearson, L. J. and Marth, E. H.**, 1990, Behavior of *Listeria monocytogenes* in the Presence of Cocoa, Carrageenan and Sugar in a milk Medium Incubated With and Without Agitation. *Journal of Protection*. Vol. 53. No 1, 30-37p.
- Pelt-Verkuil, E., Belkum, A. and Hays, J.P.**, 2008, Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer, 325 p.
- Peng, H. and Shelef, L.A.**, 1999, Automated rapid screening of foods for the presence of salmonellae. *Journal of Food Protection*.
- PHAC**, 2006, Possible *Salmonella* illness: Canada. Infectious Diseases News Brief. Public Health Agency of Canada, November 17th 2006.
- Pla, S., Moreno, P., Fagoaga, F., Rodriquez, M., Garcia, M. and Torregrosa, A.**, 1996, Bacteriological Control of Cakes in the Alcoi Health Area, *Alimentaria*, 2700, 51-53p.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C.**, 2004, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. India Replica Press Ptv. Ltd., Kundli, Chapter 18.
- Ramsay, G.**, 1998, Commercial biosensors applications to clinical bioprocess and enviromental samples. A Wiley – Intersuence Publication, John Wiley & Sons, Inc. Virginia.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Restaino, L., Frampton, E.W., Lionberg, W.C. and Becker, R.J.,** 2006, A Chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. *J. Food Protect.*, 69, 315-322p.
- Reynolds, G.,** 2006, Soy lecithin blamed for Hersey's salmonella scare. *Food Quality News* 24th November 2006. Available at: <http://www.foodqualitynews.com/content/view/print/3399>. (accessed: 24 June 2010).
- Rhoades, J.R., Duffy, G. and Koutsoumanis, K.,** 2008, Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain, *Food Microbiol.*, 26: 357-376p.
- Robert Koch Institut (RKI),** 2012, Salmonellose. In Robert Koch Institut (RKI), Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011/2012 (pp. 165e169). AZ Druck und Datentechnik GmbH, Berlin. Robert Koch Institut (RKI). 2014: SurvStat@RKI, online: 29.06.2014 <https://www3.rki.de/Survstat/> (Erişim tarihi: 29 Haziran 2014)
- Roberts, J.A.,** 2000, Economic aspects of food-borne outbreaks and their control. *British Medical Bulletin*.
- Ryan, K.J., Ray, C.G. and Sherris, J.C.,** 2003, Sherris Medical Microbiology: an introduction to infectious diseases, McGraw-Hill Professional, 979 p.
- Saiki, R.K., Gelfont, D.H., Stoffel, S., Scharf, J. and Higuchi, R.,** 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487- 491p.
- Sarmiento O. L., Weigle K. A., Alexander J., Weber D. J. and Miller W. C.,** 2003, Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis. *J.of Clin.Microbiol.*, 41: 3233-3240p.
- Selander, R. K., Li J. and Nelson K.,** 1996, Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: Neidhardt F. C. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella* -Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D. C., 2691-2707p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seo, K.H., Valentin-bon, I.E., Brackett, R.E. and Holt, P.S.,** 2004, Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *J. Food Prot.*, 67: 864-869p.
- Sheldon, B.W.,** 1995, Application of biopeptides to inhibit foodborne pathogens associated with fresh poultry carcasses in proceedings of the 12th European symposium on the quality of poultry meat, 25-29 Sept. 1995, Zaragoza-Spain, 105-113p.
- Shivaprasad, H.L.,** 2003, *Salmonella* Infections. In: *Diseases of poultry, 11.Ed:* SAIF, Y.M. Iowa State Press, 568-582p.
- Sinel, H. J.,** 1980, Einführung in die Lebensmittelhygiene Verlag Paul Parey.Berlin und Hamburg.
- Speck, M.L.,** 1976, *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Ass. 1015 Eighteenth Street. M.W.Washington, D.C. U.S.A., 225p.
- Steele, M. L., McNab, W. B, Poppe, C., Griffiths, M. W. and Chen, S.,** 1997, “Survey of Ontario Bulk Tank Milk for Food-Borne Patogens”, *Journal of Food Protection*, 60 (11):1341-1346p.
- Stone, G.G., Oberst, R.D., Hays, M.P., Mcvey, S. and Chengappa, M.M.,** 1994, Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure., *J.Clin.Microbiol.*, 32: 1742–1749p.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P. and Romeo, T.,** 2002, Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, Vol. 184; p. 5130-5140.
- Swaminathan, B.,** 2006, Foodborne Pathogens and Disease., A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Vol. 3, No. 1: 36-50p.
- Swaminathan, B. and Feng, P.,** 1994, Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria, *Annu. Rev. Microbiology*, 48, 401-426p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şireli, U.T., Erol, İ. ve Pehlivanlar, S.,** 2000, Kremalı Pastalardan *Listeria*'ların Saptanması, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 47, 17-21s.
- Tietjen, M. and Fung, D.Y.C.,** 1995, Salmonellae and food safety. *Crit.Rev. Microbiol.*, 21(1): 53-83p.
- Todd, ECD.,** 1986, Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States, *J Food Prot.*, 52: 595-601p.
- Topal, S.,** 1991, Düşük Nemli Gıdalarda Mikrobiyolojik Riskler ve Azaltılma Olanakları. *Gıda Teknolojisi Dergisi*, Ankara.
- Troller, J. A.,** 1983, Sanitation in Food Processing Academic Press, New York, London.
- TSE,** 2006, Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri - Gıda Zincirindeki Tüm Kuruluşlar İçin Şartlar. TS EN ISO 22000., Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Tuchili, L.M., Kodama, H., Izumoto, Y., Mukamoto, M., Fukata T. and Baba, T.,** 1995, Detection of *Salmonella gallinarum* and *S. Typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction., *J.Vet. Med.Sci.*, 57: 59-63p.
- Tunail, N.,** 2000, Mikrobiyel infeksiyonlar ve intoksikasyonlar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, İkinci baskı, Ankara, Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 81-88s.
- Tunail, N.,** 2000, Mikrobiyel infeksiyonlar ve intoksikasyonlar, In: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, İkinci baskı, Ankara, Sim Matbaacılık Ltd. Şti., s. 81-88.
- Tunail, N.,** 1986, Süt Mikrobiyolojisi Ders Notları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği** 2009/6.- T.C. Resmi Gazete 06.02.2009 Sayı: 27133. Ankara (Erişim tarihi: 06 Şubat 2009).
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği,** Yayımlandığı R.Gazete: 06.02.2009-27133, Tebliğ No: 2009/6 (Erişim tarihi: 06 Şubat 2009)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Üner, Y., Çetin, Ö. ve Ergün, Ö.,** 2013, Baharatta görülen Mikrobiyolojik Kontaminasyonlar, İ.Ü. Vet.Fak., Besin Hijyeni ve Teknolojisi A.B.D., İstanbul.
- Üzüm, M.,** 2006, Ankara yöresinde tüketime sunulan çiğ sütlerde *salmonella-shigella* ve bazı patojenlerin izolasyonu, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- WHO** (World Health Organization, Report-2005 <http://www.who.int/salmsurv/links/GSSProgressReport2005.pdf> (Erişim tarihi: 2005).
- WHO,** Food Safety Measures for Eggs and Foods Containing Eggs. <http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/en/eggs.pdf> (Erişim tarihi: 2005).
- Wittwer, C.T. and Kusukawa, N.,** 2006, Moleküler Mikrobiyoloji:Tanı Prensipleri ve Uygulamalar, ASM Press, Washington.
- Yıldırım, Y.,** 1998, Et Teknolojisi, Yıldırım Basımevi, Ankara.
- Yücel, A., İşgöz, B.B., Göçmen, D. ve Tiryakioğlu, Ö.,** 1992, Bursa’da Tüketime Sunulan Kremalı Pastaların Mikrobiyolojik Nitelikleri Üzerine Bir Araştırma, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9, 91-98s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Büşra AKGÜL KESER

Doğum Yeri ve Tarihi: Rize, 15.09.1986

Uyruğu: T.C.

Eğitim Durumu:

Üniversite	Akademik Kariyer Bölüm/Branş	Yıl
Ege Üniv.	Lisans Biyoloji/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji	2005-2010
Ege Üniv.	Yüksek Lisans Biyoloji	2012-2015

Bilimsel Tebliğler:

Akgül, B., Ateş, M., Maktav, E., 2012. Dimetiloktadesil (3-trimetoksilil) amonyum klorür'ün kumaşlar üzerindeki antibakteriyel etkinliği. 21.Ulusal Biyoloji Kongresi (3-7 Eylül 2012, İzmir), Bildiri Özet Kitabı, 1166.