T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESCHERICHIA COLI O157:H7 VE *SALMONELLA SPP.* TÜRLERİNİN GIDALARDAN İZOLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

SEVDA TERZİ YAVAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ECE ŞEN

EDİRNE – 2022

Sevda TERZİ YAVAŞ'ın hazırladığı "***ESCHERICHIA COLI* O157:H7 VE *SALMONELLA SPP.* TÜRLERİNİN GIDALARDAN İZOLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik** Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Ece ŞEN	……
Prof. Dr. Ahmet ASAN	……
Prof. Dr. Dumrul GÜLEN	……

Tez Savunma Tarihi: 17/06/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Ece ŞEN
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı
Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

17 / 06 / 2022

Sevda TERZİ YAVAŞ

İmza

Yüksek Lisans Tezi

Escherichia coli O157:H7 ve *Salmonella ssp.* Türlerinin Gıdalardan İzolasyonlarının Geliştirilmesi

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Çalışmamızın yapılmasının amacı laboratuvar ortamında patojen bakterilerin izolasyonunun hızlandırılması, kültürel metotların hata paylarının azaltılması ve maliyetinin düşürülmesidir. Çalışmada, *E.coli* O157:H7 (ATCC 43888) ve *Salmonella ssp.* (ATCC 13076) suşları ve 103 adet Edirne ilinden temin edilen gıda örnekleri kullanılmıştır. Deneylerde suşlar ve gıda örnekleri 3 paralel olarak test edilmiştir ve test edilen suşlar ve gıda örneklerindeki patojen mikroorganizmanın varlığı " Tespit Edildi / Tespit Edilemedi " şeklinde tanımlanmıştır. Çalışmada %0,5 ’ lik sodyum klorür (NaCl) ile 1 N (Normal) hidroklorik asit (HCl) solüsyonunun dilüsyonları (1/2 N,1/4N, 1/6 N, 1/8 N ve 1/10 N HCl asit) kullanılarak düşük asit direncine sahip patojen mikroorganizmaların gıdalardan izolasyonu amaçlanmıştır. HCl asit dilüsyonları sayesinde patojen mikroorganizmaların Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) yöntemleri ışığında, daha az besiyeri kullanılarak ve kısa zamanda gıdadaki mevcut mikroorganizmaların izolasyonunu gerçekleştirmek hedeflenmiştir. Aside dirençli olan suşları gıdalardan daha kolay izolasyonu için zenginleştirme kullanılarak veya kullanılmadan patojen mikroorganizmaların izolasyonu çalışılmıştır. ISO yöntemlerinde kullanılan besiyerleri başka mikroorganizmaların üremelerine imkân sağlayacak içeriğe sahiptir, bu yüzden HCl asit dilüsyonları kullanılarak gıdada bulunan saprofit mikroorganizmaların uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle seçici izolasyon tekniği ilk kez asit solüsyonları ile uygulanmıştır. Örneklerden *Salmonella ssp*. ve *E.coli* O157H:7 bakterilerinin izolasyonu için: çalışma örnekleri öncelikle ISO 6579-1:2017 ve

ISO 16654:2001/Amd 1:2017 yöntemiyle çalışılmıştır. Aynı örnekler klasik metotlarında yer alan ön zenginleştirme aşaması yapılmadan HCl asit dilüsyonlarında bekletilmesi (30 sn. ve 1 dakika) yapılıp seçici besiyerlerine ekimleri gerçekleştirilip uygun sıcaklıkta inkübasyonu yapılmıştır. Aynı örnekler klasik metotta yer alan ön zenginleştirme sonrası HCl asitte dilüsyonlarında bekletilme (30 saniye ve 1 dakika) yapılıp seçici besiyerlerine ekimleri gerçekleştirilip uygun sıcaklıkta inkübasyonu yapılmıştır. Çalışması yapılan 103 örnekten dördünde asit dilüsyonlarında ve klasik izolasyon yönteminde bakteri üremeleri tespit edildi. Sucuk (A) örneğinde ön zenginleştirme öncesi ve sonrası 1/10 N HCl asit dilüsyonunda ve klasik izolasyon metodunda *E.coli* O157:H7 bakterisi tespit edilmiştir. Taze sığır eti örneği ön zenginleştirme öncesi ve sonrası 1/2 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik izolasyon metodunda *E.coli* O157:H7 bakterisi izole edilmiştir. Kremşanti(B) örneğinde zenginleştirme öncesi ve sonrası 1/6 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik izolasyon yönteminde *Salmonella ssp.* bakterisi izole edilmiştir. Toz çorba (C) örneğinde ön zenginleştirme öncesi ve sonrası 1/6N, 1/8N, 1/10N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik izolasyon yönteminde *Salmonella ssp*. tespit edilmiştir. HCl asit ile muamele etme işleminin duyarlılık veya dirençlilik açısından bakteri izolasyonlarını hızlandırdığı gözlenmiştir. Böylelikle, bakterilerin izolasyonlarının daha güvenilir ve hızlı bir şekilde yapılabileceği belirlenmiştir. Çalışmamız bu yöntemi ilk kez gıda numunelerinde doğrulamıştır.

Yıl: 2022

Sayfa Sayısı: 80

Anahtar Kelimeler: *E.coli* O157:H7, *Salmonella ssp*., bakteri izolasyonu, gıda patojenleri.

Master's Thesis
Name of thesis: Improvement of *Escherchia coli* O157: H7 and *Salmonella ssp.* Isolation From Food Samples
Trakya University Institue of Natural and Applied Sciences
Biotechnology and Genetics Department

ABSTRACT

The reason of our study is to accelerate the isolation of enteric bacteria in the laboratory environment, to reduce the margin of error and to reduce the cost of cultural methods. In this study *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43888) and *Salmonella ssp.* (ATCC 13076) strains and 103 food samples obtained from Edirne province were used. In experiments, strains and food samples were tested in triplicates and the presence of pathogenic microorganism in the tested strains and food samples were defined as "Detected / Not Detected" in our study. Dilutions of 0.5% sodium chloride (NaCl) and 1 N (Normal) hydrochloric acid (HCl) solution (1/2 N, 1/4 N, 1/6 N, 1/8 N and 1/10 N HCl acid) were applied. It was aimed to isolate pathogenic microorganisms with low acid resistance from foods. Was HCl acid dilutions, it was aimed to isolate pathogenic microorganisms in the light of International Organization of Standardization (ISO) methods, using less medium in a short time. Isolation of pathogenic microorganisms without the use of food enrichment for easier isolation of the acid resistant strains were studied. The media used in ISO methods have a content that allows other microorganisms to grow, so we aimed to remove saprophyte microorganisms in food by using HCl acid dilutions. Thus, the selective isolation technique was applied for the first time with acid solutions. *Salmonella ssp.* and *E.coli* O157H:7 working samples were first studied with the method of ISO 6579-1: 2017 and ISO 16654: 2001 / Amd 1: 2017. The same samples were kept in HCl acid dilutions (30 seconds and 1 minute) without the pre-enrichment step in classical methods, they were cultivated on selective media and incubated at the

appropriate temperature. The same samples were kept in dilutions (30 seconds and 1 minute) in HCl acid after the pre-enrichment in the classical method, they were cultivated on selective media and incubated at the appropriate temperature. Bacterial growth was detected in acid dilutions and classical isolation method in four of the 103 samples studied. *E.coli* O157: H7 bacteria were detected in the 1/10 N HCl acid dilution before and after pre-enrichment in the sausage(A) sample and in the classical isolation method. *E.coli* O157: H7 bacteria were isolated from fresh beef sample before and after pre-enrichment in 1/2 N, 1/10 N HCl acid dilutions and classical isolation method. In the heavy cream (B) sample before and after enrichment, in 1/6 N, 1/10 N HCl acid dilutions and in the classical isolation method, *Salmonella ssp.* bacteria isolated. *Salmonella ssp.* in acid dilutions of 1/6 N, 1/8 N, 1/10 N HCl before and after pre-enrichment in the powdered soup (C) sample and in the classical isolation method. It has been observed that the treatment with HCl acid accelerates bacterial isolation in terms of sensitivity and acid resistance. Thus, it has been shown that the isolation of bacteria can be done more safely and quickly. Our study has confirmed the usefulness of this method for the first time in food samples.

Year: 2022
Number of Pages: 80
Keywords: *E.coli* O157:H7, *Salmonella ssp*.,bacterial isolation, food pathogens.

ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR)

Tez çalışmamın her aşamasında gerek bilimsel gerek idari anlamda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, değerli tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Ece ŞEN (Trakya Üniversitesi)**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında mikrobiyolojik gıda örneklerimi ve suşlarımı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuarı'nda çalışmama olanak sağlayan Sayın **Prof. Dr. Ece ŞEN (Trakya Üniversitesi)**'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her türlü destek ve emeklerini esirgemeyen aileme, arkadaşlarıma ve yakınlarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... İV
ABSTRACT ..... Vİ
ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR) ..... Vİİİ
SİMGELER DİZİNİ X
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... Xİİ
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... Xİİİ
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 2
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. GIDA MİKROBİYOLOJİSİ 2
2.2. *ENTEROBACTERİACEAE* 3
2.2.1. *ESCHERİCHİA COLİ* 4
2.2.2. *SALMONELLA* 10
2.3. GIDA KÖKENLİ PATOJENLERİN İZOLASYONUNDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR VE BESİYERLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ 14
2.3.1. *SALMONELLA SSP*. VE *E.COLİ* O157:H7 İZOLASONU İÇİN GELİŞTİRİLEN YÖNTEMLER: 19
BÖLÜM 3 26
3. MATERYAL VE METOD 26
3.1. MATERYAL 26
3.1.1. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER 26
3.1.2. DENEYLERDE KULLANILAN TEST SUŞLARI 26
3.1.3. TEST ÖRNEKLERİ 27
3.1.4. TEST ÖRNEKLERİNİN TEMİN EDİLİŞİ VE SAKLAMA KOŞULLARI 27
3.1.5. TEST ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI 28
3.1.6. *SALMONELLA SSP*. VE *E.COLİ* O157:H7 SUŞLARININ HAZIRLANIŞI VE SAKLAMA KOŞULLARI 35
3.2. METOD 37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 58
KAYNAKLAR 60
ÖZGEÇMİŞ 67

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

BGA:	Brillant Green Agar
BPW:	Buffered Peptone Water
CT:	Cefixime-telluride
DEFT:	Direkt Epifluoresans Mikroskopi Tekniği
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EIA:	Enzim İmmunoassay
ELISA:	Enzyme-Linked Immuno Sorbet Assay
EMS:	En muhtemel sayı
HC:	Hemorojik kolit
HCl:	Hidroklorik asit
HGMF:	Hidrofobik Grid Membran Filtre Tekniği
H_2S:	Hidrojen Sülfür
Kob/g:	Koloni oluşturan birim/gram
Mb:	Megabaz
MID:	Minimal enfeksiyon dozu
MKTTn:	Muller-Kauffman Tetrahionate Novobiocin Broth
ml:	Mililitre
MPA:	Modified Phosphate Buffer
mTSB:	mTryptic-Soy-Broth with Novobiocin
MUG:	4-metilumbelliferil-D-glukoronid
N:	Normal
NaCl:	Sodyum Klorür
PCA:	Plate Count Agar
PZR:	Polimeraz Zincir Reakiyonu
PZR-ELISA:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Enzime Bağlı İmmunosorbent Assay
rRNA:	ribozomal Ribonükleik Asit
RT-PZR:	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RVS:	Rappaport Vasilliadis Medium Single Component
SMAC:	Sorbitol MacConkey Agar
TSA:	Tryptone Soy Agar

TSB:	Tryptic Soy Broth
TTP:	Trombotik trombositopenik purpura
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
XLD:	Xylose Lysine Decarboxylase Agar
µm:	Mikrometre

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. *Salmonella enterica* alt türleri……..12

Çizelge 3.1 Klasik yöntem ve HCl asit dilüsyonlarının uygulandığı örneklerin pH ve sıcaklık değerleri……..28

Çizelge 3.2 Tespit limiti çalışmasında ve yeni metodun uygulanması aşamasında kullanılan Hidroklorik asit dilüsyonlarının pH değerleri……..29

Çizelge 4.1. Tespit limiti çalışması sonuçları……...54

Çizelge 4.2. Çalışması yapılan 103 örnekten dört örnekte (sucuk(A); 1/10 N HCl asit dilüsyonunda ve klasik yönteminde, taze sığır eti; 1/2 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik yönteminde *E.coli* O157:H7 bakterisi tespit edilmiştir. Toz çorba (C); 1/6 N, 1/8 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik metodunda, kremşanti (B); 1/6 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik yönteminde *Salmonella ssp.* bakterileri tespit edilmiştir……..55

Çizelge 4.3. *Salmonella ssp.* pozitif örneklerin klasik metod ve yeni gelişirilen HCl asit dilüsyonları metodu sonuçları (örnekler 3 paralel çalışılmıştır)……...56

Çizelge 4.4. *E.coli* O157:H7 pozitif örneklerin klasik metod ve yeni gelişirilen HCl asit dilüsyonları metodu sonuçları (örnekler 3 paralel çalışılmıştır)……...57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. A) *E.coli* B suşu REL606, tipik bir basil şeklinde morfolojiye sahiptir (Taramalı elektron mikroskopu görüntüsü). B) *E.coli* O119:HND suşu A111 (saç benzeri pili üreten bir enteropatojenik suşun elektron mikroskopu görüntüsü)……...6

Şekil 2.2. Gıdalarda risk oluşturan etkenler…….……..…...16

Şekil 2.3. Multipleks-PZR yöntemi ile hamburgerde *E. coli* araması……...21

Şekil 2.4. Antijen Saptanmasında Sandwich ELISA yönteminin uygulanışı……...….24

Şekil 4.1. 1/10 N HCl asit dilüsyonunda sucuk A örneğinden ön zenginleştime sonrası *E.coli* O157:H7 bakterisinin CT-SMAC içeren kültürde izolasyonu……44

Şekil 4.2. 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ön zenginleştirme öncesi CT-SMAC içeren kültürde sucuk A örneğinden *E.coli* O157:H7 bakterisinin izolasyonu……45

Şekil 4.3. *E.coli* O157:H7 bakterisinin sucuk A örneğinden klasik yöntem ile CT-SMAC içeren kültürden izolasyonu…….45

Şekil 4.4. Taze sığır etinden ön zenginleştirme öncesi hazırlanan 1/2 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilen *E.coli* O157:H7 bakterisi varlığı CT-SMAC besiyerinde üreme görülmüştür……...46

Şekil 4.5. Taze sığır etinden ön zenginleştirme sonrası hazırlanan 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilen *E.coli* O157:H7 bakterisinin CT-SMAC besiyerinde gelişim gösterdiği görülmüştür……47

Şekil 4.6. Taze sığır etinden klasik metod ile yapılan çalışmada *E.coli* O157:H7 bakterisi CT-SMAC besiyerinde tespit edilmiştir……...47

Şekil 4.7. Kremşanti (B) örneğinden yeni metod çalışılarak ön zenginleştirme öncesi 1/6 N ve 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilerek *Salmonella spp*. bakterisi XLD ve BGA besiyerlerinde üremesi görülmüştür……48

Şekil 4.8. Kremşanti B örneğinden yeni metodla çalışılarak ön zenginleştirme sonrası 1/6 N ve 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilerek *Salmonella spp*. bakterisi XLD ve BGA besiyerinde varlığı tespit edilmiştir……49

Şekil 4.9. Kremşanti B örneğinden klasik metod çalışmasında *Salmonella ssp*. bakterileri XLD ve BGA besiyerinde tespit edilmiştir……...50

Şekil 4.10. Toz çorba C örneğinden ön zenginleştirme öncesi yeni metod ile *Salmonella ssp.* bakterileri XLD ve BGA besiyerinde üremiştir…….51

Şekil 4.11**.** Toz çorba C örneğinden ön zenginleştirme sonrası yeni metod ile *Salmonella ssp.* bakterileri XLD besiyerinden izole edilmiştir……...52

Şekil 4.12. Toz çorba C örneğinden klasik metod ile yapılan çalışmada *Salmonella ssp*. bakterileri XLD besiyerinde tespit edilmiştir……...53

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Arnold ve Kaspar, elma şarabı (Bennett, MacPhee, & Betts, 1996), mayonez (Lazcka, Campo, & Munoz, 2007) ve yoğurt (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994) gibi asitli yiyecekleri içeren *Escherchia coli* 0157:H7 salgınlarının yüksek asitli gıdaların güvenliği ile ilgili endişelerini ortaya koyduğunu belirtmiştir (Duffy vd., 2000). Bu çalışmada, hidroklorik asit dilüsyonları kullanılarak gıda patojenleri olan *E.coli* O157:H7 ve *Salmonella ssp.* bakterilerinin klasik yönteme göre daha etkin olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılacak örnekler Edirne ilinde bulunan marketlerden toplanmıştır.

BÖLÜM 2

2. Genel Bilgiler

2.1. Gıda Mikrobiyolojisi

Gıdaların hijen ve mikroorganizma açısından incelenmesi tüketici sağlığı açısından önemli bir yere sahiptir. Mikrobiyolojik olarak bozulmuş ürünlerin satış izni olmaması ve zararlı olduğu bilinirken, bazı mikroorganizmalar belirli sayıyı aşmadığı takdirde çoğu zaman zararsızdır. Gıdalarda mikrobiyolojik analizlerin yapılması; iyi üretim uygulamalarının (Good Manufacturing Practise, GMP) geliştirilmesi, bozulmuş veya bozulmaya yakın ürünlerin piyasaya sürümünün engellenmesi, tüketici sağlığının korunması için önemlidir. İnsan sağlığını en fazla etkileyen etmenler bilimsel açıdan sıralandığında patojen mikroorganizmalar ikinci sırada yer almaktadır. Hastalıklara neden olan mikroorganizmaların enfeksiyon ve intoksikasyonlarından korunmak için bu mikroorganizmaların hastalık etkilerinin yok etmek yeterli bir çözüm oluşturmaz. Gıda zehirlenmelerinin ana nedenleri incelendiğinde en çok mikroorganizmların hatalı üretimi, kontaminasyona bağlı olarak aşırı çoğalmaları ve besinlerin taşıma zincirlerinde meydana gelen bozulmalardır. Gıda kalitesini değerlendirirken İsviçre Gıda Maddeleri Tüzüğü belirli bir sınıflandırma yapmıştır. Buna göre:

- Bulaşıcı hastalık etkeni olması (A grubu)
- Gıda toksinfeksiyon etkeni olması (B grubu)
- Gıdanın bakteriyel intoksikasyon etkeni olması (C grubu)
- Zararlı metabolizma ürünlerini içermesi

- İndikatör mikroorganizmalar olması (E grubu)

- Gıdada bozulmaya neden olan mikroorganizmalar olması (F grubu)

- Teknolojik olarak istenen mikroorganizmalar olarak gruplandırılırlar. *Escherichia coli* (*E. coli*) A,B,C,E,F grubunun içine girerken, *Salmonella spp.* cinsinin A ve B grubuna dahil olarak insan sağlığını önemli oranda etkilediği görülmektedir (Jalava, 1993).

Bakteriler her daim hastalık yapıcı olduğu düşünülmemelidir. Bakterilerin ticari üretim kaynakları olarak da kullanım alanları vardır. Kimyasal endüstri, aseton, butanol gibi birçok ürünlerin üretiminde bakteri kültürleri kullanılmaktadır. İlaç firmaları vitamin ve antibiyotik üretimi için bakterilerden büyük oranda yararlanmaktadır. Gıda sanayisinde de sütten yoğurt oluşturulması, çeşitli peynirlerin yapımında da bu bakteriler kullanmaktadır (Fukushima & Gomyada, 1999).

2.2. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae familyası içinde Deoksiribonükleik Asit (DNA) homolojisi, biyokimyasal özellikleri, serolojik reaksiyonları, bakteriofaj duyarlılıkları ve antibiyotik direnç profillerine göre sınıflandırılmış en az 30 cins, 140 tür, çok sayıda biyogrup ve henüz adlandırılmamış enterik gruplar yer almaktadır. Tümü aerop ve fakültatif anaerop, sporsuz, glikozu fermente eden, nitratları nitritlere indirgeyen, katalaz enzimi pozitif, sitokrom oksidaz enzimi negatif, indol pozitif, Gram negatif basillerdir. Boyutları 0,5-2 x 2-4 µm arasında değişebilen, düz, uçları yuvarlak çomak şeklinde bakterilerdir. Yavaş hareket ederler ve bundan dolayı bazen hareksiz gibi görünebilirler. Üremek için zengin besiyerlerine ihtiyaç duymazlar, optimum pH 7,2 'de, 37°C' de ve 18-24 saat içinde cinse veya türe göre değişen özelliklerde koloniler oluşturabilirler. Diğer bakterilerden 44°C 'de üreme yapabilmesi nedeniyle ayırt edilmeyi kolaylaştırmaktadır. Bu bakteriler doğada, toprakta, sularda ve birçok canlının bağırsak florasında yaygın olarak bulunurlar. Bakterilerin genetik yapısındaki farklılıkları sayesinde fenotipte meydana gelen enzimlerin varlığı ya da yokluğu sayesinde laboratuarlarda bakterilerin identifikasyonu gerçekleştirilebilir (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

Enterobacteriaceae türlerinin varlığının ortaya koyulması için serolojik, biyokimyasal ve faj tiplendirme yöntemleri kullanılır. Biyokimyasal doğrulama yöntemi, çeşitli amino asitler, şekerleri içeren besiyerlerinin bulunduğu kit şeklinde olup besiyerlerinde oluşan renk, gaz oluşumu gibi değişimlerine göre reaksiyonlar değerlendirilir. Elde edilen sonuçlar bilgisayar ortamında şüpheli mikroorganizmanın tanımlanmasına yardımcı olur. *Enterobacteriaceae* familyası bakterileri indikatör organizmalardır, gıdaların yeterli ısıl işlem görmemesi veya ısıl işlem sonrası kontaminasyon ile bozulmalara sebep olurlar (Jalava, 1993).

Bu bakteriler tüm üriner sistem enfeksiyonlarının %70, tüm sepsislerin %30-35' inden sorumludurlar. Familya içindeki bazı cinsler insan için patojendirler (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*), bazıları normal florada yer alırlar, fakat bulundukları normal vücut bölgelerinden ayrıldıklarında fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

2.2.1. *Escherichia coli*

Tarihçesi

Escherichia coli (*E.coli*), bakteri nedeniyle incelenen hasta bebeklerin bağırsaklarında var olan mikroorganizmalar *Bacterium coli commune* olarak tespit edilmiştir. Araştırmaların genişletilmesiyle, çok hızlı büyüyen" kaya yıldızı " olarak adlandırılan bu bakteri 1884 yılında *E. coli* olarak tanımlanmıştır (Doyle & Cliver, 1990). *E. coli,* her insandan izole edilebiliyor olması, her türlü besin ortamında hızlı çoğalma göstermesi sayesinde mikrobiyolojik çalışmalara model organizma olmuştur (Moter & Gobel, 2000; Tünger, Çavuşoğlu, & Korkmaz, 2005).

Model organizma olması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından genetik kodu, transkripsiyonu, translasyonu, replikasyonu araştırılmış ve geliştirilmiş ilk organizmadır (Cox, 1999).

Özellikleri

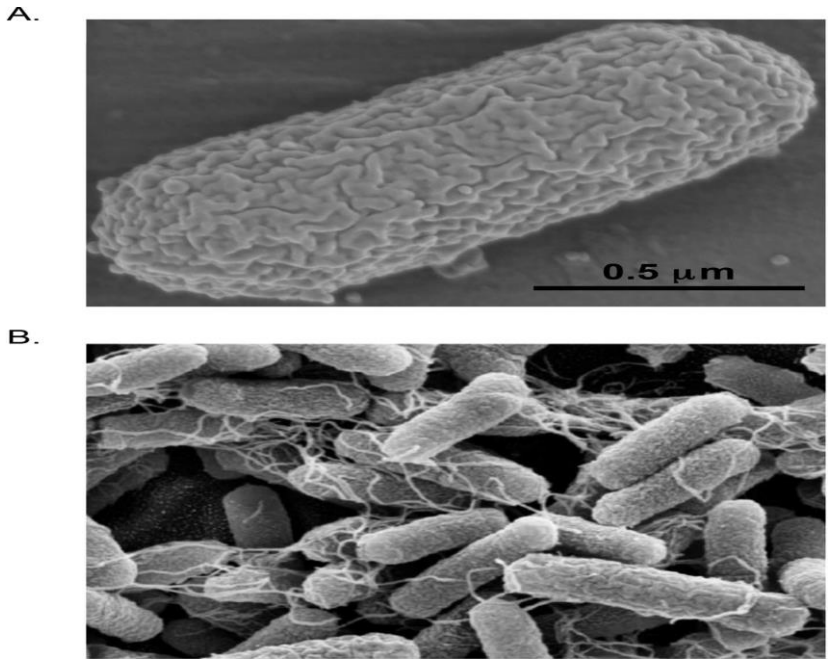
E. coli Gram negatif, fakültatif anaerob olan çubuk şeklinde bir bakteridir. 1 µm uzunluğunda, 0.35 µm genişliğinde, hareketi için etrafında flagella ve pili bulunan bir kokobasildir (Özkaya & Cömert, 2008). Glukozu ve laktozu fermente eden, oksidaz

enzimi negatif, üreyi parçalayamayan, sitrat ve hidrojen sülfür oluşumu negatif, triptofandan indol oluşumu pozitif, dirençli bir bakteri olup 60°C' de 30 dakika, oda şartlarında ise uzun süre yaşayabilir. *E. coli* doğada, toprakta, sularda insan ve hayvanların gastrointestinal sistem floralarında bol miktarda bulunur. Hücre yapısında bulunan antijenlerinden kaynaklı çok sayıda serotipe ayrılmaktadır. *E.coli*, *Enterobacteriaceae* içinde en sık idrar yolu enfeksiyonu, neonatal menenjit, sepsis ve turist diyaresi oluşturan bakteridir (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

İnsanda en sık hastalık oluşturan bakteri türdür. İnsan ve hayvan bağırsak sistemlerinin normal florasında bulunan bir bakteri olmasına rağmen bazı suşları patojenik özelliğe sahiptir. Basit üriner sistem hastalıklarının %90' ını oluşturmaktadırlar (International Standard, 2017).

Normal florada bulunup aynı zamanda patojenik özellik göstermesi nedeniyle virülans faktörlerinin (transpozon, bakteriyofaj, plazmid) tespit edilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994).

Almanya'da 2011 yılının Mayıs ve Haziran aylarında hemorajik üremik sendrom salgınına rastlanmış ve bunun bir enterohemorajik *E.coli* (EHEC) O104:H4 suşundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu suşun doğrulanması için yüksek verimli dizileme teknolojileri uygulanmış ve salgın devam ederken gerçek zamanlı olarak salgın türünün genomu ve kökenleri tanımlanmıştır (; T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI, 2011).



Şekil 2.1. A) *E.coli* B suşu REL606, tipik bir basil şeklinde morfolojiye sahiptir (Taramalı elektron mikroskopu görüntüsü). B) *E.coli* O119:HND suşu A111 (saç benzeri pili üreten bir enteropatojenik suşun elektron mikroskopu görüntüsü) (Zimmer, 2008).

a- Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC):

İki farklı ekzotoksinden (ısıya duyarlı veya ısıya dirençli) birini salgılarlar ve hastalığa neden olurlar. Bu toksinleri üretebilen *E.coli'* ler genellikle O6, 8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 92, 115, 128ac, 139, 148, 153, 159 ve 167 serotipleridir. Hastalık genellikle ağız yoluyla alınan kontamine olmuş gıdalardan ve sulardan bulaşır. 1-2 günlük kuluçka dönemini geçirdikten sonra karın ağrısı, bulantı, ateş ve diyareye sebep olur (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

b- Enteropatojenik *E. coli* (EPEC):

E.coli' lerin O55, 86, 111, 119, 126, 127, 128ab, 142 serotiplerinde görülür. Ekzotoksin üretmezler. Kontamine yiyecek ve sularla ağız yoluyla alındıktan sonra ince bağırsak hücrelerine yerleşirler. EPEC genellikle anne sütü almayan yeni doğanlarda görülür (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

c- Enteroinvaziv *E. coli* (EİEC):

Bağırsak hücrelerine yerleşerek hastalık yapan bakterilerdir. İnvazin yapan türler *E.coli* O28ac, 2, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152 ve 164 serotipleridir. Genellikle gelişmekte olan ülkelerde diyareye neden olur (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

d- Enteroagregatif *E. coli* (EAggEC):

Bağırsak hücrelerine tutunarak hastalığa sebep olurlar. Bu gruptaki bakteriler toksin salgılamazlar (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

e- Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)

İnsanlarda en sık gastrointestinal enfeksiyona yol açan ve 50'den fazla serotipi bulunan gruptur. EHEC ürettiği verotoksin insanlarda hemorajik kolit (HC), hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombotik trombositopenik purpuraya (TTP) neden olur. Bakterilerin oluşturduğu verotoksinler sonucu kolon endotel hücrelere bağlanarak hemorajik kolit oluştururlar. Az pişmiş et, pastörize edilmemiş süt ile bulaşırlar. Enterohemorajik *E. coli* serotipleri O26:H11, O91:H21, O111:H8, O157:MN ve O157:H7 olup insan hastalıklarıyla ilişkilidir (Lazcka, Campo, & Munoz, 2007; Miesfeld, 1999).

E.coli O157:H7 serotipi en tehlikeli hastalıklara neden olmakla birlikte Japonya, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devleti'ndeki hastalardan en sık izole edilen türüdür.

2.2.1.1. *E.coli* O157:H7

Tarihçesi

E.coli' nin EHEC grubuna giren, günümüzdeki en tehlikeli gıda kaynaklı patojendir. *E.coli* O157:H7 ilk olarak 1982 yılında Amerika Birleşik Devleti' nde hasta insanlarda hemorajik kolit ile seyreden iki salgından izole edilerek patojen olarak kabul edilmiştir. Çocuklarda ve yaşlılarda ölüm ile sonuçlanan hastalıklara neden olmaktadır (Kell, Kaprelyants, Weichart, Harwood, & Barer, 1998).

Özellikleri

E.coli O157:H7 ile ifade edilen serotipi somatik (O) antijen 157 ve flagella (H) antijeni 7 bulundurmasından ismini almaktadır. *E.coli* O157:H7 suşlarının iki tip şigatoksini vardır; verotoksin1 ve 2 bunlardan birini ya da ikisini birden üretebilmektedir. Bu bakteri β-glukuronidaz üretememesi ve D-sorbitol fermantasyonu 24 saaten fazla sürede oluşturması sebebiyle karakteristik özelliğe sahiptir. 4-metilumbelliferil-D-glukuronid (MUG) hidrolize edebilir. *E.coli* O157:H7 optimum üreme pH' sı 7 olmasına rağmen pH 4-9 arasında da gelişim gösterdiği görülmüştür. Optimum üreme ısısı 37°C olmasına karşı 10-50°C'de de üreme göstermektedir. Günümüzde *E.coli* O157:H7 serotiplerini tespiti edilebilmesi için ticari olarak üretilen latex aglütinasyon testleri sayesinde daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (Çakır & Çakmakçı, 2015) (Fukushima & Gomyada, 1999). *E.coli* O157:H7'nin, gıdaları ısıtma, soğutma, dondurma, asit ortam ve düşük pH'a maruz bırakma gibi yöntemler kullanılarak öldürülebileceği bildirilmektedir (Perna vd., 2001).

Genetik Yapısı

E.coli O157:H7 kromozomu 5.5 megabaz (Mb) olup, 4 Mb'lık kısmı tüm *E.*coli' lerde ortaktır ve 1.5 Mb'lık kısmı O157:H7' ye özgü genleri içermektedir (Moter & Gobel, 2000).

Enfektif Özellikleri

E.coli O157:H7 enfeksiyonları *Salmonella* ve *Campylobacter* enfeksiyonlarına oranla daha az görülmesine rağmen, hastaneye yatış ve ölüm oranı diğer bakteri enfeksiyonlarına göre daha yüksektir (Kpichhardt, 2004).

E. coli O157: H7 enfeksiyonu için spesifik bir tedavi yoktur. Antibiyotik kullanımı sonucu yan etki oluşabilir. Bu nedenle *E.coli* O157:H7 enfeksiyonu için daha etkili tedavi yöntemleri gerekmektedir (Kell, Kaprelyants, Weichart, Harwood, & Barer, 1998).

Patojen bakteri vücuda alındıktan sonra inkübasyon periyodu 3-8 gün arasında değişmekte ve genellikle karında kramplar, kusma, mide bulantısı, gastroenterit, ishal, kanlı ishal ve hemorajik kolit gibi klinik semptomlara neden olmaktadır (Reece & Campbell, 2008).

E.coli O157:H7 enfeksiyonları çoğunlukla ışıl işlem görmemiş et ve et ürünlerinden, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinden bulaşmaktadır. *E.coli* O157:H7 bakterisinin insan tespit edilen ilk olgunun iyi pişirilmemiş hamburger etinden kaynaklandığı bilinmektedir. Bakterinin oluşturduğu toksik etki HC ve "hemolitik üremi sendromu" na (HUS) (böbrek yetmezliği) neden olmaktadır (Yoon, Lim, Park, & Hovde, 2005).

1982'den 2002'ye 'ye Hasta Kontrol ve Önlem Merkezine bildirilen *E.coli* O157:H7' ye ait 350 salgından, %52' si gıda kaynaklı, %21' i bilinmeyen nedenle, %14' ü kişiden kişiye bulaş, %9' u suyla taşınma ve %3'ü hayvan teması ile meydana geldiği bildirilmiştir (Latimer, 2016).

Amerika Birleşik Devleti'nde bulunan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin araştırmalarına göre *E.coli* O157:H7 enfeksiyonlarına yakalanma oranının 73.000 olduğu ve 60 ölüme sebep olduğu tahmin edilmektedir (Cox, 1999). *E.coli* O157:H7 bakterisinin neden olduğu en büyük salgın 1996 yılında Japonya'da kontamine olmuş fasulye filizlerinin 7.966 kişiyi enfekte etmesiyle ortaya çıkmıştır. Çalışmalar sonucu enfeksiyonun kontamine sığır ürünlerinden kaynaklandığı görülmüştür. Enfeksiyonu önlemek için sığırlara aşılama yapılması, inhibitörlü yemlerin ve yem katkı maddelerinin kullanımı, probiyotik kullanılması önerilmiştir (Lim, Yoon, & Hovde, 2010).

Et örneğinin bu mikroorganizmayla kontaminasyonu, sağlıklı sığırların intestinal sisteminde doğal florasında bulunan bakterinin kesim sırasında dışkıyla sağlıklı sığır etlerine bulaşmasıyla oluşmaktadır (Hayes, 1995; Onoeu vd., 1999).

Asit Direnci

Bakterilerin düşük pH derecelerinde kendilerini koruması nedeniyle asit direnci oluşturduğu gösterilmiştir. Gıdalar ile alınan bakteriler ilk olarak midedeki düşük asit derecesine maruz kalmaktadır. Bu düşük asit derecesine rağmen hayatta kalabilen bakteriler bağırsaklara ilerleyerek enfeksiyonlara sebep olmaktadır. *E.coli* O157:H7 bu özelliği sayesinde düşük enfeksiyöz dozda bulaşıcı olur ve hastalık yapar (Özkaya & Cömert, 2008).

Yapılan çalışmalar sonucu *E.coli* O157:H7 suşlarının asit direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Benjamin & Datta, 1995; Campbell & Choy, 2001).

E.coli O157:H7 ısı ve asit toleransı sayesinde ekzopolisakkarit üretimi ve membranında bulunan lipit bileşiminde değişikliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Tutar, Köksalan, & Akyol, 2015).

Yapılan çalışmalarda *E.coli* O157:H7'nin mayonez, elma sirkesi, peynir, yoğurt, et ürünleri gibi düşük pH değerlerine (≤ 4.5) sahip fermente gıdalarda hayatta kaldığı bildirilmiştir (Çakır & Çakmakçı, 2015).

İzolasyonu

E.coli O157:H7 bakterisi gıdalarda düşük sayıda bulunması bile hastalık yapmaktadır, bu yüzden 25 gram (gr) / mililitre (ml) miktarında gıdalarda var/yok analizleri ile tespit edilmektedir (Benjamin & Datta, 1995). *E.coli* O157H:7 bakterisinin gıdadan izolasyonu için selektif zenginleştirme besiyeri ve selektif agarlar kullanılmıştır. Selektif zenginleştirme besiyeri olarak en çok modifiye- Tryptic Soy Broth (TSB) kullanılırken, selektif agar olarak cefixim-tellurit (CT) ile desteklenmiş Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) kullanılmıştır. Gıda maddesinde bulunan diğer refakatçi bakterilerin varlığı yanlış negatif sonuçların verilmesine sebep olabilmektedir. Yanlış negatif sonuçlarının önüne geçebilmek için klasik yöntemlerin yanında serolojik, genetik ve enzimatik testler uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Mevcut besiyerinde üreme sonuçlarının serolojik testlerle doğrulanmasının şart olduğu gösterilmiştir (Jalava, 1993).

İmmünomanyetik ayırma (IMS), gıda örneklerine yapılan zenginleştirmelerinden *E. coli* O157: H7 gibi hedef patojenik bakterileri tespit etmek için yararlı bir yöntemdir ve hayvansal ürünler gibi yüksek arka plan matrikslerine yaygın olarak uygulanmıştır (Bennet, MacPhee, & Betts, 1996; Mead vd., 1999; Threlfall, 2008).

IMS teknikleri, hedef bakterileri yakalamak için patojene özgü antikorlarla kaplanmış mıknatıslanabilir boncukları kullanır, patojeni gıda matriksinden ve mikrofloradan bu sayede ayırır (Duffy vd., 2000).

2.2.2. *Salmonella*

Tarihi

Theobald Smith ve Daniel E. Salmon 1886 yılında domuz kolerasını araştırırken hareketli bir Gram negatif basilin izolasyonunu bildirmişlerdir. Bu hareketli organizmaya

Bacillus cholerea-suis adı verilmiştir, 1900 yılında keşfedilmiş bu organizmanın adı yapılan çalışmalar sonucu *Salmonella enterica* serovar *Cholerae-suis* olarak değiştirilmiştir (Roy, 2012).

Özellikleri

Genel olarak 2.0-5.0 µm boyunda 0.7-1.5 µm çapına sahip basil şeklinde Gram negatif, aerob veya fakültatif anaerop olup 20°C – 40°C arasında üreyebilen bakterilerdir. *Enterobacteriaceae* familyası üyesi, hareketli, sporsuz, laktozu fermente edemeyen, sülfiti indirgeyerek Hidrojen Sülfür (H_2S) üreten, üreaz enzimi içermeyen bakterilerdir. Glikozu fermente ederek genellikle gaz oluştururlar, sitrat pozitiftirler. Gıda maddelerinde sık rastlanan bir bakteri olmasına rağmen az sayıda bulunmasından dolayı iki aşamalı zenginleştirme işlemleri yapılmıştır. İlk aşamada seçici olmayan ön zenginleştirme yapılır ikinci aşamada ise seçici zenginleştirme işlemi uygulanarak gıdada az sayıda bulunan mikroorganizmanın çoğalması sağlanır ve seçici besiyerinde tespit edilmeyi kolaylaştırır. Seçici agar besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekim yapılır, üreyen kolonilerin identifikasyonu için serolojik, biyokimyasal, bakteriyofaj tiplendirmesi ve enzimli saptama yöntemleri uygulanır (Jalava, 1993).

Serotiplendirme

Salmonella ssp., ısıya dayanıklı lipopolisakkarit (O) antijeni ve ısıya dayanıksız flagellar protein (H) antijenlerine göre serotiplerine ayrılmıştır. Tek başına O antijeni incelemesi *Salmonella ssp*. için spesfik değildir, Kauffmann - White Salmonellaların serotiplendirme şemasını tanımlamış ve dünyada kabul edilen bir yöntem olmuştur (Nataro & Kaper, 1998).

S.enteritidis türünün Gram negatif, hareketli, genellikle laktoz negatif, nitrat, H_2S, sitrat ve lizin dekarboksilaz pozitif olduğu gösterilmiştir. İnsanda ve sıcakkanlı hayvanlarda enfeksiyon oluşturan serovarların büyük çoğunluğunu ve A, B, C1, C2, D ve E somatik antijen gruplarındaki suşların çoğunu içerdiği bildirilmiştir. Bu alt türdeki serovar sayısı bilinen serovarların %59,3' ü olduğu halde yapılan izolasyonların %99,5' inden, insan izolatlarının da %99' dan fazlası bu alt türden olduğu bildirilmiştir. Salmonellaların, lokal apseler ve enfeksiyonlara, gastroenterit, septisemi, paratifo, tifo gibi geniş bir enfeksiyon spektrumu oluşturduğu bildirilmiştir (Semanchek & Golden, 1998).

Salmonella bakterileri kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu insanlarda ve hayvanlarda gastroenterit, septisemi gibi enfeksiyonlara neden olması sonucu alt türleri incelenmiştir. *Salmonella enterica* 6 alt türe ayrılmış ve bu türler oranları ile bildirilmiştir (Semanchek & Golden, 1998).

Çizelge 2.1. *Salmonella enterica* alt türleri (Semanchek & Golden, 1998).

		Serovar	
		Sayısı	Oranı
Salmonella enterica subsp. *enterica*	(I)	1547	% 59.3
" " " *salamae*	(II)	513	% 19.7
" " " *arizonae*	(IIIa)	100	% 3.8
" " " *diarizonae*	(IIIb)	341	% 13.1
" " " *houtenae*	(IV)	73	% 2.8
" " " *indica*	(VI)	13	% 0.5
Salmonella bongori	(V)	23	% 0.9
		2610	

Hastalık etkisi

İnsan ve besi hayvanlarının mutlak patojenidir. Kümes hayvanlarından, yumurta, süt ürünleri, kontamine olmuş su ve gıdalardan insanlara bulaştığı bildirilmiştir (Shulman, Friedmann, & Sims, 2007). Hastalık oluşturan serotipleri; *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*' dir. *S. typhi* serotipi tifo hastalığına neden olmuştur (International Standard, 2017).

Sıcakkanlı hayvanlarda %99 oranında *S. enterica* alttürlerinin hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda salmonellozun klinik belirtileri; enterik ateş, invazif hastalık (nontifoidal) ve gastroenterit şeklinde hastalıklara neden olduğu görülmüştür. Gastroenterik enfeksiyon genellikle daha hafif seyirli olup 12-48 saat inkübasyon süresine sahip akut hastalıktır. Yaşlılar, çocuklarda ve bağışıklığı zayıf olan kişilerde daha şiddetli görülebilmektedir. Enfeksiyon görülen kişilerde tifo ateşi olarak bilinen enterik ateş görülmüştür. Tifo ateşi, ince bağırsakta bakterinin bulunması ve lenfoid organlarda enflamasyon yapması nedeniyle uzun süreli ateşa neden olur. Enterik ateş tedavisi için antibiyotik kullanımı önemlidir (Roy, 2012).

3 milyar insanının her yıl *Salmonella* enfeksiyonlarına yakalanır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 22 milyon kişi tifo ateşine yakalanırken 200.000 kişide ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Crick, Barnett, & Watts-Tobin, 1961).

Günümüzde milyonlarca insan gıda kaynaklı hastalıklardan ölmektedir. Dünya genelinde 93,8 milyon insanda *Salmonella* infeksiyonu görüldüğü ve bunların 155.000' inin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Klijn, Molecular Techniques for the identification and detection or microorganisms relevant for the food ındustry., 1996).

Salmonella' lar için minimal enfeksiyon dozu (MID), *Salmonella*' nın serotipine bağlılığının yanında, mikroorganizmanın içinde bulunduğu gıdanın türüne bağlıdır. Çocuklarda, yaşlılarda, ağır hastalık geçirmiş, radyoterapi, kemoterapi görmüş kişilerde *Salmonella*' nın enfeksiyon dozunun 10^2 koloni oluşturan birim/gram (kob/g)' a kadar indiği görülmüştür (Chapman, 2000; Crump, Luby, & Mintz, 2004). Manual of Systematic Bacteriology' de hastalığa neden olan doz 10^8- 10^9 kob/g olarak belirtilmiş olmasına rağmen, daha düşük sayıda bile (10^5 kob/g ve üzeri) hastalık yaptıkları bildirilmiştir. Çikolata gibi mide pH' sını yükselten gıdalar için, 10^2 kob/g kadar düşük dozların bile hastalık oluşturabildiği gözlenmiştir (Crump, Luby, & Mintz, 2004; Haimovich & Venkatesan, 2006; Hothcox, Beuchat, & Dolye, 1995).

Kanatlı etleri ve bunlardan oluşan tüketime hazır ürünlerin dünyada *Salmonella*' ların pek yaygın görülen gıda zehirlenmelerini meynada getirdiği belirtmiş (Castanie-Cornet, Penfound, Smith, Elliott, & Foster, 1999). *Salmonella* enfeksiyonlarının, insanlarda üç farklı sendroma yol açtığı görülmüştür. Bunlardan ilki *S.typhi*'nin neden olduğu tifo, en ciddi sendromdur, ikinci grupta enterik hastalıklar yer almıştır. Üçüncü grupta ise salmonellozisin en yaygın tipi olarak bilinen gastroenterit (gıda zehirlenmeleri) yer almıştır (Crump, Luby, & Mintz, 2004; DİATEK, 2014).

Asit direnci

Gıda kaynaklı zehirlenmelerde yapılan çalışmalar sonucu fermente et ve süt ürünlerinde, asidik fermente meyve sularında, mayonezde aside tolerans geliştirmiş bakterilerin hastalık yaptığı bildirilmiştir (Reece & Campbell, 2008; Tağı, 2017).

Aside direnç kazanmış bakterilerin gıdada bulunması insan sağlığı açısından büyük öneme sahiptir (Schlech, Chase, & Badley, 1993). *Salmonella*' ların minimum üreme pH değeri 3,8, optimum 7- 7,5, maksimum 9,5 olduğu bilinmektedir. Su aktivitesi

değeri düştükçe pH değeri yükselmekte ve bakteri gelişimine izin vermektedir (Crump, Luby, & Mintz, 2004).

S. typhimurium asit adaptasyon çalışmasında, pH 5,8 ± 0,1 'de HCl aside maruz bırakılarak gelişmesi gözlemlenmiştir. Aside adapte olan *S. typhimurium*' un yaşama süresinin uzadığı görülmüştür. Kontrol hücreleri ve aside adapte edilmiş *S. typhimurium*' dan 1 ml alınarak 99 ml E buffer ve %8 sodyum klorür (NaCl) (Vogal Bonner Minimal Mdium and Glucose)' da 4° C ve 25° C ' de inkübasyonu sonucu Plate Count Agar (PCA) besiyerinde farklı zamanlarda hücrelerin canlılığı izlenmiştir. Asit adaptasyonun diğer çevresel streslere karşı toleransı da incelenmiştir. Aside adapte edilmiş hücrelerin ısı, tuz ve organik asitlere karşı çeşitli streslere toleransının arttığı tespit edilmiştir. Soğuğa (3±0.1°C) karşı adaptasyonu görülmemiştir (Tosun & Gönül, 2003). Çalışmanın sonuçları incelendiğinde asit adaptasyonunun çeşitli çevresel streslere karşı direnç kazanımına neden olduğu bildirilmiştir. *S. typhimurium*' daki asit adaptasyonunun tuz, ısı ve organik asit streslerine karşı da direnç kazandırdığı gösterilmiştir. Hücrelerdeki asit adaptasyonunun yiyeceklerde hayatta kalmak için önemli bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak, gıda güvenliği sistemlerini geliştirmek ve gıda kaynaklı hastalıkları önlemek için aside adapte edilmiş hücrelerin çevresel streslere uyum mekanizmasının anlaşılmasının gerektiği bildirilmiştir (Schlech, Chase, & Badley, 1993).

Türkiye'deki gıda kaynaklı enfeksiyonlar hakkında yeterli veri bulunmamakla birlikte *Salmonella ssp.*' lerin hastalık etkisi Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından 2004 yılında araştırılmıştır. TÜİK verilerine göre 4.135 kişinin *Salmonella* sebebiyle hastanede tedavi gördüğü belirlenmiş ve 35 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Bu sebeple, *Salmonella* türlerinin gıdalarda ve et ürünlerinde, bunların kullanıldığı mamullerde taramasının yapılması gıda hijyeni konusunda ve insan sağlığının korunması açısından önemli bir gereklilik teşkil etmektedir (Aydın, 2017).

2.3. Gıda Kökenli Patojenlerin İzolasyonunda Karşılaşılan Sorunlar ve Besiyerlerinin Geliştirilmesi

İnsanlar sağlıklarını koruyabilmesi için tükettiği gıdaların güvenli ve sağlığı tehdit edici unsurlar içermemesi gerekmektedir. Bu nedenle, günümüzde gıda güvenliği ve gıdaların hijyeni büyük önem arz etmektedir. Gıdaların yapısında bulunan protein,

karbonhidrat, yağlar ve çeşitli organik asitler, alkoller, selüloz, pektin, aldehit gibi bileşiklerin yıkılması sonucu gıdalarda istenmeyen tat ve kokunun ortaya çıkması isegıdaların bozulması şekilde tanımlanmıştır ve saprofit mikroorganizmalar genellikle bozulmaya neden olur. Gıdalarda risk oluşturan etkenlerin başında biyolojik etkenler yer almaktadır (Michino vd., 1999).

BİYOLOJİK ETKENLER

BAKTERİLER	KÜFLER	VİRAL AJANLAR	PARAZİTLER	HAYVANLAR
Bacillus cereus	*Aspercillus flavus*	Hepatitis A	Giardiazis	Kuşlar
Campylobacter jejuni	*Fusarium spp.*	Norwalk-benzeri virüsler	Helmintler	Böcekler
Clostridium botulinum	*Penicillium citreoviride*	Rotavirüs	Trişinellozis	Kemirgenler
Clostridium perfringens	*Penicillium toxicarum*	Astrovirüsler		
Listeria monocytogenes	*Claviceps purpurae*	Calcivirüsler		
Salmonella spp.	*Aspercillus ochraceus*	Adenovirüsler		
Shigella spp.	*Penicillium viridicatum*	Parco virüsler		
Stapylococcus aureus	*Penicillium patulum*			
Vibrio cholerae	*Penicillium expansum*			
Yersinia enterocolytica	*Fusarium graminearum*			
	Fusarium roseum			
	Fusarium poae			
	Fusarium versicolor			
	Aspergillus nidulas			

KİMYASAL ETKENLER

KALINTILAR	ENDÜSTRİYEL KİMYASALLAR	AĞIR METALLER	iZOTOPLAR
Antibiyotikler	Heksabromobifeniller	Arsenik	Sezyum 137
Klorinli insektisitler	Poliklorinlibifeniller	Bakır	İyodin 131
Organofosforlu insektisitler	Vinilklorid	Kadmiyum	Potasyum 40
		Kurşun	Stronsiyum 90
		Civa	
		Selenyum	

FİZİKSEL ETKENLER

Kirlilik
Cam tozları
Boya kabukları (sıyrıntılar)
Metal tozları

Şekil 2.2. Gıdalarda risk oluşturan etkenler (Michino vd., 1999).

Gıdalarda mikrobiyal gelişmeyi etkileyen pH, su aktivitesi, besin içeriği, mikrobiyal yükü, gıdanın görmüş olduğu önişlemler (kurutma, dondurma, ışıl işlem, nemlendirme…) bozulmada önemli etkilere sahiptir. Gıdalarda mikrobiyal yükün çoğalması saklama koşullarına, gıdalara uygulanan işlemlere ve depolama koşullarına bağlıdır. Gıdaların mikrobiyal florası, gıdalardaki doğal mikroorganizmalar ve çevreden

bulaşan mikroorganizmalardan meydana gelir. Taşıma, depolama işlemleri sırasında hijyen zincirinin kırılması sonucu gıdaya patojen mikroorganizma bulaşması, çoğalması mikroorganizmanın kritik değerlere ulaşması sonucu insanlarda gıda zehirlenmesi meydana gelir. Patojen mikroorganizmanın ve onun ürettiği toksini içeren gıdanın tüketilmesi sonucu oluşan hastalıklara "Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar" denilmiştir (Hayes, 1995; Michino vd., 1999).

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların International Organization for Standardization (ISO) yöntemleri uygulanarak tespit edilmesi zaman almaktadır. ISO yöntemleri uygulandığında, kullanılan besiyeri miktarı artırmakta, çapraz kontaminasyon, yakın aileden mikroorganizmaların üremesive besiyerinde yoğun üreme sonucu patojenin izolasyonu zorlaşmaktadır. Yeni geliştirilen ticari kitler patojen mikroorganizmaların gıdalarda varlığını tespit etme süresini kısaltmakta fakat maliyeti arttırmaktadır. Çalışmamızın yapılmasının nedeni laboratuvar ortamında enterik bakterilerin izolasyonunun hızlandırılması, kültürel metodların hata paylarını azaltmak ve maliyetinin düşürmesidir.

Çalışmada %0.5' lik sodyum klorür (NaCl) ile 1 N (Normal) hidroklorik asit (HCl) solüsyonunun dilüsyonları kullanılarak düşük asit direncine sahip patojen mikroorganizmaların gıdalardan izolasyonu amaçlanmıştır. HCl asit dilüsyonları sayesinde patojen mikroorganizmaların ISO yöntemleri ışığında, daha az besiyeri kullanılarak ve kısa zamanda gıdadaki mevcut mikroorganizmaların izolasyonunu gerçekleştirmek hedeflenmiştir. Türkiye' de aside dirençli olan suşların gıdalardan daha kolay izolasyonu için zenginleştirme kullanılarak veya kullanılmadan patojen mikroorganizmaların izolasyonu çalışılmıştır. ISO yöntemlerinde kullanılan besiyerleri başka mikroorganizmaların üremelerine imkan sağlayacak içeriğe sahiptir, bu yüzden HCl asit dilüsyonları kullanılarak gıdada bulunan istenilmeyen mikroorganizmaların uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle seçici izolasyon tekniği ilk kez asit solüsyonları ile test edilmiştir.

European Food Safety Authority'nın son raporlarında Avrupa Birliği ülkelerinde 2010' da toplam 99020 doğrulanmış gıda kökenli enfeksiyon olgusu görüldüğü, insanlarda salmonellozun tüm vakaların %31' ini oluşturduğu görülmüştür. 2012 yılının bir döneminde İngiltere'de 598 olgu bildirilmiş ve bu olgularda

S. enteritidis ve *S. enteritidis* PT4 ön planda yer almıştır. Hastalıklara neden olan gıdalarolarak ilk sırada yumurta ve yumurta ürünlerinin bulunduğu belirtilmiştir (Majowicz vd., 2010).

Avustralya'da 2009 yılında OzFoodNet' in rapor ettiği 9533 salmonellozdan en çok etkilenen yaş grubunun 0-1 yaş olduğu ve 2 yaş üzerinde etkilenme oranında belirgin bir düşüş görülmüştür. Serotip dağılımına bakıldığında, %41 ile *S.typhimurium* ilk sırada yer almaktadır. İnsanlardan sıklıkla izole edilen diğer serotip *S. enteritidis* olarak rapor edilmiştir (Escherich, 1988).

Asya' da bildirilen vaka sayısı 22,8 milyon olup, ölümle sonuçlanan olgu sayısının ise 37600 olduğu bildirilmiştir. Tüm dünyada olduğu gibi *S. enteritidis* ve *S. typhimurium* ilk sıralarda yer almış ve Asya' nın güneydoğusunda *S. weltevreden* ve *S. stanley* gibi değişik serotipler de görülmüştür (Escherich, 1988).

Afrika ülkelerinde de gıda kaynaklı enfeksiyonların bildirim ve taramalarında eksiklik görülmüştür. *Salmonella* açısından bakıldığında tifoidal olmayan enfeksiyonların diğerlerine göre daha yüksek oranda olduğu görülmektedir. 3-5 yaş arası çocuklarda salmonellozisin görülme sıklığı her 100000 çocukta 175–388 vaka olarak bildirilmiştir. Afrika' da da *S.enteritidis* ve *S. typhimurium* %26 ve %25 oranıyla en sık görülen serotiplerdir (Cox, 1999; Escherich, 1988).

Japonya' da düşük oranda ölümle sonuçlanan yaklaşık 30000 vakanın görüldüğü rapor edilmiştir. 2011 verilerine bakıldığında *S. enteritidis*' in ilk sırada olduğu bildirilmektedir. Japonya' da dünyadan farklı olarak *S. typhimurium* serotipi, *S. infantis* ve *S. saintpaul*' dan sonra beşinci sırada yer almaktadır (Tosun & Gönül, 2003; Escherich, 1988).

Türkiye' deki gıda kaynaklı enfeksiyonları hakkında yeterli veri bulunmamaktadır ve *Salmonella ssp*.' lerin neden olduğu vaka sayısı en son Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından 2004 yılında kayıt altına alınmıştır. Bu verilere göre 4135 kişinin *Salmonella* nedeniyle hastanede tedavi gördüğü ve 35 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Tosun & Gönül, 2003).

2.3.1. *Salmonella ssp*. ve *E.coli* O157:H7 izolasonu için geliştirilen yöntemler:

Salmonella ssp., Listeria monocytogenes, E. coli O157:H7 serotipi gibi gıda kaynaklı birincil patojenler gıdalarda bulunmamalıdır. Bu nedenle bu tür patojenler için genellikle var/yok testleri uygulanmıştır. Çoğu uluslararası standart analiz edilecek gıda miktarını 25 g ya da 25 ml olarak belirlenmiştir (Melton-Celsa, Darnell, & O'Brien, 1996).

E.coli varlığını saptamak için Enzime bağlı immünoassay (ELISA), PZR-ELISA (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Enzime bağlı immünosorbent assay), PZR-elektroforez, Real time PZR (Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi metodlar bulunmaktadır. *Salmonella* için ELISA, sandwich ELISA, PZR-ELISA yöntemleri servorların belirlenmesinde kullanılan teknikler arasında yer almıştır (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004).

Gıda zehirlenmelerinde enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tespit edilmesi insan sağlığı açısından çok önemlidir. Klasik yöntemlerin yanında patojenlerin hızlı izolasyonunu sağlayan teknikler mevcuttur:

- Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)
- Hidrofobik Grid Membran Filtre Tekniği (HGMF)
- Direkt Epifluorensans Mikroskopi Tekniği (DEFT)
- Enzim İmmunoassay Yöntemi (Michino, vd., 1999).

Birçok alanda yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler, gıdalardaki hedef mikroorganizmanın saptanmasında güvenli bir alternatif metod olarak büyük önem kazanmıştır. Mikroorganizma sayılarının belirlenmesi, mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonunda (kimliklendirilmesinde) duyarlılıkları ve kısa sürede sonuç alınabilmesi gibi nedenlerden ötürü, moleküler biyolojik yöntemlerin önemi her geçen gün hızla artmaktadır (Özakın vd., 2013).

Gıdalarda *Salmonella* serotiplerinin tespit edilebilmesi için piyasada en az 15-20 adet ticari hızlı test sistemi geliştirilmiştir. Bu testlerle farklı gıda örneklerinden patojen bakterilerin izolasyon çalışmaları, her bakteride farklılık göstermektedir. Bununla birlikte kabul gören hızlı testlerde sadece negatif sonuçların kesin olduğu kabul edilir. Pozitif olduğu tahmin edilen sonuçların standart yöntemlerle mutlaka doğrulanması gerekmektedir. Bununla birlikte hızlı yöntemlerin dezavantajlarından biri de başlangıç

aşamasında çoğunlukla bir kültürel zenginleştirme aşamasına ihtiyaç duyulmasıdır (Çakır & Çakmakçı, 2005).

A) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Son yıllarda bakterilerin tanımlanmasında kullanılan genotipik yöntemlerin, fenotipik yöntemlere göre tiplendirilebilirlik, tekrarlanabilirlik bakımından daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Ayrıca, geleneksel analiz metodlarının moleküler yöntemlere göre istatistiksel değerlendirme ve uygulanmasında hata olasılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, geleneksel analiz metotları ile izolasyon ve kimliklendirme için gerekli süre uzun olup, laboratuvar yükünün daha fazla olduğu ifade edilmiştir (Lodish vd., 2000).

Gıda kaynaklı mikrobiyal enfeksiyonlara neden olan patojen mikroorganizmaların PZR ile tanımlanması, hedef patojen mikroorganizmanın Deoksiribonükleik Asit (DNA)' sının spesifik DNA ekstraksiyon kiti ile izole edilmesiyle gerçekleştirilir. PZR tekniğinde, gıdalardan izole edilmiş saf kültürler kullanıldığından kontaminasyon riskinin az, ön zenginleştirmesi yapılan gıda kaynaklı suşların klasik yöntem analizlerinde kontaminasyon riskinin daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Sincer, Şenyuva, & Gilbert, 2010).

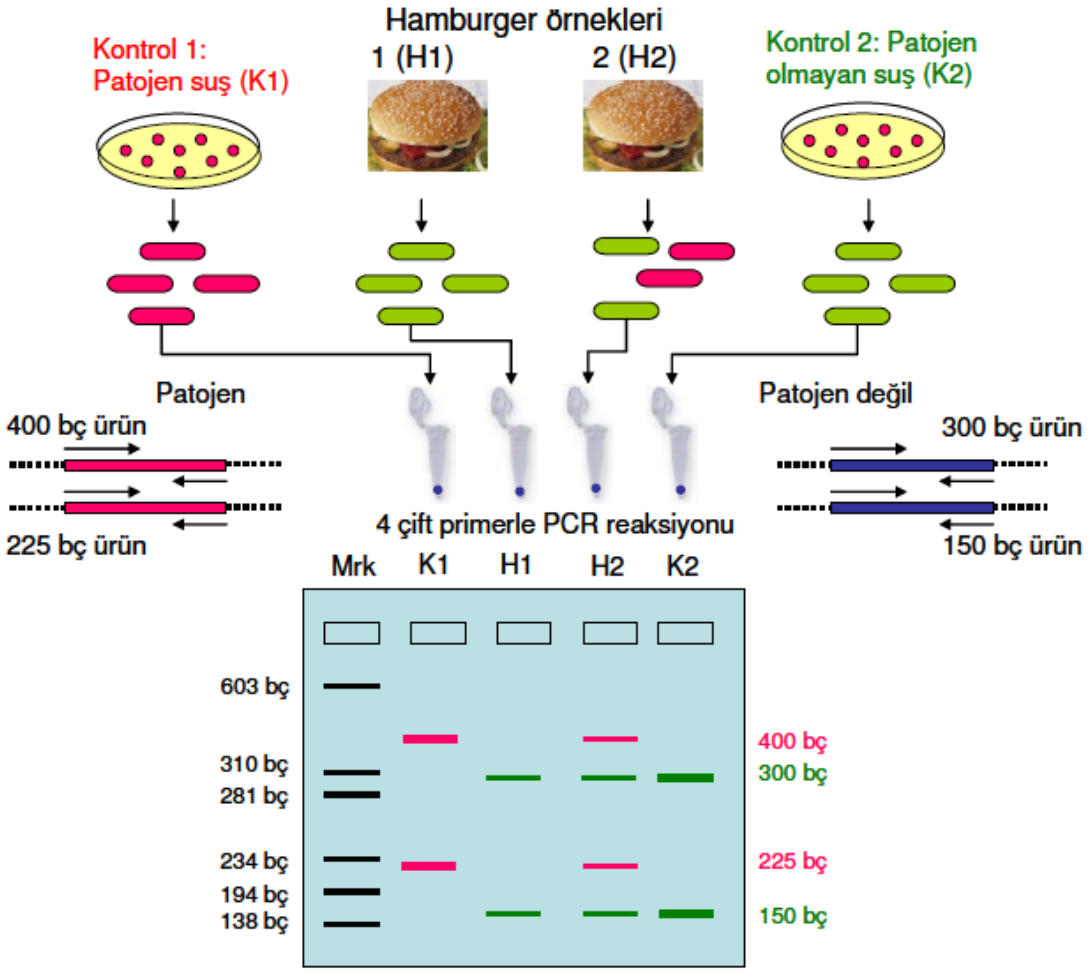
PZR reaksiyonu üç basamakta gerçekleşmektedir. Sırasıyla;

- Denatürasyon (denaturation), hedef DNA çift zincirinin açılması 94°C' de 30-90 saniye
- Primerin bağlanması (annealing) 55-60°C' de 0.5-2 dakika
- Primerin uzaması (extension) 72°C' de 1 dakika olarak uygulanır.

Bu sıcaklık döngüsü 30-35 defa tekrar ettirildikten sonra polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesi için son aşamada 5 dakika daha beklenerek reaksiyon tamamlanması sağlanır. Bir sonraki kullanımına kadar PZR ürünleri 4-25°C' de bekletilir. Her bir döngünün sonunda oluşan zincirler yeni döngünün hedef zinciri olarak görev yaparlar (Hill, Dtta, Feng, Lampel, & Payne, 2001).

Patojen mikroorganizmaların PZR yöntemi ile aranması üç aşamada gerçekleştirilir. Bunlar: Örnek hazırlama, PZR' da genetik materyal çoğaltma, agaroz jelde elektroforoz ve görüntüleme aşamasından oluşur. PZR işleminde hedef genetik

materyalin çoğaltılmasıdır. DNA' nın incelenmesinin sebebi, hücrede stabil olması (Ribonükleik Asit (RNA)' ya göre), gıda materyalinden izolasyonunun doğrudan yapılabilmesidir. Bununla birlikte analiz edilecek bakteriye göre, gıda matriksinden genetik materyalin izolasyonunda farklı ön işlemler uygulanması gerekmektedir. Örneğin su gibi sıvılarda numunenin filtreden geçirilmesi gerekirken katı gıdalarda ise uygun tamponlar içinde homojenize edilerek örnekte aranan patojen mikroorganizmanın tamamen sıvı faza geçmesi gerekmektedir. PZR işleminde kullanılacak olan DNA' nın, yeterince saf olması gerekmekte, saf olmadığı durumda PZR işlemi gerçekleşmemekte veya uygun miktarda bakteri DNA' nın çoğaltılamamaktadır. Sonuç olarak elde edilen DNA' nın PZR işleminden önce uygun miktarlarda seyreltilmesi gerekmektedir (Campbell & Choy, 2001; Jalava, 1993).



Şekil 2.3. Multipleks-PZR yöntemi ile hamburgerde *E. coli* araması (Miesfeld, 1999).

Gıdalarda PZR analizlerinin gerçekleştirilmesi sırasında DNA' nın aranılan bölgesinin hasar görmemesi (ısı uygulamaları ile yıkılmaması, enzimatik hidrolizasyon ve DNA modifikasyonu) analizin doğru sonuçlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda, gıda kaynaklı patojen mikroorganzimaların bu teknik ile tespiti için, hedef 16S rRNA (ribozomal Ribonükleik Asit) gen bölgesinin seçimi analizin doğru sonuç vermesi için gereklidir (Beneduce, Fiocco, & Spano, 2007).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time PZR) cihazlarında analiz aşamasında görüntüleme yapılır ve bu sistemde hem kalitatif hem de kantitatif DNA analizi aynı anda gerçekleştirilebilir. Real-time PZR tekniğinin klasik PZR tekniğinden farkı, işaretlenmiş PZR ürünlerinin yaydıkları floresans sinyalleri tespit edebilen optik bir okuyucunun varlığıdır. Her bir döngüde floresans sinyalin düzeyi enstrümantel olarak belirlenerek, amplifikasyon ürünleri bir yazılım sayesinde analiz edilir. Real-time PZR günümüzde, özellikle mikrobiyoloji ve adli tıp laboratuvarlarında oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Popoff, Bockemuhl, & Gheesling, 2004).

Patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında tercih edilen genotipik tiplendirme yöntemi sayesinde aynı türe ait suşlar arasındaki farklılıklar en doğru ve güvenilir biçimde ortaya konulabilmiştir (Kılıçturgay vd., 1994).

B) Hidrofobik Grid Membran Filtre Yöntemi (HGMF)

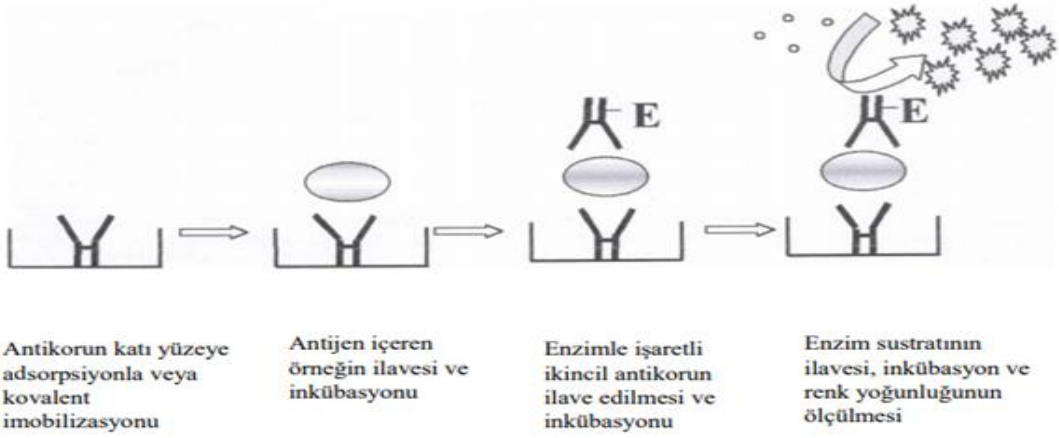
Bu yöntemde, hidrofobik hücreleri birbirinden ayıran bölmeler sayesinde mikroorganizma kolonilerinin yayılması engellenmekte ve tek bir filtre üzerinde 10^4 adet mikroorganizma kolonisini saymak mümkün olmaktadır. Bu amaçla kullanılan ISO-Grid hidrofobik membran filtreler üzerinde 40 x 40 olmak üzere toplam 1600 adet küçük bölme bulunur. Bu bölmeler içine yerleşen mikroorganizmalar inkübasyondan sonrası dairesel koloniler oluşturur. Filtre üzerinde bulunan hidrofobik özellikteki bölmeler sayesinde kolonilerin yayılarak birbirine karışması engellenmekte ve bu da sayım kolaylığı sağlamaktadır. EMS (en muhtemel sayı) yöntemi daha çok su analizlerinde kullanılmaktadır (Çakır & Çakmakçı, 2015).

C) Direkt Epifloresan Filtre Tekniği (DEFT)

DEFT yöntemi orijinal olarak 1980'lerin başlarında süt örneklerinde bakterilerin sayımı için önerilmiş ve bu amaca yönelik olarak geliştirilmiştir. Daha sonra dondurulmuş balık, et, kıyma, mayonezli salatalar, krema ve krema benzeri ürünler, peyniraltı suyu, domates salçası, şarap, meyve ve sebzeler ile su gibi değişik gıdaların analizine adapte edilerek yaygın kullanım alanı bulmuştur. Floresan boyaların yanında moleküler problar gibi belirleyiciler kullanılarak mikroorganizmanın sayımı gerçekleştirilir. Filtre uygun bir katı besiyeri üzerinde 3–6 saat inkübasyondan sonra boyanarak mikrokolonilerin daha belirgin olarak sayılması sağlanır (Duranoğlu, Yıldırım, & Koyuncu, 2008; Stevens vd., 2004).

D) Enzim İmmunoassay Yöntemi (EIA)

Enzim immunoassay'de antikor fluoresan boya yerine bir enzim ile işaretlenir ve enzim aktivitesinin renk reaksiyonuna göre ölçülmesi sonucu antijen antikor reaksiyonu saptanır. EIA' lerden en yaygın kullanılan şeklinin Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) olduğu bildirilmiştir. ELISA tekniği ile antijen aranmasında kullanılan direkt yöntem "sandwich" ya da "çift antikor" yöntemi olarak adlandırılır. Bu yöntemde aranılan antijene karşı antikor katı bir taşıyıcı yüzeye adsorbsiyonla kovalent olarak bağlanmıştır. Daha sonra, antijen saptanacak örnek ilave edilerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yıkamayı takiben enzimle işaretli antikorlar (IgG) ilave edilmiş ve tekrar inkübasyon ve yıkama işlemleri yapılmıştır. Daha sonra enzimin substratı ilave edilmiş ve oluşan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. ELISA için en yaygın kullanılan katı taşıyıcı destek ortamı, matriks olarak polystyren ve polyvinyl chloride'den yapılan plastik tüpler ya da daha yaygın olarak kullanılan 96 kuyucuklu mikrotiter plate' lerdir (Riley vd., 1983).



Şekil 2.4. Antijen Saptanmasında Sandwich ELISA yönteminin uygulanışı (Riley vd., 1983).

Ayrıca işaretlemede kullanılan enzimlerin floresans veya kemiluminesans özellikteki substratları da kullanılabilmekte ve oluşan reaksiyon ürünleri florometrik veya kemuluminometrik olarak ölçülebilmektedir (Riley vd., 1983).

Bir çalışmada toplanan 124 tavuk eti örneğinin 35 (%28,23)' inde *Salmonella ssp*.' lere rastlanılmıştır. IMS-TA yöntemiyle çalışılan bu örneklerden elde edilen sonuçlar aynı zamanda ABD Gıda ve İlaç Yönetimi (US Food and Drug Administration-FDA)' nin belirlemiş olduğu bakteriyolojik analiz kılavuzuna (Bacteriological Analytical Manual-BAM) göre uygulanan klasik yöntem ile de doğrulanmıştır. *Salmonella ssp*.' lerin klasik mikrobiyolojik kültür teknikleri yardımıyla tavuk etlerinden izolasyonu yaklaşık olarak 5 ila 7 gün sürebilmektedir (Andrews vd., 2009). Bu, IMS-TA' nın klasik mikrobiyolojik testlere göre daha pratik, daha ucuz ve çok daha kısa sürede sonuç verebilen bir tarama yöntemi olduğunu kanıtlamıştır. Bu çalışmada deneysel olarak kontamine edilen tavuklarda *Salmonella* ssp. taramasının yanında tavuk etlerinde var olan *Salmonella* ssp.' lerin bulunma oranları araştırılmıştır. Tiramid sinyal amplifikasyonu yöntemi ile, kontamine olmuş kümes hayvanı eti ve mamullerini tüketen insanların erken uyarılması ve besin zehirlenmelerinin önüne geçilebileceği öngörülmüştür. Aynı zamanda, bu tekniğe ilave çeşitli moleküler tekniklerin (PZR, NGS, Microarray, vb.) kullanılması ile gıda zehirlenmesi geçiren hastaların hangi patojen tarafından zehirlendiğinin kesin ve hızlı bir şekilde belirlenerek doğru tedavi verilmesi sağlanması amaçlanmakta olup halk sağlığının korunabileceği ve besin zehirlenmelerinden kaynaklı ekonomik kayıpların önlenebileceği düşünülmüştür (Yelboğa & Karagüler, 2012; Aydın, 2017).

Karışık mikroorganizma gruplarının klasik kültürel yöntemler ile belirlenmesinin güvenilirliğinin de oldukça sınırlı olduğu görülmüştür (Tağı, 2017). Hücrelerin bir araya toplanması veya komşu hücrelerin inhibisyon etkileri de teknik zorluklar oluşturmaktadır (CEN, 2001). *Salmonella* kültürel metotlarla izolasyonu ve belirlenmesi içinzamana ve hassas bir laboratuar çalışmasına ihtiyaç vardır. *Salmonella* aranması için kullanılan standart kültürel yöntem ile negatif örneklerin belirlenmesi en az 4 gün sürmekte ve eğer şüpheli koloniler tespit edilirse doğrulama amacıyla bu süre 2-3 gün daha uzamaktadır. Bu nedenle, *Salmonella* aranması amacıyla hızlı tekniklerin geliştirilmesine gıda endüstrisinde ihtiyaç vardır (Andrews vd., 2009).

PZR tekniklerinin otomatize edilerek rutin gıda analizlerinde çok başarılı bir şekilde kullanılabildiği gösterilmiştir. Patojen mikroorganizmaların gıda örneklerinde aranmasında gen probları indikatör (marker) olarak kullanılabildiği ve özellikle izolatların doğrulanmasında diğer doğrulama yöntemlerinden daha hızlı ve kesin sonuç alınabildiği gösterilmiştir. Ancak, Laboratuvarın kuruluş aşamasında optimize sistemlerin oluşturulması maliyeti arttırdığı için gıda mikrobiyolojisinde henüz yeterince yaygın kullanım alanı bulamamıştır (Çakır & Çakmakçı, 2015).

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

Deneylerde, Hidroklorik asit (Merck, 100317),Sodyum klorür (Merck 106404), mTryptic-Soy-Broth with Novobiocin (Merck, 109205), İmmünomanyetik partiküller (LABM,LABCAP001), Modified Phosphate Buffer (Himedia,M1341), Sorbitol MacConkey Agar (LABM, LAB161), Cefixime tellutire supplement (LABM, X161),Buffered Peptone Water (Merck, 107228),Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth(LABM, LAB202), Novobiocin supplement (LABM X150), Potasium iodide (Merck, B1375043 731) - İodine (Sigma, SZBF1270V) solution, RAPPAPORT-VASSILIADIS-Soya (Merck, 107700),Xylose Lysine Deoxycholate (Merck, 105287), Brillant Green Agar (LABM, LAB034) ve Tryptone Soy Broth (LAB004, LABM) kullanılmıştır.

3.1.2. Deneylerde kullanılan test suşları

Tespit limiti çalışmalarında *E.coli* O157:H7(ATCC 43888) ve *S.enteritidis (*ATCC 13076*)* suşları kullanılmıştır.

3.1.3. Test örnekleri

Bu çalışmada, hidroklorik asit dilüsyonları kullanılarak gıda patojenleri olan *E.coli* O157:H7 ve *Salmonella ssp.* bakterilerinin klasik yönteme göre daha etkin olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılacak örnekler Edirne ilinde bulunan marketlerden toplanmıştır.

E.coli O157:H7 ve *Salmonella ssp.* bakterilerinin gıdalardan izolasyonu için 89 adet karkas et, iki adet sucuk, iki adet kremşanti, bir adet yoğurt, bir adet marul, bir adet mayonez, bir adet taze sıkılmış meyve suyu, bir adet ketçap, bir adet fındık içi, bir adet çiğ süt ve üç adet toz çorba olmak üzere toplamda 103 örnek kullanılmıştır.

3.1.4. Test örneklerinin temin edilişi ve saklama koşulları

Çalışması yapılacak örnekler gerekli sterilizasyon koşulları sağlanarak toplanmıştır. Örnekler kontaminasyon riskinin önüne geçilebilmesi için steril torbalara alınarak poşet ağızları bulaşma olmasını önlemek için %70' lik Etil alkol kullanılarak temizlenmiştir. Steril poşetlere alınan örnekler, cinsine göre oda sıcaklığı (18°C - 27°C' de) veya +4°C' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Klasik yöntem ve HCl asit dilüsyonlarının uygulandığı örneklerin pH ve sıcaklık değerleri

Test Materyali	Ph Değeri	Sıcaklık (°C)
Taze Karkas Et	5,37 – 5,74 arasında	4,2
Sucuk	5,46 ve 5,48	4,4
Kremşanti	6,08 ve 6,05	4,5
Yoğurt	4,42	4,6
Marul	6,47	4,3
Mayonez	4,02	3,9
Ketçap	3,75	4,1
Fındık içi	4,48	20,5
Çiğ süt	6,42	4
Taze sıkılmış meyve suyu	3,86	4,5
Toz çorba	4,15	20,6

3.1.5. Test örneklerinin hazırlanması

Hidroklorik asit (HCl: Merck 100317) ve dilüsyonlarının (1/2N, 1/4N, 1/6N,1/8N ve 1/10N HCl asit) hazırlanması:

1000 ml 1 N Hidroklorik asit 916,4 ml distile su içerisine 83,6 ml HCl eklenip karıştırılarak hazırlandı. HCL asit ve hazırlanmış olan dilüsyonları oda sıcaklığında muhafaza edildi.

HCl asit dilüsyonları 10 ml olacak şekilde tüplerde hazırlandı.

1/2 N HCl asit dilüsyonu için 5 ml NaCl ve 5 ml HCl asit kullanılarak 10 ml homojen ve pH' sı 0,47 olan çözelti elde edildi.

1/4 N HCl asit dilüsyonu için 8 ml NaCl ve 2 ml HCl asit kullanılarak 10 ml homojen ve pH' sı 0,74 olan çözelti elde edildi.

1/6 N HCl asit dilüsyonu için 8,34 ml NaCl ve 1,66 ml HCl asitkullanılarak 10 ml homojen ve pH' sı 0,77 olan çözelti elde edildi.

1/8 N HCl asit dilüsyonu için 8,75 ml NaCl ve 1,25 ml HClasit kullanılarak 10 ml homojen ve pH' sı 1,00 olan çözelti elde edildi.

1/10 N HCl asit dilüsyonu için 9 ml NaCl ve 1 ml HClasit kullanılarak 10 ml homojen ve pH' sı 1,01 olan çözelti elde edildi.

Sodyum klorür (NaCl: Merck 106404) hazırlanışı:

%0,5 lik Sodyum klorür hazırlamak için 50 gr sodyum klorür 1000 ml distile su ile ısıtılarak çözündürüldü. Hazırlanan çözelti karıştırılarak otoklavda 121°C' de 15 dk sterilize edildi. Soğuduktan sonra kullanıma hazır hale geldi. Oda sıcaklığında saklandı.

E.coli O157:H7 ve *Salmonella ssp*. suşlarının tespit limiti çalışmasının yapılabilmesi için 10 ml' lik, 1/100 N HCl asit dilüsyonu için 9900 ml NaCl ve 100 µl HCl asit kullanılarak pH' sı 1,95 olan ve 10 ml NaCl den hazırlanan pH' sı 5,54 olan çözeltiler kullanıldı.

Çizelge 3.2. Tespit limiti çalışmasında ve yeni metodun uygulanması aşamasında kullanılan Hidroklorik asit dilüsyonlarının pH değerleri.

HCl asit dilüsyonları	pH değerleri
Tuzlu su	5,54
1/2 N HCl	0,5
1/4 N HCl	0,74
1/6 N HCl	0,77
1/8 N HCl	1
1/10 N HCl	1,01
1/25 N HCl	1,38
1/30 N HCl	1,47
1/35 N HCl	1,51
1/40 N HCl	1,58
1/100 N HCl	1,95

***E. coli* O157:H7 bakteri izolasyonu için kullanılacak besiyerlerinin hazırlanışı:**

Modified Phosphate Buffer (MPB, Himedia M1341)

Sodium chloride	8.0 g
Potassium chloride	0.20 g
Disodium hydrogen phosphate	1.44 g
Polysorbate 20	0.24 g
Distile su	1000 ml

10.08 g toz içerik tartılarak 1000 ml distile su ile ısıtılarak çözündürüldü. 121°C' de 15 dakika sterilize edildi. +4°C arasında saklandı. *E. coli* O157 tespitinde seperasyon işlemi esnasında yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.

mTryptic-Soy-Broth with Novobiocin (mTSB+N; MERCK 109205)

Peptone from caseine	17.0 g
Sodium chloride	5.0 g
D(+) – glucose	2.5 g
Peptone from soymeal	3.0 g
Bile Salts No. 3	1.5 g
Di potassium hydrogen phosohate	4.0 g
Novobiocin	0.02 g
Distile su	1000 ml

33.0 g toz besiyeri tartılarak 1000 ml distile su ile karıştırılarak ısıtılıp çözündürüldü. 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Buzdolabında +4°C' de muhafaza edildi.

Sorbitol MacConkey Agar (SMAC; LABM LAB161 / CT X161)

Peptone	20.0 g
Sorbitol	10.0 g
Bile salts No. 3	1.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Neutral red	0.03 g
Crystal violet	0.001 g
Agar No. 2	12.0 g
Distile su	1000 ml

48.5 g toz besiyeri tartılarak 1000 ml distile suyla karıştırılıp, ısıtılarak çözündürüldü. Otoklavda sterilize edildi ve sıcaklığı 47°C' ye geldikten sonra içerisine 2 vial Cefixime Tellurite Supplement katıldı. Steril Petrilere 15 ml civarında dağıtıldı. Hazırlanan Petri kapları buzdolabında saklandı.

1 vial Cefixime Tellurite (CT) Supplement, 5 ml steril distile suda çözüldü. Kullanımdan hemen önce, 47°C' ye soğutulmuş Sorbitol MacConkey Agar besiyerine hazırlanan Cefixime Tellurite (CT) Supplement çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı.

***Salmonella ssp.* izolasyonu için kullanılacak besiyerlerinin hazırlanışı:**

Buffered Peptone Water (BPW;MERCK107228)

Peptone from casein	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate	9.0 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.5 g
Distile su	1000 ml

25,5 g toz besiyeri tartılarak 1000 ml distile suyla ısıtıcıda çözündürüldü. Otaklavda 15 dakika sterilize edildi. 0-4°C arasında saklandı.

Rappaport Vassiliadis Medium Single Component (RVS; MERCK 107700)

Soy Peptone	4.5 g
Sodium chloride	7.2 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.26 g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.18 g
Magnesium chloride anhydrous	13.58 g
Malachite green	0.033 g
Distile su	1000 ml

26.8 g toz besiyeri tartılarak 1000 ml distile su ile ısıtılarak çözündürüldü. 10'ar mL besiyeri tüplere dağıtıldı. 115°C' de 15 dakika sterilize edildi. Buzdolabında saklandı.

Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn; LABM LAB202)

Meat Extract	4.3 g
Enzymatic digest of casein	8.6 g
Sodium chloride	2.6 g
Calcium carbonate	38.7 g
Sodium thiosulphate (anhydrous)*	30.45 g
Ox bile	4.78 g
Brilliant green	0.0096 g
Distile su	1000 ml

* 47.8 g sodyum tiyosülfat pentahidrat ile eşdeğerdir.

89.4 g toz besiyeri tartılarak ısıtıcıya koyulup 1000 ml distile su eklenerek çözündürüldü. Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatılarak sterilize edildi. Otoklavlanma yapılmadı. Yaklaşık 45°C' ye soğutulduktan sonra içerisine 20 mL iodine-iodide solüsyonu ve 4 vial Novobiocin supplementi ilave edildi. İyice karıştırılarak steril tüplere 10' ar mL dağıtıldı. Her 10 ml' lik tüpte 0,2 mL iodine-iodide solüsyonu ve 0,2 mL Novobiocin supplementi bulunacak şekilde ayarlandı. 0°C ile 4°C 'de muhafaza edildi.

1 vial Novobiocin, 5 ml steril distile suda çözüldü. Kullanım öncesinde yaklaşık 45°C' ye soğutulan besiyerine ilave edilerek karıştırıldı.

Iodine -iodide solüsyonu; 25 gr potassium iodide 10 ml steril distile suda çözdürüldü. Üzerine 20 g iodine eklenerek sterildistile su ile 100mL'ye tamamlandı. İyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında ışığı geçirmeyecek bir şişede ve karanlık ortamda muhafaza edildi.

Xylose Lysine Decarboxylase Agar(XLD; MERCK105287)

D(+)-Xylose	3.75 g
L(+)-Lysine	5.0 g
Lactose	7.5 g
Sucrose	7.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Phenol red	0.08 g
Agar-agar	14.5 g
Sodium deoxycholate	1.0 g
Sodium thiosulphate	6.8 g
Ammonium iron (III) citrate	0.8 g
Distile su	1000 ml

55 g toz besiyeri şişeye tartılarak üzerine 1000 ml distile su eklenip ısıtılarak çözündürüldü. Kaynatılarak sterilize edildi. Yaklaşık 47˚C' ye soğutulduktan sonra steril Petrilere 15 ml civarında dağıtıldı. Buzdolabında +4 ˚C' de saklandı.

Brillant Green Agar (BGA; LABM LAB034)

Meat Extract	5.0 g
Peptone from meat	10.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Disodium hydrogen phosphate	1.0 g
Sodium dihydrogen phosphate	0.6 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g
Phenol red	0.09 g
Brilliant green	0.0047 g
Agar-agar	12.0 g
Distile su	1000 ml

51.5 g toz besiyeri tartıldı ve ısıtıcıya üzerine 1000 ml distile su eklenerek çözündürüldü. Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatılarak sterilize edildi. Yaklaşık 47°C' a soğutulduktan sonra steril Petrilere 15 ml civarında dağıtıldı. Hazırlanan Petri kapları 0-4°C arasında muhafaza edildi.

Tryptone Soy Broth (TSB: LABM LAB004)

Tryptone	17.0g
Soy peptone	3.0g
Sodium chloride	5.0g
Dipotassium phosphate	2.5g
Dextrose	2.5g

1000 ml distile su hazırlandı, 30 g toz besiyeri tartılıp üzerine distile su koyulup ısıtılarak çözündürüldü. Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve 10 ml tüplere aktarılarak 121°C‘ de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan tüpler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra Buzdolabında bekletildi.

Tryptone Soy Agar (TSA: MERCK 105458)

Pancreatic digest of casein	15.0 g
Papaic digest of soya been	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar- Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

Toz besiyerinden 40 g tartılarak ısısı önceden ayarlanmış ısıtıcıya 1000 ml distile su ile karıştırılarak koyuldu. Isıtıcılı manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırıldı, Otoklavda 121°C' da 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sonrası yaklaşık 47°C' a soğutulduktan yaklaşık 15 ml olacak şekilde steril Petrilere dağıtıldı.

3.1.6. *Salmonella ssp.* ve *E.coli* O157:H7 suşlarının hazırlanışı ve saklama koşulları

E.coli O157:H7 suşları boncuk olarak temin edildi (Parc Sientific Universitat de Valencia Catedratico Agustin Escardino, 946980 Paterna (Valencia), Espana). Temin edilen suşlar aktif hale getirmek için önceden sterilize edilen 10 ml TSB besiyeri bulunan tüplere bir boncuk gelecek şekilde aktarıldı. *E. coli* O157:H7 bakterisi optimum üreme sıcaklığı 41,5°C olduğundan bu sıcaklığa ayarlanan etüvde 18±2 saat inkübe edildi. 18 saat sonunda *E.coli* O157:H7 için genel üreme besiyeri Tryptone Soy Agar (TSA)' a ve spesifik besiyeri olan önceden hazırlanmış CT-SMAC besiyerine 3 paralel olacak şekilde Petriye ekimi gerçekleştirildi. TSA ve CT-SMAC besiyeri içeren Petri kapları ters çevrilerek 37°C' de 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üremeler değerlendirildi.

Salmonella ssp. suşları boncuk olarak temin edildi (Zona Artigianale, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE), Italy, Liofilchem). Temin edilen suşlar aktif hale getirmek için 10 ml önceden sterilize edilen BPW besiyeri içeren tüplere bir boncuk gelecek şekilde aktarıldı. *Salmonella ssp.* bakterilerinin 37°C' de üremesi gerçekleştiği için 18±2 saat inkübe edildi. 18 saat sonunda *Salmonella ssp.* önceden hazırlanmış TSA içeren Petri kaplarına ve *Salmonella ssp*. için spesifik olan önceden hazırlanmış XLD ve BGA besiyerleri içeren Petri kaplarına ekimi gerçekleştirildi. Petri kapları ters çevrilerek 37°C' de, 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üremeler değerlendirildi.

Test suşlarının uzun süre canlılığını ve patojenite özelliklerini koruyabilmeleri için bakteriler, %15' lik Gliserol içeren Tryptone Soy Broth besiyerinden hazırlanmış 2 ml' lik Eppendrof tüplerinde –18°C' de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2. METOD

Çalışmada, *E.coli* O157:H7 (ATCC 43888) ve *Salmonella ssp.* (ATCC 13076) suşları ve 103 adet Edirne ilinden temin edilen gıda örnekleri kullanılmıştır. Deneylerde suşlar ve gıda örnekleri 3 paralel olarak test edilmiştir. Test edilen suşlar ve gıda örneklerindeki patojen mikroorganizmanın varlığı " Tespit Edildi / Tespit Edilemedi " şeklinde tanımlandı.

E.coli O157:H7 ve *Salmonella ssp.* bakterilerinin gıdalardan izolasyonu için örnekler toplandı. Örnekler alınırken sterilizasyonuna dikkat edilerek her bir et örneği steril bistüri ve steril bistüri ucu kullanılarak torbaların ağzı %70 lik etil alkol ile temizlenerek steril torbalar kapatıldı. Sıvı örnekler için tek kullanımlık pipetler steril tek kullanımlık idrar kapları kullanıldı. Toz örneklerin toplanmasında otoklavda steril edilen metal kaşıklar kullanıldı. Marul örnekleri otoklavda steril edilen makas yardımıyla alındı. Çalışmalarda kullanılmak üzere 89 adet taze kesilmiş sığır eti, iki adet sucuk, iki adet kremşanti, bir adet yoğurt, bir adet marul, bir adet mayonez, bir adet taze sıkılmış meyve suyu, bir adet ketçap, bir adet fındık içi, bir adet çiğ süt ve üç adet toz çorba olmak üzere toplamda 103 örnek incelendi.

Çalışmada kullanılacak örneklerin deneylere başlanılmadan önce pH' sı ve sıcaklığı ölçüldü. Et, sucuk, kremşanti, yoğurt, ketçap, mayonez, marul, taze sıkılmış meyve suyu, çiğ süt örnekleri +4°C' de alındı ve +4°C' de muhafaza edildi. Fındık içi ve toz çorba örnekleri de oda sıcaklığında (18°C- 27°C' de) alındı ve uygun sıcaklıklarda muhafaza edildi.

Bakteri izolasyonları için kullandığımız yeni metod için gerekli olan hidroklorik asit dilüsyonları hazırlandı. Ön zenginleştirme çalışması yapılmadan örnekleri asit ile muamele etmek için 1Normal (N) Hidroklorik asit (HCl: Merck 100317, UK.) ve sodyum klorür (NaCl: Merck 106404, Almanya) kullanılarak 1/2N, 1/4N, 1/6N, 1/8N ve 1/10N HCl asit dilüsyonları hazırlandı.

E.coli O157:H7 bakterisinin gıdalardan izolasyonun yeni yöntem ile gerçekleştirilmesi için ön zenginleştirme yapılmadan gıda örneklerinden 1 g veya 1 ml bistüri (ISOLAB, 048.50.002, Almanya) veya Pastör pipeti (ISOLAB, 084.22.001, Almanya) ile alınarak önceden hazırlanan steril cam tüplerdeki (ISOLAB,

LB.IS.077.01.004, Almanya) HCl asit dilüsyonlarına (1/2N, 1/4N, 1/6N, 1/8N ve 1/10N) yerleştirildi. Dilüsyonlara eklenen örnekler 30 sn ve 1 dk bekletildi. İmmünomanyetik seperasyon (IMS) işlemi için vortekslenip oda sıcaklığına getirilmiş immünomanyetik partiküllerden (LABCAP001, LABM, İngiltere) 2 ml' lik Eppendrof tüplerine (LB.IS.078.05.002, ISOLAB, Almanya) 20 µl mikropipet (RBO100, İldam, Ankara, LB.IS.TF100, ISOLAB, Almanya) ile yerleştirildi. HCl asit dilüsyon tüplerinden 1 ml alındı ve içinde 20 µl immünomanyetik patiküller bulunan Eppendrof tüplerine eklendi. Kapakları kontaminasyon olmamasına dikkat edilerek kapatıldı. Tüpler homojenizasyon için 20 rpm' da karıştırıcıya konuldu (Stuart/SB3, İngiltere) ve 30 dk karışması sağlandı. Karıştırıcıdan alınan Eppendrof tüpleri manyetik spora (Captivate Seperator Rack, LABM-CAP100-12p, İngiltere) yerleştirildi. Manyetik sporda 180° döndürme hareketi yapılarak immünomanyetik partiküllerin mıknatıs duvarına tutunması sağlandı. Manyetik sporda kontaminasyon olmamasına dikkat edilerek kapakları açıldı ve her tüp için ayrı Pastör pipeti kullanılarak tüp içerisindeki sıvı uzaklaştırıldı. Tüplere 1 ml Modified Phosphate Buffer (yıkama solüsyonu) (MPB, Himedia M1341, Hindistan) eklendi ve tüpler manyetik spordan uzaklaştırıldı. Tüplere tekrar 180° ters yönde döndürme hareketi uygulandı ve immünomanyetik partiküllerin yıkama solüsyonuyla karışması sağlandı. Sonrasında tüpler manyetik spora yerleştirildi, immünomanyetik partiküllerin mıknatısların tutunması için 180° döndürme hareketi uygulandı. Kapaklar manyetik sporda kontaminasyon olmamasına dikkat edilerek açıldı ve tüp içerisindeki sıvı Pastör pipeti kullanılarak uzaklaştırıldı. Uygulama 2 defa tekrarlandı. Bu uygulama yapılırken çapraz kontaminasyon olmamasına dikkat edildi. Son yıkama solüsyonu da Pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve ardından 100 µl yıkama solüsyonu eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı. Manyetik spordan uzaklaştırılan tüpler vortekslenerek 50 µl' si mikropipet ile alındı ve sefiksime tellutire (CT; LABM X16, İngiltere) ile tamamlanmış Sorbitol MacConkey Agar (SMAC; LABM LAB161, İngiltere) içeren Petri kaplarına öze ile ekimi yapıldı. Ekimi yapılan Petri kapları 15 dk bekletildikten sonra ters olarak 37°C' de 24±2 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koloniler değerlendirildi. CT-SMAC agarda tipik koloniler şeffaf ve neredeyse renksiz olup, sarımsı kahverengi soluk görünüşlü yaklaşık 1 mm çapındaki koloniler *E.coli* O157:H7 bakterisi olarak tanımlandı.

Klasik yöntem ile *E.coli* O157:H7 bakterisinin gıdalardan izolasyonu için 25 g veya 25 ml gıda örneklerinden alınıp steril torbalara (D11214001, HSF, Finland) koyuldu. Zenginleştirme besiyeri önceden steril edilmiş Tryptic-Soy-Broth with Novobiocin (N; Merck X150, Almanya) (mTSB+N; Merck 109205, Almanya)' den 225 ml eklenerek karıştırıcıda 2 dk karıştırıldı. Homojenize olan örnekler 41,5°C' ye ayarlı inkübatörde 6 saat bekletildi. Gerekli görüldüğü takdirde 18 saat daha inkübe edildi. 6 saatlik inkübasyon sonunda örneklerden *E. coli* O157:H7 izolasyonu için IMS patikülleri oda sıcaklığına getirilip vortekslenip Eppendrof tüplerine 20 µl eklendi. İmmünomanyetik partiküller bulunan tüplere 41,5°C inkübatörde bekletilen torbadan 1 ml alınıp üzerine eklendi. Kapakları dikkatlice kapatılan tüpler homojenizasyon için yaklaşık olarak 12 rp/dk veya 20 rp/dk' da dönebilen karıştırıcıya koyuldu ve 30 dk boyunca karışması sağlandı. Eppendrof tüpleri manyetik spora yerleştirilip 180° döndürme hareketi yapılarak manyetik sporda immünomanyetik partiküllerin mıknatıs duvarına tutunması sağlandı. Manyetik sporda kontaminasyon olmamasına dikkat edilerek kapakları açıldı ve her bir tüp için ayrı birer Pastör pipeti kullanılarak tüp içerisindeki sıvı uzaklaştırıldı. Tüplerin içerisine 1 ml yıkama solüsyonu koyuldu ve partiküllerin yıkama solüsyonuyla karışmasının sağlanması için tüpler manyetik spordan uzaklaştırılıp 180° ters yönde döndürme hareketi yapıldı. Tüpler ardından manyetik spora yerleştirildi ve yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi ikinci defa yapıldı. Ardından yıkama solüsyonu uzaklaştırılıp Eppendrof tüplerine 100 µl yıkama solüsyonu eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı. Tüplere vorteks uygulanarak 50 µl' si mikropipet ile alınarak CT-SMAC içeren Petri kaplarına ekimi yapıldı. Petri kapları ekimler yapıldıktan sonra ters çevrilerek 37°C' ye ayarlı inkübatörde 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koloniler değerlendirildi. CT-SMAC agarda tipik koloniler şeffaf ve neredeyse renksiz, sarımsı kahverengi soluk görünüşlü yaklaşık 1 mm çapındaki koloniler *E.coli* O157:H7 bakterisi olarak tespit edildi.

Yeni yöntem uygulanarak örneklere ön zenginleştirme işlemi yapıldıktan sonra *E.coli* O157:H7 bakterisinin gıdalardan izolasyonu için steril torbalara 25 g veya 25 ml koyuldu. Zenginleştirme besiyeri mTSB+N' den 225 ml eklenerek karıştırıcıda 2 dk karıştırıldı. Homojenize olan örnekler 41,5°C' ye ayarlı inkübatörde 6 saat bekletildi, gerekirse 18 saat daha inkübe edildi. Önceden hazırlanan HCl asit dilüsyonlarına 6 saat inkübe edilen torbalardan 1 ml alınarak eklendi. 30 sn ve 1 dk HCl asit dilüsyon tüpleri

vortekslenip içinden 1 ml alındı. Eppendrof tüpleri manyetik spora yerleştirilip üzerine 20 µl oda sıcaklığına getirilmiş immünomanyetik partiküllerden koyuldu. Kapakları kapatılıp karıştırıcıya koyuldu. 12 rp/dk veya 20 rp/dk' da 30 dk dönerek karışması sağlandı. 30 dk sonunda karıştırıcıdan alınan Eppendrof tüpleri manyetik spora yerleştirildi. 180° döndürme hareketi ile homojen karışım içerisindeki mıknatısların manyetik spora tutunması sağlandı. Her bir tüp için farklı Pastör piperti kullanılarak partiküllerin dışında kalan sıvı uzaklaştırıldı. 1 ml yıkama solüsyonu tüplerin içine eklenip, tüperi manyetik spordan alıp ters hareket yapılarak homojenize olması sağlandı. Karışma sonrası tüpler manyetik spora yerleştirildi, manyetik partiküllerin mıknatıs duvarına tutunması için 180° döndürüldü. Pastör pipeti ile yıkama sıvısı uzaklaştırıldı. İşlem uygulanırken çapraz bulaşı olmamasına dikkat edildi. Kirli yıkama solüsyonu tüplerden uzaklaştırılıp temiz yıkama solüsyonundan 100 µl alınarak mıknatıstan uzaklaştırılmış tüplere eklendi. Tüplere vorteks yapılıp içinden 50 µl' si alınarak önceden hazırlanmış CT-SMAC içeren Petri kaplarına uygulanması sağlandı, Petri kapları ters çevrili olarak 37°C' ye ayarlı inkübatörde 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koloniler değerlendirildi. CT-SMAC agarda tipik koloniler şeffaf ve neredeyse renksizdi, sarımsı kahverengi soluk görünüşlü yaklaşık 1 mm çapındaki koloniler *E.coli* O157:H7 bakterisi olarak tespit edildi.

Salmonella ssp. bakterilerinin gıdalardan yeni yöntem ile izolasyonu için örneklerden 1 g veya 1 ml alınarak önceden hazırlanan HCl asit dilüsyon tüplerine aktarıldı, 30 sn ve 1 dk vortekslendi. Steril tek kullanımlık öze yardımıyla HCl asit dilüsyonlarından bir öze dolusu (yaklaşık 10 µl) alınarak önceden hazırlanmış ilk seçici besiyeri Xlose Lysine Deoxycholate (XLD; Merck 105287, Almanya) ve ikinci seçici besiyeri Brillant Green Agar (BGA; LABM LAB034, İngiltere) besiyerlerine çizim yöntemi ile Petrilere ekim yapıldı. Petri kapları ters olarak 37°C' de 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürler *Salmonella spp.* açısından değerlendirildi ve XLD besiyerinde H_2S oluşumundan dolayı siyah merkezli ve lizin dekarboksilasyonu sonucu kırmızımsı yarı şeffaf zonlu olan koloniler olarak değerlendirildi. Bazı *Salmonella* türlerinin (*Salmonella paratyhi* gibi) oluşturduğu koloniler H_2S negatif olarak belirlendiğinden merkeze doğru koyulaşan pembe renk göstermektedir. Laktoz pozitif *Salmonella* kolonileri ise siyahlaşmış veya siyahlaşmamış sarı renkli kolonilerdir, BGA

besiyerinde ise çevrelerinde kırmızı bir zon oluşturan, pembe-kırmızı, nadiren şeffaf renkteki kolonilerdir.

Salmonella ssp. bakterilerinin gıdalardan klasik yöntem ile izolasyonu için 25 g veya 25 ml alınan örnekler zenginleştirme besiyeri olan önceden steril edilmiş Buffered Peptone Water (BPW; Merck107228, Almanya)'dan 225 ml eklenerek steril torbalarda hazırlandı. Hazırlanan torbalar karıştırıcıda 2 dk karıştırılıp 37°C' ye ayarlanmış inkübatörde 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ikinci zenginleştirme besiyerleri olan 10 ml Mueller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn; LABM LAB202, İngiltere) bulunan tüplere 1 ml ve 10 ml RAPPAPORT-VASSILIADIS-Soya (RVS, Merck 107700, Almanya) bulunan tüplere 0**,**1 ml mikropipet ile aktarıldı. MKTTn içeren tüpler 37°C' de 24±2 saat, RVS içeren tüpler 41,5°C' de 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyonunu tamamlayan tüplerden birer öze dolusu alınarak XLD ve BGA besiyerleri içeren Petri kaplarına çizim yapılarak ekildi. Petri kapları ters çevrilerek 37°C' de 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültürler değerlendirildi; *Salmonella ssp.* varlığında XLD besiyerinde H_2S oluşumundan dolayı siyah merkezli ve lizin dekarboksilasyonu sonucu kırmızımsı yarı şeffaf zonlu olan kolonilerdi. BGA besiyerinde ise çevrelerinde kırmızı bir zon oluşturan, pembe-kırmızı, nadiren şeffaf renkteki kolonilerdir.

Ön zenginleştirme sonrası yeni yötem ile *Salmonella ssp.* bakterilerinin gıdalardan izolasyonu için 25 g veya 25 ml alınan örnekler zenginleştirme besiyeri olan önceden steril edilmiş BPW' dan 225 ml eklenerek steril torbalarda hazırlandı. Hazırlanan torbalar karıştırıcıda 2 dk karıştırılıp 37°C' ye ayarlanmış inkübatörde 18 saat inkübe edildi. HCl asit dilüsyonlarına inkübasyonu tamamlanmış torbalardan 1ml eklendi. HCl asit tüpleri 30 sn ve 1 dk vortekslenip önceden hazırlanan XLD ve BGA içeren Petri kaplarına bir öze dolusu alınarak çizim yöntemi ile ekim yapıldı. Petri kapları ters çevrilerek 37°C' ye ayarlı inkübatörde 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Petri kapların da bakterinin varlığı değerlendirildi ve XLD besiyerinde H_2S oluşumundan dolayı siyah merkezli ve lizin dekarboksilasyonu sonucu kırmızımsı yarı şeffaf zonlu aynı zamanda bazı farklı türleri olan, H_2S negatif olabildiğinden merkeze doğru koyulaşan pembe renk gösterir. Bazı *Salmonella* türlerinin (*Salmonella paratyhi* gibi) oluşturduğu koloniler Laktoz pozitif olanları ise siyahlaşmış veya siyahlaşmamış sarı renkli

kolonilerdir, BGA besiyerinde ise çevrelerinde kırmızı bir zon oluşturan, pembe-kırmızı, nadiren şeffaf renkteki kolonilerdir.

Tespit limiti çalışması için *E.coli* O157:H7 (ATCC 43888) ve *Salmonella enteritidis (ATCC 13076)* suşları kullanılarak çalışmalar yapıldı.

E.coli O157:H7 bakterisini yeni metod ile tespit limiti için boncuk halde olan suş önceden steril edilen 10 ml TSB besiyeri bulunan tüplere bir boncuk gelecek şekilde aktarıldı. Bakterinin logaritmik üreme sıcaklığı 41,5°C olduğundan bu dereceye ayarlanan inkübatöre koyuldu, 18 saat bekletildi. İnkübasyon sonunda önceden steril edilen Petri kaplarına dökülen CT-SMAC besiyerlerine çizim yöntemi ile ekim yapıldı. Ekimi yapılan Petri kapları 15 dakika bekletilerek 37°C' ye ayarlanmış inkübatörde 24±2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası üremeler *E.coli* O157:H7 açısından değerlendirildi.

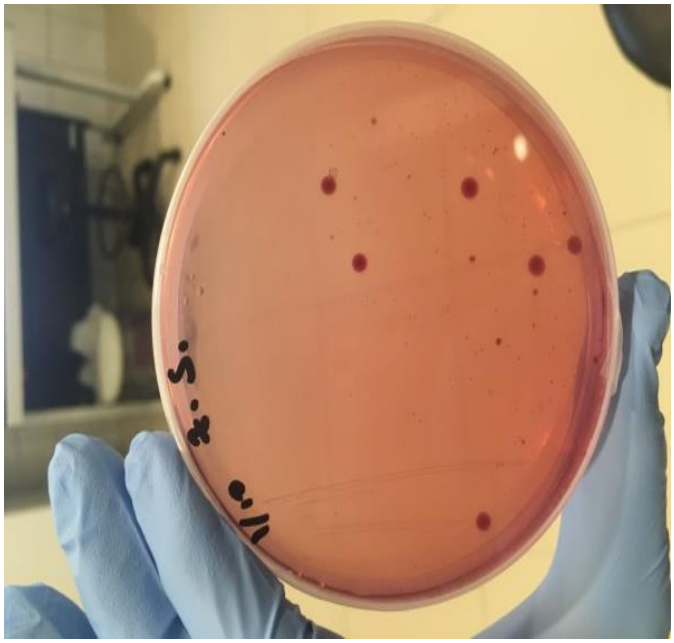
10 ml' lik steril edilen tüplerde BPW besiyeri içinde 1 McFarland ($300x10^7$ kob/ml) yoğunluğunda bakteri ayarlandı. Seyreltme dilüsyonları yapılarak $300x10^6$ kob/ml' lik tüpler hazırlandı. Hazırlanan dilüsyon tüplerinden 1/100 N HCl asit dilüsyonu bulunan tüplere 1ml mikropipet ile aktarıldı. 30 sn ve 1 dk bekletildi. HCl asit dilüsyon tüplerinden steril öze ile önceden steril edilen, Petri kaplarına dökülen CT-SMAC besiyerine ekimi yapıldı. Petri kapları 37°C' ye ayarlanan inkübatörde 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koloniler *E.coli* O157:H7 bakterisi açısından değerlendirildi. $300x10^6$ kob/ml ekimi yapılan bakterilerin sayısında önemli miktarda azalma gözlenmiştir.

Salmonella ssp. bakterilerini yeni metod ile tespit limiti için boncuk halde olan suştan 1 boncuk, önceden steril edilen 10 ml tüplerde bulunan BPW besiyerine aktarıldı. Bakterinin optimum üreme sıcaklığı 37°C olduğundan dolayı bu sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde 18 saat inkübe edildi. *Salmonella ssp*. için seçici besiyerleri olan XLD ve BGA besiyerleri önceden steril edildi ve Petri kaplarına hazırlandı. İnkübasyon sonunda hazırlanmış olan Petri kaplarına steril tek kullanımlık öze ile ekim yapıldı. Petri kapları 15 dk bekletildikten sonra 37°C' ye ayarlanmış inkübatörde 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üreyen bakteriler *Salmonella ssp.* açısından değerlendirildi.

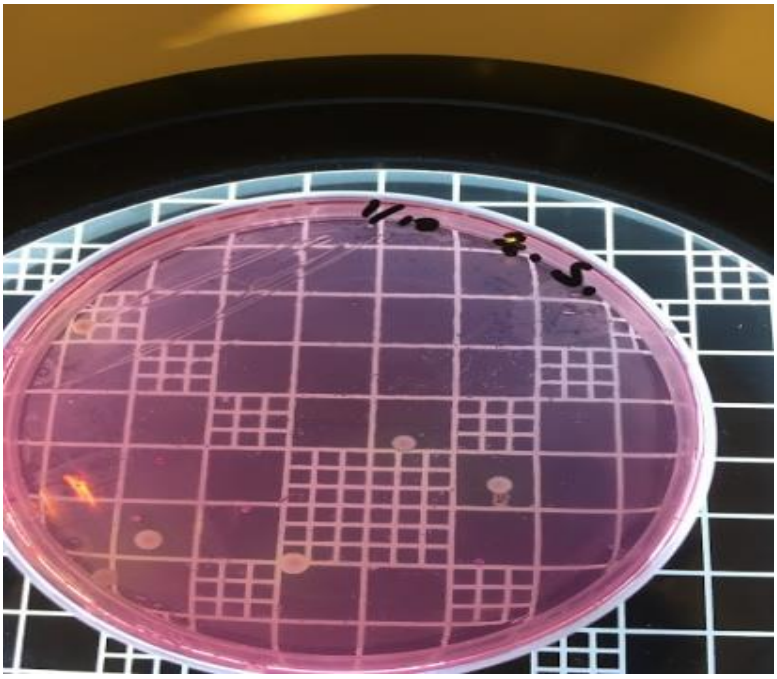
Önceden hazırlanan 10 ml BPW besiyeri bulunan tüplerde 1 McFarland *Salmonella ssp.* bakterileri hazırlandı. 1 McFarland $300x10^7$ kob/ml olarak kabul edildiği için bakteri yoğunluğunun azaltılması için dilüsyonları yapıldı. Dilüsyonlarının yapılabilmesi için 9 ml BPW besiyeri bulunan steril tüplere suş bulunan tüplerden 1 ml aktarıldı. 2 sn. vorteks yapıldı. 1/100 N HCl asit dilüsyonları hazırlandı. Hazırlanan HCl asit dilüsyonlarına $300x10^6$ kob/ml bulunan suş dilüsyonundan 1 ml eklendi. HCl asit dilüsyonu bulunan tüpler 30 sn ve 1 dk bekletildi. Seçici besiyerleri olan önceden hazırlanmış XLD ve BGA besiyeri içeren Petri kaplarına steril tek kullanımlık öze ile ekim yapıldı. Ekimi yapılan Petri kapları 15 dk bekletildi. 37°C' ye ayarlanan inkübatöre ters koyuldu ve 24±2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üreyen koloniler *Salmonella ssp.* açısından değerlendirildi. İnkübasyon sonunda üreyen *Salmonella ssp.* sayısı suş dilüsyonundaki sayı ile karşılaştırıldığında büyük oranda azalma gözlemlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

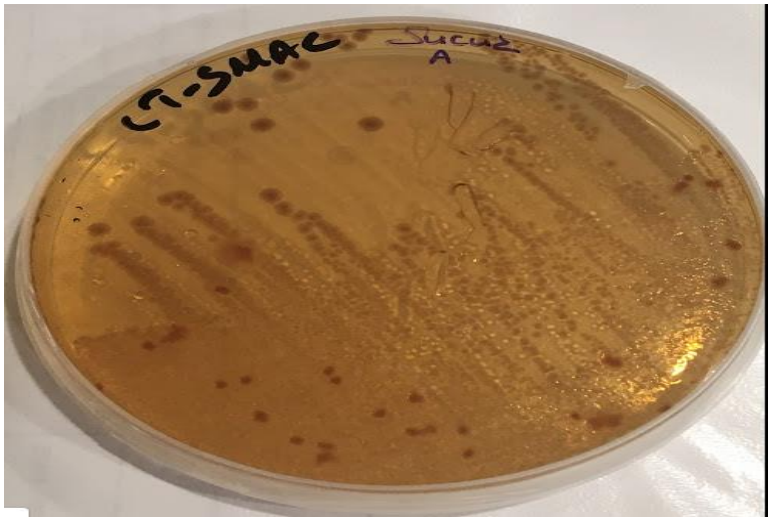
Sucuk A örneği *E.coli* O157:H7 bakteri izolasyonu ön zenginleştirme yapılmadan yeni yöntem, ön zenginleştirme yapıldıktan sonra yeni metod ve klasik metodu ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında örnekler ön zenginleştirme, ön zenginleştirme sonrası ve klasik metod ile çalışılarak *E.coli* O157:H7 bakterisi varlığı " tespit edilmiştir".



Şekil 4.1. 1/10 N HCl asit dilüsyonunda sucuk A örneğinden ön zenginleştime sonrası *E.coli* O157:H7 bakterisinin CT-SMAC içeren kültürde izolasyonu.



Şekil 4.2. 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ön zenginleştirme öncesi CT-SMAC içeren kültürde sucuk A örneğinden *E.coli* O157:H7 bakterisinin izolasyonu.

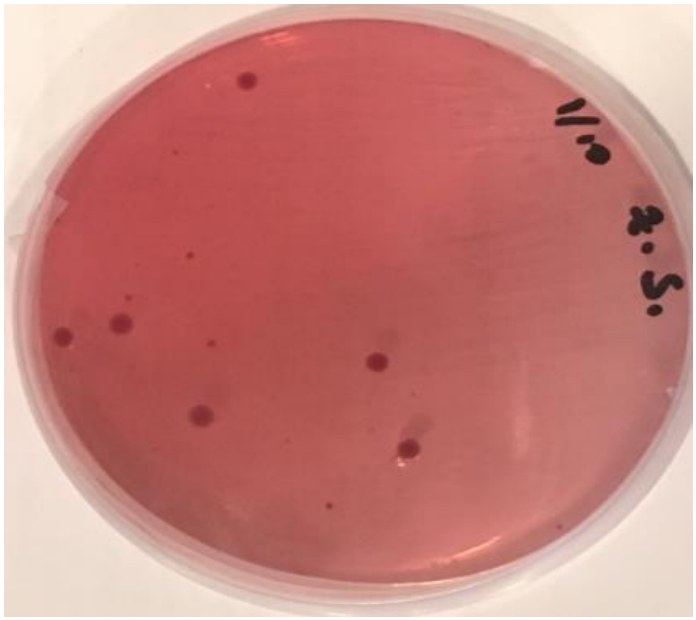


Şekil 4.3. *E.coli* O157:H7 bakterisinin sucuk A örneğinden klasik yöntem ile CT-SMAC içeren kültürden izolasyonu**.**

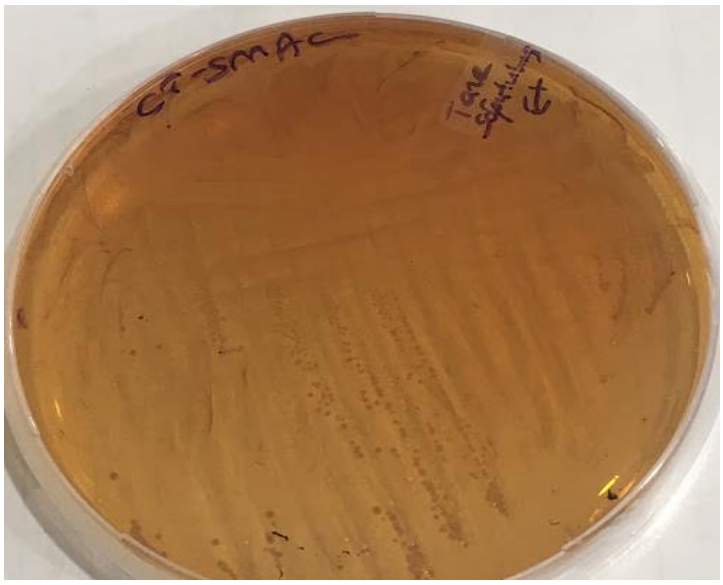
Taze 5 °C' de soğutulmuş sığır eti örneği *E.coli* O157:H7 bakteri izolasyonu yeni yöntem ve klasik metod ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda yeni yöntemle 1/2 N ve 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik metod ile *E.coli* O157:H7 bakterisi varlığı gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Taze sığır etinden ön zenginleştirme öncesi hazırlanan 1/2 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilen *E.coli* O157:H7 bakterisi varlığı CT-SMAC besiyerinde üreme görülmüştür.

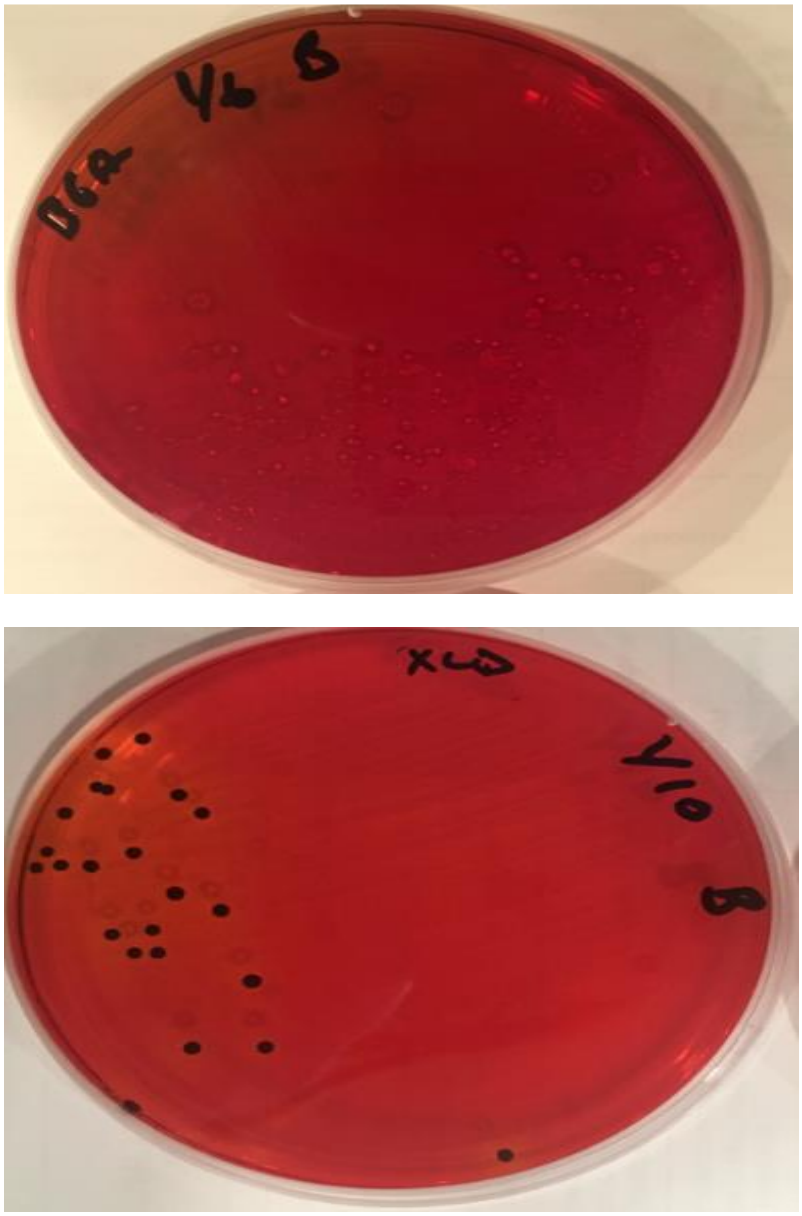


Şekil 4.5. Taze sığır etinden ön zenginleştirme sonrası hazırlanan 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilen *E.coli* O157:H7 bakterisinin CT-SMAC besiyerinde gelişim gösterdiği görülmüştür.

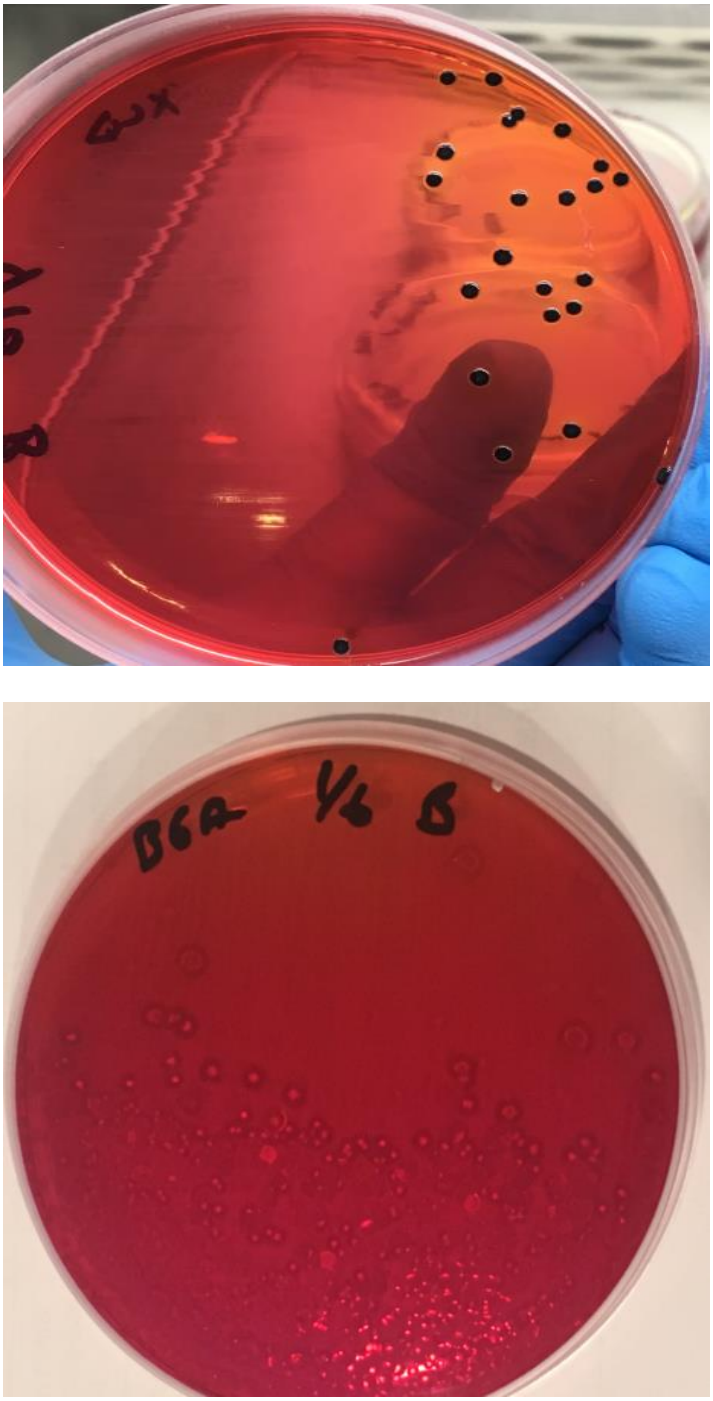


Şekil 4.6. Taze sığır etinden klasik metod ile yapılan çalışmada *E.coli* O157:H7 bakterisi CT-SMAC besiyerinde tespit edilmiştir.

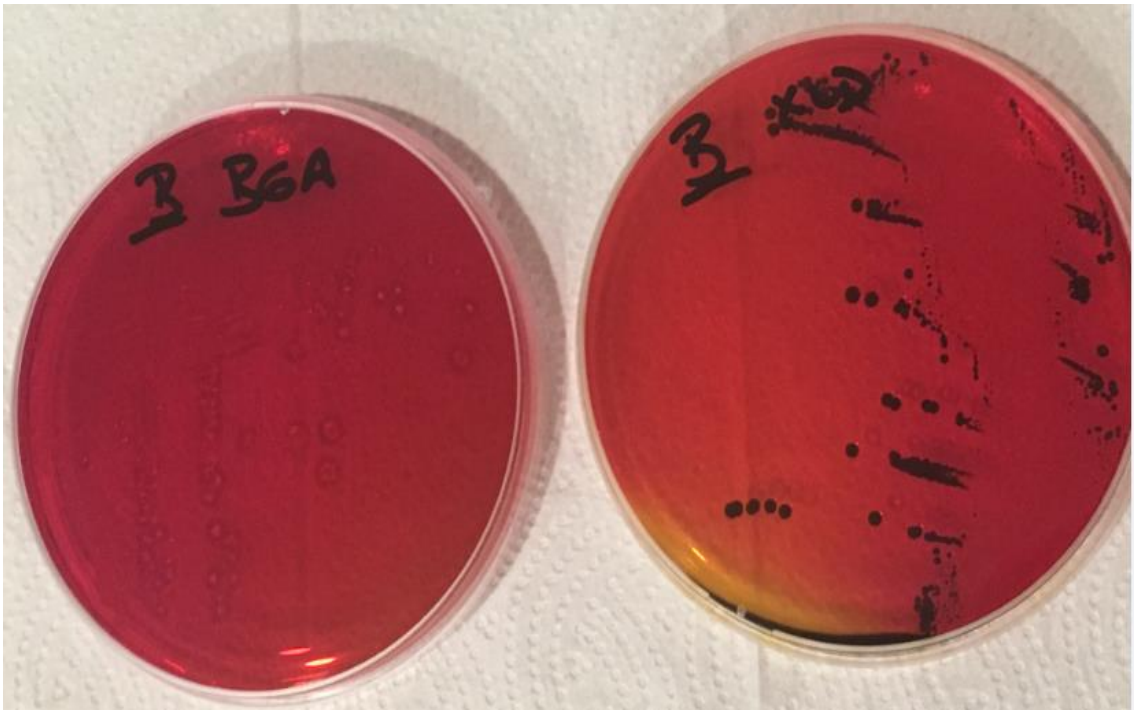
Kremşanti (B) örneğinin ön zenginleştirme öncesi yeni metod, ön zenginleştirme sonrası ve klasik metod ile yapılan çalışmalarında *Salmonella spp.* bakterisi "tespit edilmiştir".



Şekil 4.7. Kremşanti (B) örneğinden yeni metod çalışılarak ön zenginleştirme öncesi 1/6 N ve 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilerek *Salmonella ssp*. bakterisi XLD ve BGA besiyerlerinde üremesi görülmüştür.

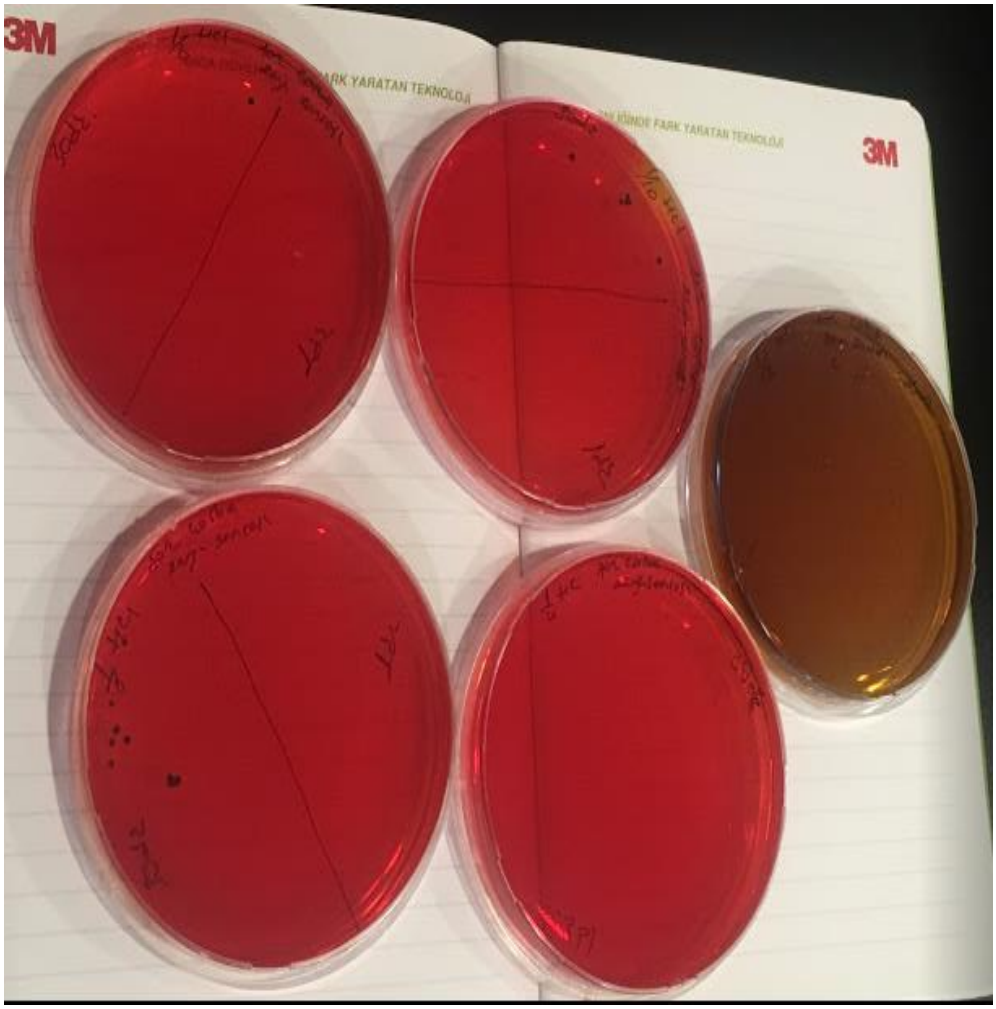


Şekil 4.8. Kremşanti B örneğinden yeni metodla çalışılarak ön zenginleştirme sonrası 1/6 N ve 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında inkübe edilerek *Salmonella ssp*. bakterisi XLD ve BGA besiyerinde varlığı tespit edilmiştir.

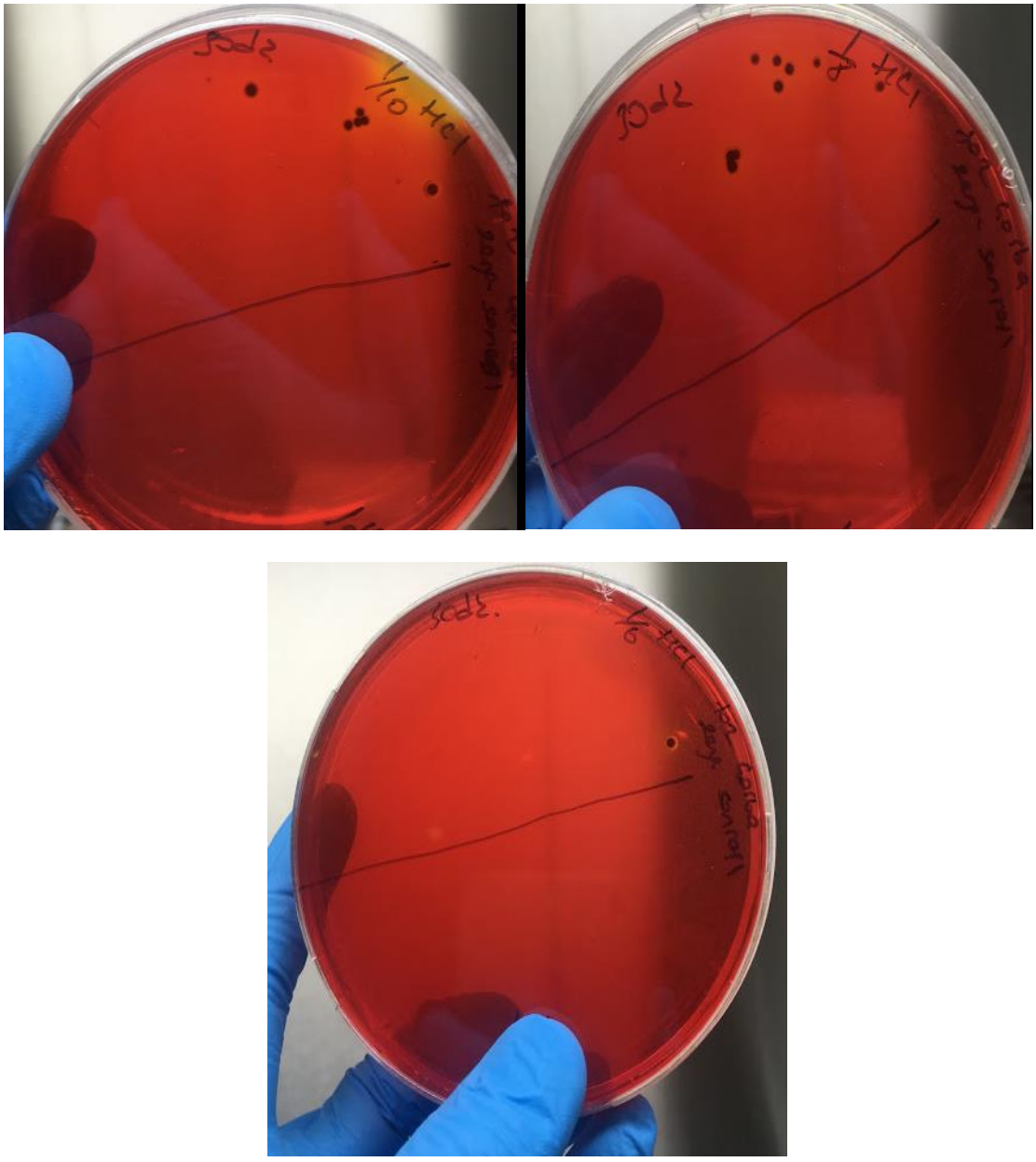


Şekil 4.9. Kremşanti B örneğinden klasik metod çalışmasında *Salmonella ssp*. bakterileri XLD ve BGA besiyerinde tespit edilmiştir.

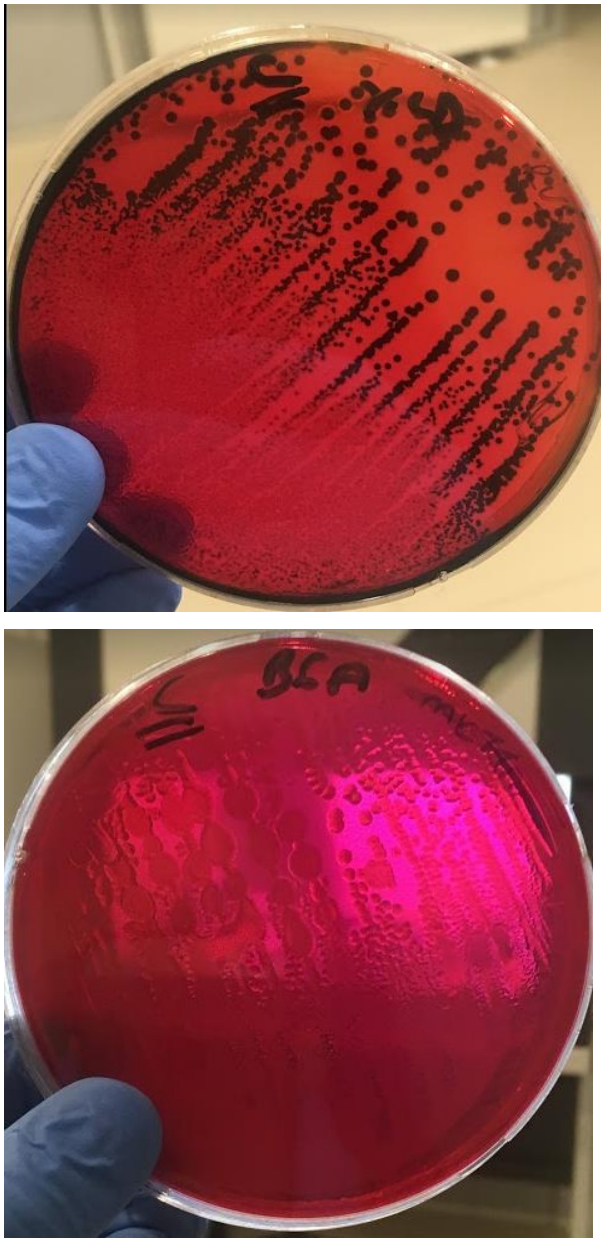
Toz çorba C örneğinde yeni metod ön zenginleştirme öncesi çalışması, yeni metod ön zenginleştirme sonrası çalışması ve klasik metod ile yapılan çalışmalarında *Salmonella ssp.* bakterileri izole edilmiştir.



Şekil 4.10. Toz çorba C örneğinden ön zenginleştirme öncesi yeni metod ile *Salmonella ssp.* bakterileri XLD ve BGA besiyerinde üremiştir.



Şekil 4.11. Toz çorba C örneğinden ön zenginleştirme sonrası yeni metod ile *Salmonella ssp.* bakterileri XLD besiyerinden izole edilmiştir.



Şekil 4.12. Toz çorba C örneğinden klasik metod ile yapılan çalışmada *Salmonella ssp.* bakterileri XLD besiyerinde tespit edilmiştir.

Tespit limiti çalışması için *E.coli* O157:H7 (ATCC 48333) ve *Salmonella ssp.* (ATCC13076) suşları kullanılarak $300x10^5$ kob/ml' lik mikroorganizma yoğunluğu elde edildi. Suşlar klasik metod, HCl asit dilüsyonları ve tuzlu su kullanılarak ekimleri yapıldı ve geri kazanımları incelendi.

Çizelge 4.1. Tespit limiti çalışması sonuçları.

Bakteri Kültürleri		*E.coli* O157:H7 (ATCC 48333)	*Salmonella ssp*. (ATCC 13076)
Hidroklorik Asit Dilüsyonları ve Bakteri Üremesi	Tuzlu Su	300 koloni	5 kob/ml
	1/2 N	Negatif	Negatif
	1/4 N	Negatif	Negatif
	1/6 N	Negatif	Negatif
	1/8 N	Negatif	Negatif
	1/10 N	Negatif	Negatif
	1/25 N	Negatif	Negatif
	1/30 N	Negatif	Negatif
	1/35 N	1 kob/ml	Negatif
	1/40 N	Negatif	Negatif
	1/100 N	4 kob/ml	1 kob/ml
	Klasik Metot	300 koloni	300 koloni

Çizelge 4.2. Çalışması yapılan 103 örnekten dört örnekte (sucuk (A); 1/10 N HCl asit dilüsyonunda ve klasik yönteminde, taze sığır eti; 1/2 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik yönteminde *E.coli* O157:H7 bakterisi tespit edilmiştir. Toz çorba (C); 1/6 N, 1/8 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik metodunda, kremşanti (B); 1/6 N, 1/10 N HCl asit dilüsyonlarında ve klasik yönteminde *Salmonella ssp.* bakterileri tespit edilmiştir.

ÖRNEKLER	*E.coli* O157:H7			*Salmonella ssp.*		
	Zenginleştirme öncesi HCl asit dilüsyon çalışması	**Zenginleştirme sonrası HCl asit dilüsyon çalışması**	**Klasik Yöntem**	**Zenginleştirme öncesi HCl asit dilüsyon çalışması**	**Zenginleştirme sonrası HCl asit dilüsyon çalışması**	**Klasik Yöntem**
Krem şanti (A)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Krem şanti (B)	Negatif	Negatif	Negatif	1/6 N, 1/10 N HCl dilüsyonda üreme görüldü	1/6 N, 1/10 N HCl dilüsyonda üreme görüldü	Pozitif
Yoğurt	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Çiğ süt	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Mayonez	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Taze sıkılmış meyve suyu	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Fındık	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Marul	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Ketçap	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Sucuk (A)	1/10 N Üreme görüldü	1/10 N Üreme görüldü	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
Sucuk (B)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Taze soğutulmuş sığır eti (88 adet)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Taze soğutulmuş sığır eti	1/2 N HCl dilüsyonda üreme görüldü	1/2 N, 1/10 N HCl dilüsyonda üreme görüldü	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
Toz çorba (A)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Toz çorba (B)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Toz çorba (C)	Negatif	Negatif	Negatif	1/10 N HCl dilüsyonda üreme görüldü	1/6 N, 1/8 N ve 1/10 N HCl dilüsyonda üreme görüldü	Pozitif

Çizelge 4.3. *Salmonella ssp.* pozitif örneklerin klasik metod ve yeni gelişirilen HCl asit dilüsyonları metodu sonuçları (örnekler 3 paralel çalışılmıştır).

Salmonella ssp.				
Yöntemler			Örnekler	
			Kremşanti B	Toz Çorba C
Klasik Yöntem			+/+/+	+/+/+
Hidroklorik asit dilüsyonları ile geliştirilen yeni metodun zenginleştirme besiyeri öncesi bakteri izolasyonu	30 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	-/-/-	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	+/+/+	+/+/+
		1/8 N	-/-/-	+/+/+
		1/10 N	+/+/+	+/+/+
	1 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	-/-/-	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	+/+/+	+/+/+
		1/8 N	-/-/-	+/+/+
		1/10 N	+/+/+	+/+/+
Hidroklorik asit dilüsyonları ile geliştirilen yeni metodun zenginleştirme besiyeri sonrası bakteri izolasyonu	30 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	-/-/-	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	+/+/+	+/+/+
		1/8 N	-/-/-	+/+/+
		1/10 N	+/+/+	+/+/+
	1 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	-/-/-	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	+/+/+	+/+/+
		1/8 N	-/-/-	+/+/+
		1/10 N	+/+/+	+/+/+

Çizelge 4.4. *E.coli* O157:H7 pozitif örneklerin klasik metod ve yeni gelişirilen HCl asit dilüsyonları metodu sonuçları (örnekler 3 paralel çalışılmıştır).

***E.coli* O157:H7**				
Yöntemler			Örnekler	
			Taze Sığır Eti	Sucuk A
Klasik Yöntem			+/+/+	+/+/+
Hidroklorik asit dilüsyonları ile geliştirilen yeni metodun zenginleştirme besiyeri öncesi bakteri izolasyonu	30 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	+/+/+	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	-/-/-	-/-/-
		1/8 N	-/-/-	-/-/-
		1/10 N	-/-/-	+/+/+
	1 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	+/+/+	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	-/-/-	-/-/-
		1/8 N	-/-/-	-/-/-
		1/10 N	-/-/-	+/+/+
Hidroklorik asit dilüsyonları ile geliştirilen yeni metodun zenginleştirme besiyeri sonrası bakteri izolasyonu	30 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	+/+/+	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	-/-/-	-/-/-
		1/8 N	-/-/-	-/-/-
		1/10 N	+/+/+	+/+/+
	1 dakika HCl dilüsyonunda bekletme	1/2 N	+/+/+	-/-/-
		1/4 N	-/-/-	-/-/-
		1/6 N	-/-/-	-/-/-
		1/8 N	-/-/-	-/-/-
		1/10 N	+/+/+	+/+/+

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada amaç, *E.coli* O157:H7 ve *Salmonella ssp.* türlerinin 89 adet taze kesilmiş sığır eti, iki adet sucuk, iki adet kremşanti, bir adet yoğurt, bir adet marul, bir adet mayonez, bir adet taze sıkılmış meyve suyu, bir adet ketçap, bir adet fındık içi, bir adet çiğ süt ve üç adet toz çorba olmak üzere toplamda 103 adet örnek klasik metodun dışında farklı bir yöntem ile tespitini incelemektir. 103 örnekten üç paralel olarak, klasik ve HCl asit dilüsyonları yöntemi kullanılarak gıdalardan patojenlerin tespiti çalışılmıştır.

Yeni geliştirilen HCl asit dilüsyonlarını kullanarak *Salmonella ssp.* ve *E.coli* O157:H7 türlerinin izolasyonsonuçları araştırma bulguları kısmında verilmiştir.

E.coli O157:H7 (ATCC 43888) ve *S. enteritidis (ATCC 13076)* referans suşları kullanılarak yeni geliştirilen metodun etkinliği incelenmiştir.

E.coli bakterisinin diğer Gram negatif bakterilerden yüksek asit toleransına sahip olduğu gözlemlenmiştir. HCl asit uygulanan *E.coli* O157:H7 suşu ve gıda örneklerinin CT-SMAC besiyerine ekim yapılmış *E.coli* O157:H7, O111:H- ve STEC 026:HII dışında diğer bakterilerin büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu yöntem sayesinde CT-SMAC besiyerine yapılmış ekimlerde *E.coli* O157:H7, O111:H- ve STEC 026:H11' nin izolasyonu kolaylaşmıştır. Bu yöntemin dışkı, gıda ve çevre örneklerinden *E.coli* O157:7 bakterisinin izolasyonunu gerçekleştirirken daha ekonomik, hızlı ve basit bir teknik olduğudaha önce kanıtlanmıştır (Duffy vd., 2000). Yanlış pozitif / negatif sonuçların ortadan kaldırılması için çalışma örnekleri %0,5' lik NaCl ile hazırlanan 1/8 N HCl asit dilüsyonunda 30 saniye bekletilerek bunun önüne geçilebildiği gözlenmiştir. Düşük seviyede (10-1000 hücre/ml) zenginleştirmeleri yapılan veya yapılmayan gıda ve dışkı

örneklerini kontamine edilmiş ve 37°C' de bir gün inkübe edildikten sonra asit metodu uygulanarak geri kazanım çalışması sonucu STEC 026:H11 ve O111:H-' yi geleneksel yöntemlere göre daha etkili sonuç verdiğini göstermiştir. Gıda ve dışkı örneklerinin zenginleştirme sonrası 37°C' de bir gün HCl asitte bekletilmesi ile seçici besiyerinde kirletici bakterileri öldürüp *E.coli* O157:H7, STEC O26:H11 ve O111:H- bakterilerinin izolasyonlarını daha hızlı bir şekilde gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Duffy vd., 2000). Yaptıkları çalışmada 28 örnekten 19 örneği IMS ile tespit etmişlerdir. Yapıtığımız çalışma sonunda seçici besiyeri kullanılarak birçok Gram (-) bakterinin büyümesi engellenerek STEC O157:H7 izolasyonunda saf kültürlerinden 10 kat daha hassas olarak elde edilmesini kolaylaştırdığı bulunmuştur. HCl asit ile muamele etme işleminin duyarlılık veya dirençlilik açısından bakteri izolasyonlarını hızlandırdığı gözlenmiştir. Böylelikle, bakterilerin izolasyonlarının daha güvenilir ve hızlı bir şekilde yapılabileceği görülmüştür (Duffy vd., 2000).

Çalışmamızda bu öngörüyü ilk kez gıda numunelerinde doğrulamıştır.

KAYNAKLAR

(2014). DİATEK: https://mobil.diatek.com.tr/Makale-Yontem/Gida-Hijyeni-ve-Guvenligi/Gida-Kaynakli-Salmonella-Enfeksiyonlari_287.htm adresinden alındı

Andrews, W., Wang, H., Jacobson, A., Ge, B., Zhang, G., & Hammack, T. (2009, 07 9). *U.S. FOOD AND DRUG*. BAM: Chapter 5: Salmonella: https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella adresinden alındı

Aydın, M. (2017). Adıyaman İlinde Tüketime Sunulan Tavuk Etlerinde Salmonella spp. Yaygınlığının Son Zamanlarda Geliştirilen Biotinil-TiramidYöntemi ile Belirlenmesi . *Harrran Gıda ve Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(4): 412-419.

Beneduce, L., Fiocco, D., & Spano, G. (2007). Devolepment of PCR-based molecular tools for detection of emerging food-ad water borne pathogenic bacteria. *Applied Microbiology* , 569-576.

Benjamin, M., & Datta, A. (1995). Acid Tolerance of Enterohemorrhagic Escherchia coli. *Applied and Enviromental Microbiology*, 61:1669-1672.

Bennet, A., MacPhee, S., & Betts, R. (1996). The isolation and detection of Escherchia coli O157 by use of immunomagnetic seperation and immunoassay procedures. *Letter in Applied Microbiology*, 22: 237-43.

Bennett, A., MacPhee, S., & Betts, R. (1996). The isolation and detection of Escherchia coli O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Letter in Applied Microbiology*, 22:237-43.

Campbell, T., & Choy, F. (2001). Large-scale colony screening and insert orientation determination usin PCR. *BioTechniques*, 30: 32-34.

Campbell, T., & Choy, F. (2001). Large-scale colony screening and insert orientation determination using PCR. *BioTechniques*, 30: 32-34.

Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & Garcia-Fernandez, M. (2002). Occurance of Salmonella inretail chiken carcasse and the irproductsin Spain. *İnternational Journal of Food Microbiology*, 81(2): 69-173.

Castanie-Cornet, M., Penfound, T., Smith, D., Elliott, J., & Foster, J. (1999). Contol of acid resistance in Escherchia coli. *Journal of Bacteriology*, 181: 3525-3535.

CEN. (2001). *Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for the Escherchia coli O157.* Switzerland: www.iso.ch.

Chapman, P. (2000). Sources of E.coli O157 and experiences over the past 15 years in sheffield. *United Kingdom Applied Microbiology*, 88: 51S-60S.

Cox, J. (1999). *Salmonellain, Encylopedia of Food Microbiology.* Great Britain.: Robinson Acedemic Press Boook.

Crick, F., Barnett, S., & Watts-Tobin, R. (1961). General nature of The genetic code for proteins. *Nature*, 192: 1227-1232.

Crump, F., Luby, S., & Mintz, E. (2004). The global burden of typhoid fever, Bulletin of The Word Health Organisation. *Epidemiology and Infection Cambridge Universty Press.*, 82: 346-353.

Çakır, İ., & Çakmakçı, M. (2015). Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, cilt:3 sayı: 12:1-7.

Doyle, M., & Cliver, D. (1990). *Escherchia coli. Chapter 13, Food Borne Diseases.* San Diego, California 92101: Academic Press Book.

Duffy, G., Riordan, D., Sheridan, J., Call, J., Whiting, R., Blair, I., & Mcdowell, D. (2000). Effect of pH on Survival, Thermotolerance and Verotoxin Production of E. coli O157:H7 during Simulated Fermentation and Storage. *Journal of Food Science and Thecnology.*, 63:1,12-18.

Duranoğlu, S., Yıldırım, İ., & Koyuncu, İ. (2008). DEFT (Direkt Epifloresan Filtre Tekniği) Yöntemi ile Mikroorganizmaların sayılması. *Gıda Kongresi.* Erzurum.

Escherich, T. (1988). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Review of İnfectious Disease*, 10(6):1220-1225.

Fukushima, H., & Gomyada, M. (1999). Hydrochloric Acid Treatment For Rapid Recovery of Shiga Toxin-Producing Escherchia coli O26,O111 and O157 From Faeces, Food and Environmental Samples. . *Zentralbl Bacteriology*, 289, 285-299.

Haimovich, B., & Venkatesan, M. (2006). Shigella and Salmonella: death as means of survival. *Microbes and Infection*, 8: 568-577.

Hayes, P. (1995). Food Microbiology and Hygiene Department of Microbiology. *Unversity of Leeds United Kingdom*, 2: 31-40.

Hill, W., Dtta, A., Feng, P., Lampel, K., & Payne, W. (2001). *İdentification food borne bacterial pathogens by gene probes.* Gaithersburg: FDA Bacteriological Analytical Manual.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., & Williams, S. (1994). *Bergys Manual of Determinative Bacteriology.* Amerika: Williams & Wilkins:A Waverly Company.

Hothcox, A., Beuchat, L., & Dolye, M. (1995). Death of Enterohemorrhagic Escherchia coli O157:H7 in Real Mayannaise and Reduced Calorie Mayannaise Dressing as İnfluenced by Initial Population and Storage Temperature. *Applied Environmental of Microbiology*, 61: 4172-4177.

International Standard. (2017, 02). Microbiology of The Food chain-Horizontal methods for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella-Part 1 Detection of Salmonella spp.: www.iso.org adresinden alındı

Jalava, T. (1993). *Detection of Microbial DNA by PCR and Hybridisation.* Helsinki: Orion Corporation.

Kaper, J., Nataro, J., & Mobley, H. (2004). Phatogenetic Escherchia coli. *nature Reviews Microbiology*, 2:123-140.

Kell, D., Kaprelyants, A., Weichart, D., Harwood, C., & Barer, M. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical is sues. *Antonie Von Leeuwenhoek*, 73:169-187.

Kılıçturgay, K., Gökırmak, f., Töre, O., Gedikoğlu, S., Göral, G., & Helvacı, S. (1994). Bursa: Güneş&Nobel Kitapevi.

Klijn, N. (1996). *Molecular techniques for the Identification and detection of Microorganisms Relevant for the Food Industry.* Wageningen: Nederlands Instituut voor Zuiyelonderzoek Verslagen V350.

Kpichhardt, K. (2004). *Gıda Mikrobiyoloji Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar.* İstanbul: Literatür Yayıncılık.

Latimer, W. (2016). *OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL.* Chicago: Hardcover Book.

Lazcka, O., Campo, F., & Munoz, F. (2007). Pathogend etection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7):1205-1217.

Lim, J., Yoon, W., & Hovde, C. (2010). A Brief Overview of Escherchia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biothecnology*, 20(1): 5-14.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Photosynthetic Stages and Light-Absorbing Pigments. *Molecular Cell Biology*, 1084.

Majowicz, S., Musto, J., Scallen, E., Angulo, F., Krik, M., O'Brien, S., . . . Hoekstra, R. (2010). The global burden of non typhoidal Salmonella gastroenteritis . *Clinical infectious diseases*, 50: 882-889.

Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., . . . Tauxe, R. (1999). Food related illness and death in the United States. *Emergency Infectious Diseases*, 5:607-625.

Melton-Celsa, A., Darnell, S., & O'Brien, A. (1996). Activation of Shiga-like toxins by Mouse and human intestinal mucuscor relates with virulence of

enterohemorrhagic Escherchia coli O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin -treatedmice. *İnfection of Immunity*, 64:1569-1576.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., . . . Yanagawa, H. (1999). Massive out break of Escherchia coli O157:H7 infection in schoolchildren in sakai City, Japan, associated with consumption of white radishsprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150: 787-796.

Microbiology of The Food Chain- Horizontal Method for The Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella Part 1 Detection of Salmonella spp. (2017, 04 24). *International Organization of Standardization 6579-1*, 1-67.

Miesfelt, R. (1999). *Applied Molecular Genetics.* New York: Wiley-Liss İnc. Publication.

Moter, A., & Gobel, U. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for directy isualization of microorganisms. *Jornal of Microbiology Methods*, 41(2):85-112.

Nataro, J., & Kaper, J. (1998). Diarrheagenic Escherchia coli. *Clinical Microbiology*, 11: 142-201.

Onoeu, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., Hara-Kudo, Y., Fujita, Y., & Kumugai, S. (1999). Collaborative evaluation of detection methods for Escherchia coli O157:H7 from radishsprouts and graund beef. *International Journal of Food Microbiology.*, 46: 27-36.

Özakın, C., Töreci, K., Gedikoğlu, S., Erdem, B., Erol, İ., Öngen, b., . . . Gülmez, D. (2013). *Salmonella.* İstanbul: Türkiye Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:59.

Özkaya, F., & Cömert, M. (2008). Gıda Zehirlenmelerinde Etken Faktörler. *Türkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 149-158.

Perna, N., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J., & Rose, D. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherchia coli O157. *Nature*, 409:529-533.

Popoff, M., Bockemuhl, J., & Gheesling, L. (2004). Supplement 2002 (no.46) to the Kauffman-White scheme. *Research in Microbiology*, 155: 568-570.

Reece, J., & Campbell, N. (2008). *Biyoloji.* Ankara: Palme.

Riley, L., Remis, R., Helgerson, S., McGee, H., Wells, J., Davis, B., . . . Choen, M. (1983). Haemorrhagic colit isassociated with a rate E.coli serotype. *New England Journal Of Medicine*, 308: 681-685.

Roy, R. (2012). ChaudhuriIanr, Henderson Theevolution of The escherchia coli phylogeny. *Infection Genetics and Evolution* , 214-226.

Schlech, W., Chase, D., & Badley, A. (1993). A model of food-borne Listeria monocytogenes infection in the Sprague-Dawleyratusing gastric inoculation: Development and effect of gastric acidityon infective dose. *İnternational Journal of food Microbiology*, 18: 15-24.

Semanchek, J., & Golden, D. (1998). Influence of Growth Temperature on inactivation and Injury of E.coli O157:H7 by Heat . *Journal of Food Protection*, 61:4, 395-401.

Shulman, S., Friedmann, H., & Sims, R. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician. *Clinical İnfectious Disease*, 45: 1025-1029.

Sincer, E., Şenyuva, H., & Gilbert, J. (2010). Et ve Et Ürünlerinde Tağşiş ve orijinallik. *Gıda & Yem Analiz Dergisi*, 7:12-3.

Stevens, M., Roe, A., Vlisidiou, I., Diemen, P., Ragione, R., Best, A., . . . Wallis, T. (2004). Mutation of toxB and a truncated version of the efa-1 gene in Escherichia coli O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infection and İmmunty*, 72(9): 5402-11.

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI. (2011, Haziran 30). TÜRKİYE HUDUT VE SAHİLLER SAGLIK GENEL MÜDÜRLÜĞÜ: https://www.seyahatsagligi.gov.tr/Site/HaberDetayi/23 adresinden alındı

Tağı, Ş. (2017, 04 26). *Gıdalarda Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü.* İMMUNOLOJİK TEKNİKLER-GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDE UYGULAMALARI: /http://food.eng.ankara.edu.tr/wp-content/uploads/sites/256/2017/04/immunolojik-teknikler-%C5%9Eeref-Ta%C4%9F%C4%B1.pdf adresinden alındı

Threlfall, E. (2008). Health Protection Agency. *Elsevier All Rihts Reserved*.

Tosun, H., & Gönül, A. (2003). Acid Adaptation Protects Salmonella tphyimurium from Environmental Stresses. *Turkey Journal of Biology*, 27: 31-36.

Tutar, E., Köksalan, E., & Akyol, İ. (2015). Gıdalarda bulunan mikrobiyal patojenlerin karakterizasyonunda Real Time PCR teknolojisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 18(4): 26-39.

Tünger, A., Çavuşoğlu, C., & Korkmaz, M. (2005). *Asya Mikrobiyoloji Kitabı.* Erzincan: Asya.

Yelboğa, E., & Karagüler, N. (2012). *Moleküler Biolojik Yöntemler.* Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.

Yoon , J., Lim , J., Park, Y., & Hoyde, C. (2005). Involvement of the Escherchia coli O157:H7(pO157) ecfoperon and lipid A myristoyl transferase activity in bacterial survival in the bovine gastrointestinal tract and bacterial persistence in farm water troughs. *Infection and Immunity*, 73: 2367-2378.

Zimmer, C. (2008). *Microcosm.* New York: Pantheon Book.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi: 15.10.1990

Doğum Yeri: Uzunköprü

Eğitim

Çöpköy İlköğrtim Okulu / Uzunköprü / EDİRNE (1997-2003)

Uzunköpürü Lisesi ve Uzunköprü Yabancı Dil Ağırlıklı Lise / Uzunköprü / EDİRNE (2004-2008)

Lisans, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü / ANKARA (2009-2013)