

TAVUK ETLERİNDEN *SALMONELLA* SPP. BELİRLENMESİNE YÖNELİK HIZLI BİR YÖNTEM*

A RAPID METHOD INTENDED FOR THE DETERMINATION OF *SALMONELLA* SPP. FROM CHICKEN MEATS

Birce MERCANOĞLU TABAN¹, S. Aykut AYTAÇ²

¹Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara

Geliş tarihi: 11.12.2007

ÖZET: Kontamine olmuş tavuk etlerinin, Salmonellaların insanlara bulaşmasına neden olan başlıca gıda kaynağı olmaları ve kültürel belirleme yöntemlerinin zaman alıcı olmaları nedenleri ile, tavuk etlerinde hızlı ve yüksek duyarlılıkta sonuç verebilecek bir *Salmonella* spp. belirleme yönteminin geliştirilmesi üzerine yapılan bu çalışmada, ilk olarak ISO 6579 referans yöntemi kullanılarak *Salmonella* kontaminasyonu olmadığı belirlenen tavuk eti örnekleri, *Salmonella* Enteritidis kültürü ile inoküle edilmiş ve 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme işleminin ardından immünoyenetik ayırma-polimeraz zincir reaksiyonu (İMA-PZR) yöntemi kullanılarak, yaklaşık 1 veya 10 kob/25 gram tavuk eti seviyesindeki hedef bakterinin, toplam 20 saat gibi kısa bir sürede belirlenebilmesi sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: İMA, PZR, *Salmonella*, tavuk eti

ABSTRACT: Since contaminated chicken meats have been the principal foodborne source of the contamination of *Salmonella* to human beings and cultural detection methods are time-consuming; in this study, which had been based on the improvement of a *Salmonella* spp. detection method that can give rapid and high sensitivity result in chicken meats, firstly chicken meat samples, in which no *Salmonella* contamination had been determined by using ISO 6579 reference method, were inoculated with *Salmonella* Enteritidis culture and after the 16-hour non selective pre-enrichment stage, approximately 1 or 10 cfu/25 gram chicken meat levels of target bacteria determination was ensured in totally 20 hours by using immunomagnetic separation-polymerase chain reaction (IMS-PCR) method.

Keywords: IMS, PCR, *Salmonella*, chicken meat

GİRİŞ

Hastalık Denetim ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention–CDC) tarafından rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklar konusundaki veriler; 2005 yılında enterik patojenlerin neden olduğu 16 614 adet enfeksiyon vakasının 6471 adedindeki, 2006 yılında ise enterik patojenlerin neden olduğu 17 252 adet enfeksiyon vakasının 6655 adedindeki etyolojik etmenin *Salmonella* olduğunu göstermektedir (1, 2).

Salmonellaların kırmızı etler, süt ve süt ürünleri ve yumurtalarda sıklıkla bulunmalarının yanısıra gıda endüstrisinde, çoğunlukla, kanatlı etlerinin işlendiği sektörde ortaya çıktıkları bilinmektedir (3, 4). Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (United States Department of Agriculture-USDA) 2000 ile 2005 yılları arasında, tavuk etlerinden Salmonellaların, özellikle de *Salmonella* Enteritidis'in izolasyon sıklığında bir artış olduğunu belirtmiştir (5). Son yıllarda Salmonellaların kanatlı etlerini kontamine etme sıklığının artması da, gıda endüstrisi

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 03.02.602.006 no'lu proje ile desteklenen çalışmanın bir bölümünü oluşturmaktadır.

¹ E-posta : birce@gazi.edu.tr

açısından tavuk etlerinde *Salmonella* varlığının güvenilir şekilde belirlenmesi için hızlı ve yüksek duyarlılıkta yöntemlerin geliştirilmesini hızlandırmıştır (6).

Salmonellalar ile kontamine olmuş gıdalarda bu patojenin sayısının genellikle çok düşük ancak gıdalarda bulunan rekabetçi bakterilerin sayısının yüksek miktarlarda olmasının, Salmonellaların gıdalardan izole edilebilme şanslarını büyük ölçüde azalttığı bildirilmektedir (7, 8). Ayrıca kültürel belirleme yöntemleri ile bu patojenin gıdalardan izolasyonunun, oldukça uzun bir süre aldığı ve yoğun bir işgücü gerektirdiği bilinmektedir (9, 10). Gıdaların çoğunun sınırlı raf ömrüne sahip olmasından dolayı, kültürel belirleme yöntemleri ile izolasyon işlemi tamamlanmadan bu gıdaların tüketildikleri ya da raf ömürlerini tamamladıkları belirtilmektedir (11, 12). Bu nedenle polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi; kültürel belirleme yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen ve hızlı olduğu kadar yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip bir yöntem olarak, günümüzde gıdalardan *Salmonella* belirlenmesinde kullanımı en çok tercih edilen yöntem olmaktadır (13, 14). Ancak bu yöntemin gıdalara uygulanması esnasında, gıda bileşenleri ve mikrobiyel metabolitler gibi hedef DNA amplifikasyonunu engelleyici hücre dışı ve hücre içi inhibitör maddelerden kaynaklanan hatalı-negatif sonuçların sözkonusu olabileceği bildirilmektedir (15, 16). Bu olumsuzluğu önleyebilmek amacı ile, PZR yöntemi öncesi, hedef bakterinin gıdalardan ayrılması ve konsantre edilmesi prensibine dayalı immüno-manyetik ayırma (İMA) yönteminin kullanılabileceği belirtilmektedir (16, 17).

İMA yöntemi, karışık ve yoğun mikroflora içeren bir gıda örneğinden hedeflenen mikroorganizmayı yakalayabilen ve daha ileriki testlerde kullanılmak üzere küçük hacimlere yoğunlaştırabilen (18, 19), homojen, polistiren mikroküreciklerin kullanımını içeren bir yöntemdir. Bu yöntem, immünojenik olarak ayrılmış olan Salmonellaların direkt olarak seçici katı besiyerlerine inokülasyonuna imkan sağlayarak, RV ve SC broth gibi seçici zenginleştirme besiyerlerinin yerini aldığından hızlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (20, 21). İMA sadece hızlı bir yöntem olmakla kalmayıp, şüpheli *Salmonella* izolatlarının, çoğunlukla *Salmonella* pozitif olarak doğrulandığı oldukça özgün bir yöntem olarak da belirtilmektedir (22). Ayrıca, İMA yöntemi ile, hasar görmüş ya da stres altında kalmış *Salmonella* hücrelerinin de izole edilebildiği bildirilmektedir (23).

Bu çalışmada; tavuk etlerinde yaklaşık 1 veya 10 kob/25 gram tavuk eti seviyesinde olan Salmonellaların, 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme işleminin ardından, anti-Salmonella manyetik kürecikleri ile karışık mikroorganizma yükü olan tavuk etlerinden ayrılması, konsantre edilmesi ve daha sonra da Salmonellalara özgü *invA* geninin 284 bp'lik bölgesinin amplifiye edilmesinin hedeflendiği, hızlı olduğu kadar yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip İMA-PZR yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Tavuk etlerinden Salmonellaların belirlenmesinde resmi otoritelerin beklentilerini ve kanatlı et endüstrisinin ihtiyaçlarını yaklaşık 20 saat gibi kısa bir sürede ve gerekli duyarlılıkta karşılayacak böyle bir yöntemin geliştirilmesi ile, sınırlı raf ömrüne sahip tavuk etlerinin tüketime sunulmadan önce Salmonellalar açısından riskli olup olmadığının belirlenebilmesi ve olası mikrobiyel kaynaklı gıda zehirlenmelerinin önüne geçilebilmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Tavuk eti örnekleri

Çalışmada kullanılan yağsız tavuk göğüs eti, Ankara'daki bir marketten tesadüfi olarak alınmış ve 25 gramlık parçalara ayrılarak, herbir parça çalışmanın ilerleyen bölümlerinde kullanılmak üzere, -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Kültür

Salmonella Enteritidis ATCC 13076 kültürü, American Type Culture Collection-ATCC, A.B.D'nden liyofilize olarak sağlanmıştır. Çalışma boyunca kullanılan *S. Enteritidis* kültürü, triptik soy (TS) agar (Merck, Almanya) besiyerinde yatık stoklar halinde +4°C'de muhafaza edilmiş ve uygun zaman aralıkları ile aynı ortamdan yararlanılarak aktive edilmiştir.

İMA yöntemi deney düzeneği ve immunomanyetik partiküller

Çalışmada Dynal® (Norveç) markalı İMA yöntemi deney düzeneği ve yine aynı firmadan sağlanan Dynabeads® anti-Salmonella partikülleri kullanılmıştır. Bu düzenek; örnek karıştırıcısı (Dynal® MX3 sample mixer), örnek tüplerini tutabilen manyetik bir tutucu ve bu tutucunun manyetik çubuğundan (Dynal MPC®-M rack) oluşmaktadır.

PZR yöntemi deney düzeneği ve oligonükleotidler

Çalışmada THE-MWG (Almanya) markalı Primus 96 termocycler ve yine aynı firmadan sağlanan ve *invA* geninin 284 bp'lik bölümünü çoğaltan (24), 139 ileri primeri (5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3') ve 141 geri primeri (5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3') kullanılmıştır.

Yöntem

Çalışmada, ilk olarak, Ankara'daki bir marketten tesadüfi olarak alınan yağsız tavuk göğüs eti örneklerinde, *Salmonella* kontaminasyonu olup olmadığı, ISO 6579 referans yöntemi kullanılarak ve denemeler birden fazla tekrarlanarak belirlenmiş ve ardından *Salmonella* kontaminasyonu olmadığı saptanan bu tavuk eti örnekleri, yaklaşık 10^1 ve $10^0=1$ kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde, *S. Enteritidis* kültürü ile inoküle edilmişlerdir. İnokülasyon yapılan bu tavuk eti örnekleri daha sonra, tamponlanmış peptonlu su (TPS) besiyerinde 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş ve bu işlemi takiben, İMA-PZR yöntemi kullanılarak, yaklaşık 1 veya 10 kob/25 gram tavuk eti seviyesindeki hedef bakterinin, toplam 20 saat gibi kısa bir sürede belirlenebilmesi sağlanmıştır.

ISO 6579 referans yöntemi

Bu yöntemde göre; 25 gramlık yağsız tavuk göğüs eti örneği, 225 mL TPS içeren filtreli steril Stomacher torbasına aktarılmış ve Stomacher cihazında (Stomacher Seeward 400, İngiltere) 1 dakika tutularak, tavuk eti örneği homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan homojenat, ön-zenginleştirme amacı ile, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından ön-zenginleştirme kültüründen 10 ve 0.1'er mL alınarak, sırası ile SC broth (Merck, Almanya) ve RV broth (LAB M, İngiltere) seçici zenginleştirme besiyerlerine aktarılmıştır. SC broth'lar 37°C'de, RV broth'lar ise 42°C'de 24'er saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyonun ardından bu seçici zenginleştirme kültürleri; BLPS agar (Merck, Almanya), Rambach agar (Merck, Almanya) ve Harlequin *Salmonella* ABC (Freeman Formülü) (LAB M, İngiltere) seçici katı besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile ekilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda Petri kaplarındaki koloni gelişimleri incelenerek, şüpheli *Salmonella* kolonisi bulunup bulunmadığı belirlenmiştir.

Tavuk eti örneklerinin *Salmonella* ile inokülasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, ilk olarak, steril lambda tamponu [5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO₄.7H₂O, 50.0 mL 1 M Tris-HCl çözeltisi (pH: 7.5), 0.1 g jelatin, 1000 mL distile su] kullanılarak, 24 saatlik *S. Enteritidis* kültürünün ondalıklı dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Ardından her bir dilüsyondan, 3 adet Triptik Soy (TS) agar besiyerine yayma yöntemi ile inokülasyon yapılmış ve Petri kapları, 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Petri kaplarının yüzeylerindeki koloniler sayılmış ve 10^1 kob *S. Enteritidis* içeren dilüsyon kullanılarak, 25 gramlık 2 adet tavuk eti örneğine, yaklaşık 10^1 ve $10^0=1$ kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde, *S. Enteritidis* kültürü ile inokülasyon yapılmıştır. Bu işlem, tavuk eti örnekleri ile yapılan her bir çalışma başlangıcında tekrarlanmıştır. İnokülasyon işleminin ardından, tavuk eti örnekleri, 225'er mL TPS içeren filtreli steril Stomacher torbalarına aktarılmış ve Stomacher cihazında (Stomacher Seeward 400, İngiltere) 1 dakika tutularak, homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan homojenatlar, 37°C'de 16 saatlik süre boyunca seçici olmayan bir ön-zenginleştirme işlemine tabi tutulmuşlardır.

İMA yöntemi

Bu yöntemde göre, 16 saatlik ön-zenginleştirme kültürlerinden 1'er mL alınarak, manyetik tutucudaki steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Üzerlerine 20'şer µL Dynabeads® anti-Salmonella partikül süspansiyonu eklen-

miş ve partiküllerin yüzeyini kaplamış olan hedef mikroorganizmaya özgü antikorların Salmonellaları bağlayabilmesi için, oda sıcaklığında 20 dakika süre ile örnek karıştırıcısında sürekli olarak karıştırılarak inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda manyetik çubuk, Eppendorf tüplerini taşıyan manyetik tutucuya yerleştirilerek, tüpler 3 dakika da elde karıştırılmışlardır. Böylelikle; Salmonella+anti-Salmonella komplekslerinin, manyetik çubuğun yarattığı manyetik alan etkisi ile, tüplerin iç yüzeylerinde gözle görülebilir bir şekilde toplanmaları sağlanmıştır. Ardından, Salmonella+anti-Salmonella komplekslerinin dağılımlarına izin vermeyecek bir şekilde, tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Manyetik çubuk, manyetik tutucudan çıkarıldıktan sonra, yıkama amacı ile tüplere 1'er mL İMA yıkama çözeltisi eklenerek karıştırma yapılmıştır ve bu yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır. Son yıkamanın ardından yine manyetik çubuk yardımı ile oluşturulan Salmonella+anti-Salmonella komplekslerinin üzerine, 0.2'şer mL lambda tamponu eklenerek karıştırılmıştır.

DNA izolasyonu ve saflaştırılması işlemi

Çalışmanın bu aşamasında high pure PCR template preparation kitine (Roche, Almanya) göre, 1.5 mL'lik steril Eppendorf tüpüne, İMA yöntemi sonucunda elde edilen 200'er µL bakteri süspansiyonu ve 5 µL lizozim çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyonun ardından aynı tüpe, 200 µL bağlama tamponu ve 40 µL proteinaz K çözeltisi eklenerek, hemen karıştırılmış ve 70°C'de 10 dakika süre ile ikinci bir inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aynı tüpe, 100 µL izopropanol eklenerek karıştırılmış ve bu karışım, filtre başlık içeren toplama tüpünün üstteki filtre kısmına aktararak, 8000 g'de 1 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen bu filtre kısmına, 500 µL inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenerek, 8000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen bu filtre kısmına, 500 µL yıkama tamponu eklenerek 8000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant içeren toplama tüpü atılarak filtre, başka bir steril toplama tüpüne yerleştirilmiş ve bir önceki işlem tekrar edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve filtre, aynı toplama tüpüne yerleştirilerek, 13 000 g'de 10 saniye santrifüj işlemi yapılmıştır. Artakalan süpernatantı içeren toplama tüpü atılmış ve filtre, 1.5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen filtre üzerine, 200 µL 70°C'de bekletilen ayırma tamponu eklenerek, 8000 g'de 1 dakika süre ile son bir santrifüj işlemi yapılmıştır. Son olarak, filtre başlık atılmış ve tüpte kalan süpernatant, hedef DNA'yı içerdiğinden, ileri aşamalarda kullanılmak üzere - 20°C'de saklanmıştır.

PZR yöntemi

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak, PZR tüpü içerisinde, 1.5 µL hedef DNA ile birlikte, 200 µM PZR nükleotid karışımı (Roche, Almanya), 0.5'er µM 139 ileri ve 141 geri primerleri, 2.0 mM MgCl₂ (Roche, Almanya), 0.025 U/µL FastStart Taq DNA polimeraz enzim çözeltisi (Roche, Almanya) olmak üzere toplam 50 µL'lik PZR amplifikasyon karışımı hazırlanmış ve Çizelge 1'de gösterilen PZR döngüsü sıcaklık ve süre parametre değerleri kullanılarak, *invA* geninin 284 bç'lik bölümü çoğaltılmıştır.

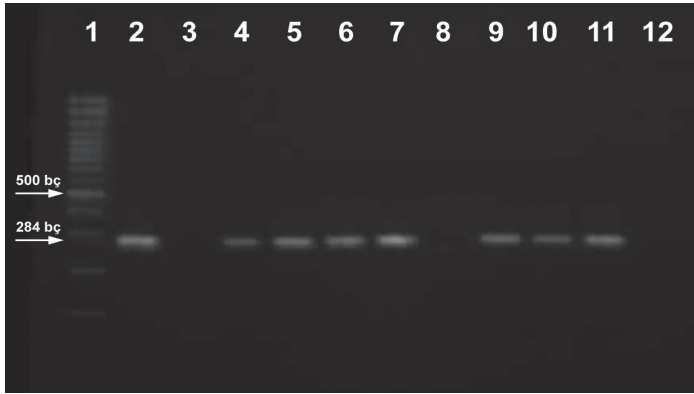
Çizelge 1. PZR döngüsü sıcaklık ve süre parametre değerleri

	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü sayısı (adet)
Başlangıç denatürasyonu	95	180	1
Denatürasyon	95	45	
Bağlanma (annealing)	52	45	35
Uzama (elongation)	72	60	
Son uzama (final extension)	72	420	1

Çoğaltma işleminin ardından %1.5'lik agaroz jeli (v/v) (Serva, Almanya) kullanılarak, agaroz jel elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş ve bu işlemi takiben, çoğaltılan hedef DNA'nın gösterilmesi amacı ile jel, 302 nm dalga boyunda UV ışık altında 100 bç'lik GeneRuler™ DNA ladder plus (ready-to-use) moleküler ağırlık belirteci (Fermentas, Litvanya) ile karşılaştırılarak görüntülemeye alınmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada ilk olarak, çalışma boyunca kullanılan tavuk eti örneklerinde, ISO 6579 referans yöntemi kullanılarak, *Salmonella* bulaşısı olmadığı belirlenmiştir. Daha sonra; 10^1 ve $10^0=1$ kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde *S. Enteritidis* kültürü ile inoküle edilen bu tavuk eti örnekleri, TPS besiyerinde 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş ve bu işlemi takiben, İMA-PZR yöntemi kullanılarak, yaklaşık 1 veya 10 kob/25 gram tavuk eti seviyesindeki hedef bakterinin, toplam 20 saat gibi kısa bir sürede belirlenebilmesi sağlanmıştır. İMA-PZR yönteminin tekrarlanabilirliğini göstermek amacı ile, bu işlem 6 kez tekrarlanmıştır. İlk tekrara ait PZR sonucu, Şekil 1'de gösterilmekte ve Çizelge 2'de açıklanmaktadır.



1	100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci
2	Pozitif kontrol (PK)
3	Yükleme yapılmadı
7	A: Yaklaşık 10^1 kob/25 g tavuk eti
11	A: Yaklaşık $10^0=1$ kob/25 g tavuk eti
12	Negatif kontrol (NK)

A: İnokülasyon seviyesi

Şekil 1. Yaklaşık 10^1 ve $10^0=1$ kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde *S. Enteritidis* kültürü ile inoküle edilen tavuk eti örneklerinin, 16 saatlik bir ön-zenginleştirme süresine tabi tutulmalarının ardından uygulanan İMA-PZR yöntemi sonucunun, %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1. tekrerrür)

Çizelge 2. Yaklaşık 10^1 ve $10^0=1$ kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde, *S. Enteritidis* kültürü ile inoküle edilen tavuk eti örneklerinin, 16 saatlik bir ön-zenginleştirme süresine tabi tutulmalarının ardından uygulanan İMA-PZR yöntemi sonucu, hedef bakteriye özgün 284 bç'lik bantın gözlenebilirliği (1. tekrerrür)

Ön-zenginleştirme süresi (saat)	16
İnokülasyon seviyesi (kob/25 gram tavuk eti)	İMA-PZR yöntemi sonucu hedef bakteriye özgün 284 bç'lik bantın gözlenebilirliği
10^1	+
$10^0=1$	-

+ : 284 bç'lik bant gözlenmiştir.

- : 284 bç'lik bant gözlenememiştir.

Şekil 1. ve Çizelge 2'nin incelenmesinden de görülebileceği gibi, yaklaşık $10^0=1$ ve 10^1 kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde inoküle edilen tavuk eti örneklerinde, 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme sonrası özgün 284 bç'lik bant gözlenebilmiştir. Bu ilk tekrerrür esnasında, hatalı-pozitif ya da beklenilmeyen ürün (primer-dimer) bandına rastlanılmamıştır.

Tavuk eti örnekleri ile yapılan diğer tekrerrür çalışmalarının sonuçları ise, Çizelge 3'de gösterilmektedir.

Çizelge 3. Yaklaşık 10^1 ve $10^0=1$ kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde, *S. Enteritidis* kültürü ile inoküle edilen tavuk eti örneklerinin, 16 saatlik bir ön-zenginleştirme süresine tabi tutulmalarının ardından uygulanan İMA-PZR yöntemi sonucu, hedef bakteriye özgün 284 bç'lik bantın gözlenebilirliği

Inokülasyon seviyesi (kob/25 gram tavuk eti)		10^1 *	$10^0=1$ **
Ön-zenginleştirme süresi (saat)	Tekerrür no	İMA-PZR yöntemi sonucu hedef bakteriye özgün 284 bç'lik bantın gözlenebilirliği	
16	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	-
	5	+	+
	6	+	+

+ : 284 bç'lik bant gözlenmiştir. * : 10^1 dilüsyonundan 1 mL ekim
- : 284 bç'lik bant gözlenmemiştir. ** : 10^1 dilüsyonundan 0.1 mL ekim

Çizelge 3'ün incelenmesinden de görülebileceği gibi, yaklaşık 10^1 kob/25 gram tavuk eti olacak şekilde inoküle edilen tavuk eti örneklerinde, 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme sonrası özgün 284 bç'lik bant gözlenebilmiştir. 25 gramlık tavuk eti örneğinin yaklaşık $10^0=1$ kob *Salmonella* spp. ile kontamine olması durumunda ise, çalışma boyunca uygulanan İMA-PZR yöntemi öncesi 16 saatlik bir ön zenginleştirme işlemi uygulamasının, hedef bakteriyi belirleyebilmede yeterli olduğu gözlenmiştir.

Salmonella kontaminasyonu açısından riskli kabul edilen tavuk etlerinde *Salmonella* kontaminasyonu olup olmadığının belirlenmesi amacı ile kullanılan klasik belirleme yöntemleri yaklaşık 5-8 gün sürmekte iken (25), çalışma boyunca uygulanan İMA-PZR yönteminin kullanılması ile, tavuk etlerinde yaklaşık $10^0=1$ ve 10^1 kob/25 gram tavuk eti seviyesinde *Salmonella* spp.'ın toplam 20 saat içerisinde belirlenebileceği saptanmıştır. Widjojoatmodjo ve ark. (26); PZR yöntemi öncesi herhangi bir ön-zenginleştirme işlemi uygulamaksızın direkt olarak İMA yönteminin uygulanması ile, 5 saat içerisinde 100 kob *Salmonella* seviyesinde izolasyon yapılabileceğini göstermişlerdir. Ancak *Salmonella*ların belirlenmesinde resmi otoritelerin beklentilerini ve ihtiyaçlarını karşılayacak daha duyarlılıkta bir izolasyon işlemi gerektiğinden, böylesi bir izolasyonun gerçekleştirilebilmesi için muhakkak bir ön-zenginleştirme işleminin yapılması gerektiği belirtilmiştir (27). Rijpens ve ark. (9) ise; PZR yöntemi öncesi TPS besiyerinde 16 saatlik seçici olmayan bir ön-zenginleştirme işlemi ve İMA yöntemi uygulamasının ardından RV broth besiyerinde 4 saatlik bir seçici zenginleştirme ile, 25 gramlık yumurta, dondurma ve peynirlerden, ortalama 5.9 kob *Salmonella* seviyesinde izolasyon yapabildiklerini ve bu işlemin yaklaşık 24 saat sürdüğünü belirtmişlerdir. Tavuk etleri ile yaptığımız bu çalışma esnasında kullanılan İMA-PZR yöntemi ile, hem daha duyarlılıkta hem de daha hızlı sonuç alındığı görülmektedir. Kontaminasyon seviyesine bakılmaksızın tavuk etlerinde herhangi bir *Salmonella* varlığının görülmesi, 1990 tarihli Birleşik Krallık Gıda Güvenliği Yasası açısından sakıncalı olduğundan ve *Salmonella*ların neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi amacı ile, tavuk etlerinin 25 gramında bulunabilecek bir tek *Salmonella* hücresinin bile İMA-PZR yönteminin kullanılması ile toplam 20 saat gibi kısa bir sürede belirlenebileceği, bir başka deyişle bu kombine yöntemin, tavuk etlerinin tüketime sunulmadan önce *Salmonella* içeriklerinin kesin olarak bilinmesini mümkün kılacağı sözkonusu olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5514a2.htm>
2. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a4.htm>
3. D'Aoust JY. 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*, International J Food Microbiol, 12: 14-70.
4. Hedberg CW, MacDonald, KL and Osterholm, MT. 1994. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. Clin Infect Dis, 18: 671-682.
5. Altekruze SF, Bauer N, Chanlongbutra, A, DeSagun R, Naugle A, Schlosser W, Umholtz R and White P. 2006. *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens, United States, 2000-2005. Emerg Infect Dis, 12: 1848-1852.
6. Mandrell RE and Wachtel MR. 1999. Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. Curr Opin Biotech, 10: 273-278.
7. Carli KT, Eyigor A and Caner V. 2001. Prevalence of *Salmonella* serovars in chickens in Turkey. J Food Protect, 64: 1832-1835.
8. Eyigor A, Goncagul G, Gunaydin E and Carli KT. 2005. *Salmonella* profile in chickens determined by real-time polymerase chain reaction and bacteriology from years 2000 to 2003 in Turkey, Avian Pathol, 34 (2) 101-105.
9. Rijpens N, Herman L, Vereecken F, Jannes G, Smedt JD and Zutter LD. 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. Int J Food Microbiol. 46: 37-44.
10. Boraychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK and Renter DG. 2007. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. J Food Protect, 70 (5): 1080-1087.
11. Mansfield LP and Forsythe SJ. 2000. Detection of salmonellae in food, Rev Med Microbiol, 11 (1): 37-46.
12. Seo KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE and Holt PS. 2004. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. J Food Protect, 67 (5): 864-869.
13. Pan T-M and Liu Y-J. 2002. Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. J Microbiol, Immunol Infect, 35: 147-151.
14. Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V and Qazi GN. 2004. Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. Mol Cell Probe, 18: 333-339.
15. Jeníková G, Pazlarová J and Demnerová K. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. Int Microbiol, 3: 225-229.
16. Španová A, Rittich B, Horák D, Lenfeld J, Prodělalová J, Sučíková J and Štrumcová S. 2003. Immunomagnetic separation and detection of *Salmonella* cells using newly designed carriers. J Chromatogr A, 1009: 215-221.
17. Španová A, Rittich B, Karpíšková R, Čechová L and Škapová D. 2001. PCR identification of *Salmonella* cells in food and stool samples after immunomagnetic separation. Bioseparation, 9: 379-384.
18. Fratamico PM and Crawford CG. 1999. Detection by commercial particle-based assays. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2, RK Robinson (chief ed), pp. 655-661, Academic Press, Great Britain.
19. Safarik I and Safarikova M, 1999. Review: Use of magnetic techniques for the isolation of cells. J Chromatogr B, 722: 33-53.
20. Skjerve E and Olsvik O. 1991. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. Int J Food Microbiol, 14: 11-18.
21. Molla B, Kleer J and Sinell H-J. 1994. Detection of *Salmonella* in foods by immunomagnetic separation. Arch Lebensmittelhgy, 45 (5): 110-113.
22. Cudjoe KS, Krona R and Olsen NN. 1994. IMS: a new selective technique for detection of *Salmonella* in foods. Int J Food Microbiol, 23: 159-165.
23. Mansfield LP and Forsythe SJ. 1993. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. Lett Appl Microbiol, 16: 122-125.
24. Rahn K, de Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, Curtis III R and Gyles CL. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method for detection of *Salmonella*. Mol Cell Prob, 6: 271-279.
25. Heyndrickx M, Vandekerchove D, Herman L, Rollier I, Grijspeerd K and De Zutter L. 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. Epidemiol Infect, 129: 253-265.
26. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BHI and Verhoef J. 1991. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. Eur J Clin Microbiol, 10 (11): 935-938.
27. Suslow TV, Wu J, Fett WF and Harris LJ. 2002. Detection and elimination of *Salmonella* Mbandaka from naturally contaminated alfalfa seed by treatment with heat or calcium hypochlorite. J Food Protect, 65 (3): 452-458.