

# GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDE İMMUNO MANYETİK AYIRMA SİSTEMLERİ

## IMMUNOMAGNETIC SEPARATION METHODS IN FOOD MICROBIOLOGY

Z. Yeşim ÖZBAŞ

Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe, 06532 Ankara

**ÖZET:** Mikrobiyolojik analizlerin, gıdalarda rutin olarak uygulanmaya başlamasından bu yana bilim adamları, denemelerde kullanılan metotları kolay uygulanabilir duruma getirmeye veya hızlı metotlarla geliştirmeye çaba harcamaktadırlar. Klasik yöntemlere oranla daha elverişli, duyarlı, spesifik ve doğru sonuçlar alınabilecek hızlı ve otomasyona uygun yöntemlere olan ilgi, son 20 yılda giderek artmıştır. Bu hızlı metotlardan birisi olan immunomanyetik ayırma (IMS) yöntemi, son zamanlarda oldukça dikkati çekmektedir. Bu derlemede IMS yöntemi, prensipleri, uygulamaları ve araştırma gereksinimleri üzerinde durulmuştur.

**ABSTRACT:** Ever since microbiological analysis was routinely applied to foods, scientist have been trying to simplify or device faster methods for testing. Interest in rapid and automated methods that are more convenient, sensitive, specific and accurate than conventional methods have been increasing steadily in the last twenty years. One of these rapid methods, Immunomagnetic separation (IMS) has attracted much attention lately. In this review, IMS method, principles, applications and future perspective were introduced.

### GİRİŞ

Son yıllarda mikrobiyolojide hızlı analiz yöntemleri ve otomasyon üzerinde önemle durulmakta ve bu alanlarda sürekli bir gelişme yaşanmaktadır. Tüm bu çabaların amacı gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde daha hızlı ve güvenilir sistemler oluşturabilmektir.

Gıda zehirlenmelerine yol açan mikroorganizmalar, insan sağlığı için ciddi tehlikelere neden olurlarken, aynı zamanda önemli ekonomik kayıplara da yol açmaktadırlar. Gıda tüketim alışkanlıklarındaki hızlı değişim ile toplu gıda üretimi ve uluslararası gıda ticaretinin artmasına bağlı olarak, çeşitli patojen bakteriden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri sayısı da, dünyanın hemen her bölgesinde özellikle son yıllarda artışlar göstermiştir. Klasik kültürel teknikler ile gıdalardan patojen mikroorganizmaların saptanması, genellikle ön zenginleştirme, seçici zenginleştirme, seçici katı besiyerine ekim, doğrulama amaçlı biyokimyasal ve serolojik testlerin yapılması aşamalarını içermektedir. Bu şekilde, belirtilen patojenlerin gıdalardan izolasyonu uzun bir süre almakta ve yoğun bir iş gücü gereksinimini ortaya çıkartmaktadır. Gıdaların çoğunun sınırlı raf ömürleri nedeni ile klasik yöntemlerle izolasyon işlemi tamamlanamadan, bu gıdaların tüketildikleri veya raf ömrünün tamamladıkları görülmektedir.

Gıdaların hızlı mikrobiyolojik analizleri için geliştirilen mikrobiyal ayırma tekniklerinden birisi de immuno manyetik ayırma (IMS) yöntemidir. IMS, hedeflenen mikroorganizmayı gıda matrislerinden doğrudan ayırarak yoğunlaştıran ve hızlı şekilde izole edebilen, kısa sürede tamamlanabilen seçici bir zenginleştirme tekniği olarak tanımlanmaktadır.

Gıda endüstrisinde, güvenilir bir gıda üretimini sağlayabilmek amacı ile HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) uygulamalarının giderek yerleşmesi, endüstrideki ve gıda mikrobiyolojisi uygulamalarındaki gelişmeler gıda kaynaklı patojenlerin hızlı şekilde belirlenmesi konusunu giderek daha önemli bir duruma getirmiştir. IMS yöntemi, aynı zamanda, bu kapsamda geliştirilen yeni yöntemlerden birisi olarak da kabul edilmektedir.

## **GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDEKİ HIZLI YÖNTEM ARAYIŞLARI VE IMS YÖNTEMİNİN TARİHSEL GELİŞİMİ**

Hızlı yöntemler ve otomasyon, uygulamalı mikrobiyolojinin dinamik alanını oluşturmaktadır. Bu metotlar klinik, endüstriyel, çevre ve gıda örneklerinden moleküler biyoloji, mikrobiyolojik, kimyasal, biyokimyasal, biyofiziksel, immunolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak mikroorganizmalar ve onların metabolitlerinin saptanması ve tanımlanmalarına yönelik olarak uygulanmaktadır.

Gıda mikrobiyolojisinde karışık kültürlerden belirli mikroorganizmaların ayrılması ve varlıklarının belirlenmesi işlemleri çoğunlukla uzun süreli ön zenginleştirme basamaklarını da içerdiğinden zaman kaybına ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bununla birlikte, yine bir gıda maddesinin mikrobiyolojik olarak analizi örnek alımından sonuca ulaşıncaya kadar günlerce sürebilmektedir. Bu nedenle günümüzde, gıda kaynaklı patojenlerin daha kısa sürede ve daha güvenilir yöntemler ile tespit edilebilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılacak metotlarda da önemli gelişmeler olmuştur. Bunlardan birisi de, karışık, yoğun flora içeren bir gıda örneğinden veya fekal bir örnekten hedeflenen mikroorganizmayı yakalayabilen ve daha ileriki testlerde kullanılmak üzere küçük hacimlere konsantre edebilen manyetik partiküllerin kullanımını içermektedir (FUNG, 1997; FRAMTAMICO ve CRAWFORD, 1999).

Manyetizma, bir karışımda bulunan manyetik özellikteki bileşenleri manyetik olmayanlardan ayırabilen önemli bir sürücü güç olması nedeni ile uzun zamandır ilgi çeken bir konu olmuştur. Düşük tenörlü demir cevherlerinin zenginleştirilmesi, konvensiyonel ve nükleer güç tesislerindeki fazla miktardaki kazan sularından ferromanyetik safsızlıkların ve kaolin kilindeki renkli manyetik safsızlıkların uzaklaştırılması manyetik ayırmanın tipik endüstriyel uygulamaları olarak gösterilmektedir. Bu tekniklerin biyolojik bilimlerde uygulanabilirliğinin ise 1970'lere kadar sınırlı kaldığı belirtilmektedir. Bu alanda dikkati çeken ilk uygulamanın manyetik ayırma tenniklerinin memeli hücrelerinin ayırımında kullanılması olduğu bildirilmektedir (SAFARIK ve SAFARIKOVA, 1999). Manyetizmanın biyolojik bilimlere sıçrayışında, özellikle yeni manyetik partiküllerin ve ileri hücre ayırma işlemlerinin geliştirilmesi önemli rol oynamıştır. Manyetik ayırma ile hedef hücrelerin doğrudan kan, kemik iliği, doku homojenatları veya feçesten ayrılabilirdikleri belirtilmektedir (KOHN, 1999). Bu yöntemin diğer klasik ayırma yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha basit, hızlı, seçici ve diğer metotlar ile kombinasyona elverişli olduğu bildirilmektedir. Manyetik ayırma ile izole edilen hücrelerin genellikle saf, canlı ve değişime uğramamış olmalarının yöntemin diğer bir üstünlüğü olduğu bildirilmektedir.

IMS'nin gıda mikrobiyolojisinde uygulanması ise; memeli hücreleri için geliştirilmiş olan partiküllerin bakterilere karşı antikolar ile kaplanarak, hedeflenen patojenlerin gıdalardan veya üretildikleri ortamlardan izolasyonu amacı ile kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. İlk kullanılan partiküllerde boyut veya yüzey kimyası nedeni ile yaşanan problemlerin, gıda uygulamaları için özgül olarak dizayn edilen partiküllerin üretilmeleri ile giderildikleri belirtilmektedir. IMS yönteminin tarihsel gelişim sürecinde, patojenler için özgül partiküllerin üretilmeleri en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Memeli hücrelerinin manyetik ayırımı ile karşılaştırıldığında, hedeflenen patojenlerin gıda gibi çok kompleks bir ortamda, düşük sayıda ve rekabetçi flora ile birlikte bulunmalarının, her bir patojen için çok özgül partiküllerin üretilmesini zorunlu hale getirdiği bilinmektedir. Ticari olarak özgül partiküllerin üretiminde ilk önemli aşama Norveç 'de Dynal® tarafından gerçekleştirildiği bildirilmektedir (SAFARIK ve SAFARIKOVA, 1999).

Norveç'li bir bilim adamı olan Prof. Dr. John Ugelstad (31.3.1921-4.4.1997), 1979 yılında, tamamiyle aynı büyüklüklere sahip polimer partikülleri oluşturabilen bir proses geliştirmiştir. Daha önce NASA'da çalışan bilim adamları tarafından yalnızca ağırlıksız koşullarda; uzay boşluğu koşullarında başarılabilen bu işlem, Prof. Ugelstad ve ekibinin araştırmaları sonucunda, çapları 0.5-100 µm arasında değişebilen uniform simetrik küresel partiküllerin üretilmesine olanak sağlamıştır. Ekibin daha sonraki çalışmaları ile Dynabeads® olarak isimlendirilen, manyetize olabilen uniform polimer partiküllerinin üretimi gerçekleştirilmiştir (ANONYMOUS, 1995; ANONYMOUS, 1997).

Dynal'ın 1986 yılında "Biyomanyetik Ayırma Teknolojisi"ni bilim dünyasına tanıtırması ile, tekniğin uygulama alanlarının genişleyerek, hücre immunolojisi, HLA doku tiplendirmesi, moleküler biyoloji, protein saflaştırması, mikrobiyoloji ve immunoloji dallarında da kullanımın yaygınlaştığı belirtilmektedir.

### **İMMUNO MANYETİK AYIRMA SİSTEMLERİNİN ESASLARI**

Hücreler ile çalışıldığında iki tip manyetik ayırma söz konusu olabilmektedir. Bunların ilkinde; ayrılacak olan hücre yeterli bir iç manyetik momente sahiptir ve böylece manyetik ayırma hiç bir modifikasyona gereksinim olmadan gerçekleştirilebilmektedir. Doğada bu özellikleri gösteren yalnızca iki tip hücre bulunmaktadır. Bunlar kırmızı kan hücreleri olarak da adlandırılan ve yüksek derişimlerde paramanyetik özellikte olan hemoglobin içeren eritrositler ve hücre içerisinde küçük manyetik partikülleri barındıran manyetik özellikli bakteriler olarak tanımlanmaktadır. İkinci tip ayırmada ise; bir karışımındaki tek veya daha fazla diamanyetik (manyetik özellikte olmayan) bileşen manyetik olarak işaretlenerek, hücre ve ortam arasında bir manyetik duyarlılık farkı oluşturulmaktadır. Manyetize özellik kazandırılmış partiküllere bağlama ise, genellikle hücre yüzeyindeki hedef yapılar ile etkileşime girme özelliğine sahip, değişik yapılarıdaki affinite ligantları ile sağlanmaktadır (SAFARIK ve SAFARIKOVA, 1999).

Manyetik ayırma işleminde kullanılan manyetize olabilen partiküllerin üretimi yaygın olmakla beraber, gıdalardan ve sulardan patojenik mikroorganizmaların spesifik olarak izolasyonu ve belirlenmesi için antibadi kaplı manyetize olabilen partikülleri ticari olarak üreten ve pazarlayan bir kaç firma bulunmaktadır. Bununla birlikte, tüm IMS sistemlerinde ortak prensip; heterojen süspansiyonlardan, özgül antibadi kaplı manyetize olabilen partiküllere bağlanmış olan bakterilerin veya hücrelerin manyetik bir alan uygulaması ile izole edilebilmeleridir. İmmunolojik olarak partiküllere bağlanmış olan bakteriler daha sonra beslenme gereksinimleri karşılandığında gelişebilmektedirler.

İşlem; antibadi kaplı partiküllerin önceden hazırlanmış örnek ile karıştırılması, inkübasyon ve partikül-bakteri karışımının bir miknatıs aracılığında yaratılan manyetik alanda tutulması basamaklarını içermektedir (Cudjuo, 1999). İzole edilen bakteri-partikül kompleksi uygun gelişme ortamına aktarılmadan veya diğer belirleme sistemlerine geçmeden önce uygun tampon çözelti ile yıkama işlemi gerçekleştirilmektedir.

Alternatif olarak, hücreler parçalanmakta ve hücre içeriği kromatografi, elektroforez, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi çeşitli yöntemler ile analiz edilebilmektedir.

Hücrelerin manyetik ayırımı genellikle kesikli olarak gerçekleştirilmektedir. Kromatografik ve elektromigrasyon yöntemleri açısından bakıldığında, manyetik ayırma yöntemleri bir ön ayırma işlemi olarak tanımlanabilmektedirler. Bununla birlikte, manyetik olarak stabilize edilmiş akışkan yatakları kullanan ayırmalar, standard akışkan yatak kromatografi ayırma prosesleri arasında kabul edilmektedirler (SAFARIK ve SAFARIKOVA, 1999).

### **MANYETİZE OLABİLEN PARTİKÜLLERİN TİPLERİ VE ÖZELLİKLERİ**

Manyetik işaretleme manyetik ve süperparamanyetik partiküller, manyetik kolloidler, magnetolipozomlar kullanılarak veya moleküler manyetik işaretleme ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan manyetik partiküller homojen, süperparamanyetik, polistren mikro küreciklerden oluşmaktadır. Partiküler  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  gibi manyetik maddeleri içeren bir çekirdek bölgesini içermektedirler. Bu partiküller manyetize özellikteki çekirdek bölgesini saran ve ona çeşitli moleküller ile birleşebilme veya çeşitli molekülleri adsorbe edebilmesi için belirli bir yüzey alanı kazandıran polimer özellikte hidrofobik bir kabuk ile kaplanmışlardır. Partikül ölçüleri ve şekillerinin homojen olması, fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı bir sistemin oluşmasını sağlamaktadır. Bu özelliğin kazandırdığı diğer üstünlükler şöyle sıralanabilmektedir; (ANONYMOUS, 1998; ANONYMOUS, 2000).

- Partikül boyutlarının homojen olması partiküler ile hedef mikroorganizma arasındaki reaksiyon kinetiğinin optimal olmasını sağlamaktadır. Böylece hızlı ve etkin bir bağlanmanın gerçekleşebildiği belirtilmektedir.

- Küresel geometri kimyasal aglütinasyon ve özgül olmayan bağlanmayı en aza indirebilmektedir.
- Homojen yüzey alanının verimli bir kullanım sağladığı ve hedef prob ile optimal bir etkileşimin sağlanmasına neden olduğu bildirilmektedir.
- Partiküllerin dışındaki polimer kılıfın, hedef mikroorganizmayı demirin toksik etkisinden koruduğu belirtilmektedir.
- Süperparamanyetik özellikte olan partiküllerin manyetize olabilmeye özelliklerini yalnızca dış bir manyetik alan varlığında gösterebildikleri, bunun dışında normal maddeler gibi davrandıkları bilinmektedir.
- Partiküllerin hidrofobik karakterlerinin, hedef hücrelerin partikül yüzeyine kolaylıkla adsorbe olmalarını sağladıkları bildirilmektedir.

Hücre ayırımı amacı ile kullanılan partiküllerin çapları genellikle 1-5 µm arasında bulunmaktadır. Bazı manyetik partiküller ticari olarak sağlanabilmektedirler. Spesifik mikroorganizmaların hızlı izolasyonu amacı ile kullanılan Dynal® partiküllerinin çapları 2.8 µm (Dynabeads® M-280), 4.5 µm (Dynabeads® M-450) ve 5.0µm (Dynabeads® M-500) olup, canlı bakterilerin belirli yüzey yapıları ile birleşebilecek özellikteki saflaştırılmış antibadiler ile kovalent olarak bağlanacak şekilde kaplanmışlardır.  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , kromdioksit  $\text{Er}^{+3}$ ,  $\text{ErCl}_3$  gibi manyetize olabilen veya mikroorganizma hücrelerini manyetize hale getirebilen maddeler, polimerler ile birlikte partiküllerin hazırlanmalarında kullanılmaktadırlar. Polimer maddeler partiküllerin aktivasyonu için kullanılan fonksiyonel grupların kaynağını oluşturmaktadırlar. Dynal®'in M-450 partiküllerinin yüzey alanının  $1\text{-}4\text{ m}^2\text{g}^{-1}$ , yoğunluğunun  $1.5\text{ g cm}^{-3}$  ve demir içeriğinin %20 (w/v) olduğu ve  $1.0\text{ mg}'\text{i}$  içerisinde  $1.7 \times 10^7$  partiküle sahip olduğu bildirilmektedir (SAFARIK et al, 1995). Mikroorganizmaların manyetize hale getirilebilmesi için genellikle erbium iyonlarının ( $\text{Er}^{+3}$ ) kullanıldığı belirtilmektedir. Bu iyonların hücrenin dış yüzeyine büyük afinite gösterdikleri ve bu üstünlüklerini çeşitli kimyasal yapılardaki yüksek atomik manyetik dipol momentinde (9.3 Bohr magnetom) bile koruyabildikleri bildirilmektedir (SAFARIK ve SAFARIKOVA, 1999).  $\text{Er}^{+3}$  iyonlarının hücre yüzeyine bağlanma bölgelerinin ise; glikoproteinlerdeki karboksil grupları oldukları belirtilmektedir. Manyetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizma hücreleri çeşitli tiplerde olabilen ferrograflar veya ince tabaka magnetoforez aygıtları ile ayrılabilirler. Hücrelerin ( $\text{Er}^{+3}$ ) iyonları ile manyetik olarak işaretlenmelerinin, onların Gram boyama veya immunofloresans gibi özelliklerini etkilemediği belirtilmektedir. Manyetize edilmiş bakteri hücrelerinin aynı zamanda çevre kirliliği ile savaşımında da kullanıldığı bildirilmektedir.

## YÖNTEMİN UYGULANIŞI

Direkt immuno manyetik ayırma tekniğinde; hedef mikroorganizma için spesifik olan immuno manyetik partiküller karışık hücre süspansiyonu ile karıştırılmaktadırlar. Uygun bir inkübasyon süresinin ardından immuno manyetik olarak bağlanmış olan hedef mikroorganizma hücreleri, manyetik bir ayırıcı ile süspansiyondan ayrılmaktadırlar. Geriye kalan sıvı uzaklaştırılarak, tutulmuş olan manyetik partikül pelleti uygun bir tampon çözelti ile bir kaç kez yıkanmaktadır (SAFARIK ve ark. 1995). Alternatif olarak uygulanabilen dolaylı teknikte ise; primer antibadi önce mikroorganizma süspansiyonuna eklenmekte, daha sonra bunun hedef hücre yüzeyine bağlanmasının ardından, immobilize sekonder antikor içeren manyetik partiküller ortama eklenmektedirler. Primer ve sekonder antibadiler arasındaki etkileşiminin ardından, tüm kompleks manyetik bir ayırıcının yardımı ile süspansiyondan ayrılabilir (CUDJOE, 1999). Manyetik ayırıcılar laboratuvar ölçekli basit kesikli, daha pahalı ve karmaşık, bir sıvı ve hücre süspansiyonunun içinden aktığı ayırma kolonu içeren tipte veya manyetik olarak stabilize edilmiş akışkan yatak ayırıcıları şeklinde olabilmektedirler (SAFARIK ve SAFARIKOVA, 1999). IMS yönteminin çalışma mekanizması Şekil 1'de verilmektedir.

## IMS YÖNTEMİNİN GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDEKİ UYGULAMALARI

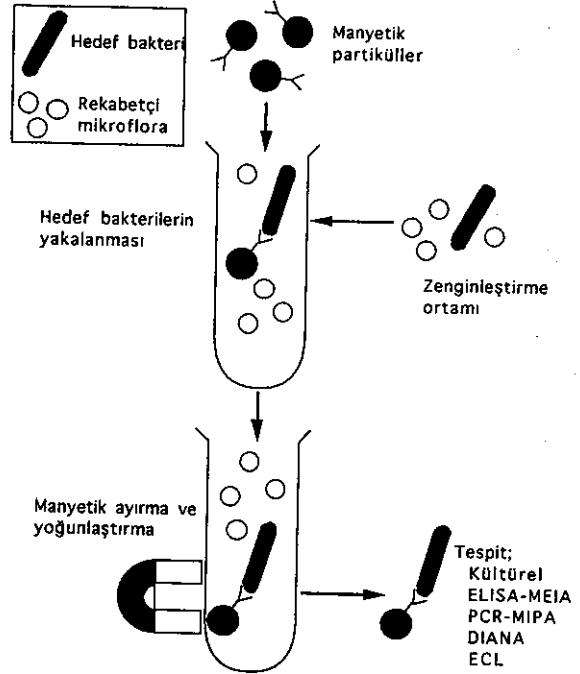
IMS yönteminin gıda, klinik veteriner ve çevre mikrobiyolojisi dallarında bir çok uygulama alanı bulunduğu bildirilmektedir. IMS'nin gıda mikrobiyolojisindeki uygulamaları arasında, çeşitli gıda kaynaklı patojen bakterilerin, diğer bazı mikroorganizmaların ve bazı bakteri toksinlerinin (*Staphylococcus* ve *C. perfringes*

enterotoksinleri) belirlenmesi bulunmaktadır. Bu bakteriler arasında *Salmonella* türleri, *E.coli* O157, *Listeria* türleri, *Yersinia pestis*, *Y. enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Mycobacterium* türleri, *Bacillus cereus*, *Legionella*, *Clostridium perfringens* bulunmaktadır. İmmuno manyetik sistem ile izolasyon için üzerlerinde çalışılan diğer mikroorganizmalar arasında ise; *Cryptosporidium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Alcaligenes eutrophus*, *Chlamydia trachomatis*, *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* ve *Helicobacter pylori* bulunmaktadır (MOLLA ve ark. 1994; CUDJOE ve ark. 1994a; CUDJOE ve ark. 1994b; CUDJOE ve ark. 1995; SAFARIK ve ark. 1995, PATEL, 1995; NILSSON ve ark. 1996; OGDEN ve ark. 2000; HARA-KUDO ve ark. 2000, RADCLIFFE ve HOLBROOK, 2000). Bir çok bakteriyel antijenin, örneğin hücre duvarındaki antijenik belirteç olan O-antijeninin, kamçı veya kirpik antijenlerinin bakterilerin immuno manyetik yöntem ile yakalanabilmeleri amacı ile kullanıldıkları bildirilmektedir. Yakalanan hücreler

kültürel ve mikroskopik yöntemler ile incelendikleri gibi, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, MEIA; magnetic enzyme immunoassay), PCR (polymerase chain reaction, MIPA; magnetic immuno PCR assay), DNA tkenolojisi ile enzim immunoassay yönteminin kombinasyonu olarak da tanımlanan DIANA (detection of immobilized amplified nucleic acids) veya ECL (elektrokemilüminesans) gibi ileri yöntemlerle kombine edilerek de incelenebilmektedirler. Gıda mikrobiyolojisinde immuno manyetik ayırma esaslı bazı uygulamalar Çizelge 1'de verilmektedir.

Çizelge 1. Gıda Mikrobiyolojisinde Bazı IMS Uygulamaları

Hedef mikroorganizma	Belirleme metodu
<i>Clostridium perfringens</i> enterotoksin A	IMS-ELISA
<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoksin B	Manyetik enzim immunoassay (MEIA)
<i>Salmonella</i>	Kültürel-IMS IMS-ELISA IMS-PCR ve DNA hibridizasyon
<i>Escherichia coli</i> O157	Kültürel-IMS
<i>Escherichia coli</i> O26	Kültürel-IMS
<i>Listeria</i>	Kültürel-IMS IMS-PCR
<i>Cryptosporidium</i>	IMS
<i>Aeromonas salmonicida</i>	IMS
<i>Pseudomonas putida</i>	IMS
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	IMS
<i>Thermodesulfobacterium mobile</i>	IMS
HAV (hepatitis A virus)	IMS-PCR
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IMS-PCR
<i>Coxiella burnetii</i>	IMS-PCR



Şekil 1. IMS yönteminin çalışma mekanizması

Gıda mikrobiyolojisindeki ilk çalışmalar, 1984 yılında J.H. Mattingly tarafından *Salmonella*'ların gıdalardan ve fekal örneklerden immuno manyetik ayırımı amacı ile başlatılmıştır. Daha çok klinik alanda sürdürülen çalışmaların ardından, gıda mikrobiyolojisindeki ilk uygulama E. Skjerve ve O. Olsvik isimli iki Norveç'li araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir (SKJERVE ve OLSVIK, 1991). Bu bilim adamları Brie, süt tozu, yoğurt, et ve sebzelerde bulunan *Salmonella* hücrelerini IMS ile  $1.0 \times 10^2$  hücre  $g^{-1}$  duyarlılığında ayırabildiklerini rapor etmişlerdir. *Salmonella*'ların gıdalardan izolasyonunda klasik kültürel yöntemler ile IMS'nin karşılaştırılması ilk kez büyük ölçekli olarak 1993

yılında gerçekleştirilmiştir. Toplam 120 gıda örneğinde gerçekleştirilen bu çalışmada, anti-Salmonella manyetik partiküllerinin klasik kültürel yöntemlerde önerilen Selenit broth besiyerinde zenginleştirme basamağındaki kadar etkili olduğu bildirilmiştir. Bunun yanısıra toplam analiz süresinde yaklaşık bir günlük kısılma sağlanabildiği de belirtilmektedir. Ayrıca baharatlarda bulunan stres formdaki ve klasik yöntemler ile belirlenemeyen *Salmonella* hücrelerinin de IMS yöntemi ile belirlenebildiği belirtilmiştir (PATEL, 1995). İngiltere'de 1993 yılında iki araştırmacı tarafından ilk *E. coli* O157: H7 enfeksiyonuna neden olan şüpheli etmen gıda maddesi, IMS yöntemi ile test edilerek doğrulanmıştır. Klasik kültürel yöntem ile patojenin belirlenebilme sınırı 200 hücre g<sup>-1</sup> olarak belirtilirken, IMS yöntemi ile bu sınırın 2 hücre g<sup>-1</sup> olduğu da bildirilmiştir. Aynı çalışmada 4 ay boyunca alınan örneklerde IMS yönteminde 61, klasik yöntemde ise 23 izolatin saptandığı ve doğrulandığı rapor edilmiştir (SAFARIK ve ark. 1995).

*L. monocytogenes*'in IMS yöntemi ile belirlenmesine yönelik ilk çalışmalar ise 1990'lar da başlatılmıştır. IMS'nin yaklaşık 30 dakikada tamamlandığı ve analiz süresinde klasik kültürel yöntemle göre 24 saatlik bir zaman kazancı sağladığı bildirilmiştir. *Y. enterocolitica* için yapılan bir çalışmada yöntem duyarlılığı, yaklaşık 10<sup>-1</sup> CFU g<sup>-1</sup> düzeyinde bir flora içeren et örneğinde, ön zenginleştirme yapılmadığında, 10-30 CFU g<sup>-1</sup>, 1 gece ön zenginleştirme uygulandığında ise, 2 CFU g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. (KOHN, 1999).

### YÖNTEMİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

Diğer ayırma ve konsantrasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında IMS'nin bazı üstün yönleri ve kısıtlamaları olduğu belirtilmektedir (CUDJOE, 1999; SHARPE, 2000). Bunlar şu şekilde özetlenebilir;

a) Hedef bakteri yoğun rekabetçi flora içerisinde seçilip, büyük oranda saf olarak izole edilebilmekte, böylece gerekirse ileri incelemelere geçilebilmektedir.

b) Örnekteki olası üremeyi önleyici maddeler uzaklaştırılmaktadır. Bu, mikroorganizmaların üretilmesini kolaylaştırmaktadır. IMS doğrudan bir belirleme yöntemi olmamakla birlikte, seçici zenginleştirme basamağını içeren yöntemlerin hemen tümünde, önemli ölçüde zaman kazancı sağlamaktadır.

c) Değişik belirleme yöntemleri ile birlikte kullanılabilirdiği için, bu yöntemlerin uygulamalarını kolaylaştırabilmektedir.

d) IMS hedef mikroorganizmanın yüzey antijenine özgü antibadi kullanımını gerektirmektedir.

e) Örnekte fazla miktarda ölü veya lize olmuş hücre bulunması durumunda ortamda serbest yüzey antijenleri bulunabileceğinden, canlı mikroorganizmaların yakalanması güçleşebilecektir.

f) IMS, klasik kültürel yöntemlerde kullanılan zenginleştirme basmağı yerine güvenilir bir seçenek olarak sunulmaktadır. Ancak uygulamadaki işlemlerin çapraz kontaminasyon riskini artırabileceği üzerinde durulmaktadır. Kullanılan antibadilerin tamamen özgül olmamasının, yakalamada kullanılan partiküllere bazı çapraz reaksiyon veren mikroorganizmaların da bağlanabileceği üzerinde durulmaktadır. Bununla birlikte, özgül olmayan bağlanmaların, yöntemdeki yıkama basamağının Tween-20 gibi maddeler ile uygulanması ile ortadan kaldırılabildiği de bildirilmektedir (RADCLIFFE ve HOLBROOK, 2000).

g) Özgül partiküllerin hedef hücreleri tutmada bir doygunluk kapasitesine sahip oldukları ve manyetik partiküllerin belirli bir yakalama doygunluğu üzerinde verimlerinin düştüğü belirtilmektedir (BENNET ve ark., 1996).

i) Klasik yöntemlerle karşılaştırıldığında maliyetin yüksek olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, IMS'nin hızlı sonuç vermesinin, özellikle raf ömrü kısa olan ürünlerde, klasik yöntemde analiz sonucunu beklerken geçen sürenin getirdiği ekonomik kaybı azalttığı ileri sürülmektedir.

### SONUÇ

Bu güne kadar yapılan çalışmaların, hücrelerin manyetik olarak ayrılması işleminin başarısını açıkça ortaya koyduğu görülmektedir. Yöntemin yüksek özgüllük göstermesi, ölçek büyütme uygun olması, uygulama için ticari ürünlerinin piyasada bulunabilmesi ve nispeten pahalı olmayan ekipmanlarla gerçekleştirilebilmesi diğer üstünlükleri arasında sayılmaktadır. IMS yöntemi klasik doğrulama yöntemleri ile

birlikte kullanılabilirliği gibi ELISA ve PCR gibi bazı diğer ileri metotlar ile birlikte de kullanılabilir. Bunun yanısıra manyetik partiküllere bağlanan mikroorganizmaların acridine orange ile boyanarak floresans mikroskopta da incelenebildikleri bildirilmektedir. Manyetik ayırma tekniğinin otomasyona ve minyatürize etmeye uygun olduğu da belirtilmektedir.

Manyetik partiküllerin ve IMS yönteminin gıdalarda çeşitli patojenlerin belirlenmesi için kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. *Listeria* için immuno partiküllerin kullanıldığı Lister Screen® yönteminin Fransa'da AFNOR (French Association of Normalization) tarafından 1995'te onaylandığı bildirilmektedir (AVOYNE ve ark. 1997). *E. coli* O157 için ise IMS yöntemi FDA'nın BAM (Bacteriological Analytical Manual) ın 8. baskısında yer aldığı belirtilmektedir. Benzer şekilde yöntemin, Japonya'da Japon Sağlık Bakanlığı tarafından *E. coli* O157 için resmi olarak kabul edilen yöntemler arasında bulunduğu da bildirilmektedir (ANONYMOUS, 2000).

Gıda endüstrisinde patojen belirleme programlarının risk ve dezavantajları önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Bunun ürün kalitesini ve pazarlamasını da doğrudan etkilediği de belirtilmektedir. Bu kapsamda IMS yöntemi, gıda endüstrisinde HACCP içerisinde yer alabilecek bir uygulama olarak da düşünülmektedir. IMS yönteminin geliştirilmesi, çeşitli modifikasyonları ve hızlı doğrulama yöntemleri ile kombinasyonu ile ilgili çalışmalar günümüzde artan bir yoğunlukta halen sürdürülmektedir.

## KAYNAKLAR

- ANONYMOUS. 1995. Dynal, Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Handbook, Oslo p.47.
- ANONYMOUS. 1997. Dynal, Biomagnetic Applications in Cellular Immunology. Technical Handbook, Oslo, p. 28.
- ANONYMOUS. 1998. Dynal Product Catalogue, Dynabeads Magnetic Separation. Cells and Proteins, Nucleic Acids, Microorganisms, p.5.
- ANONYMOUS. 2000. Dynal, Bioscience Product Catalogue, Oslo, p. 59.
- AVOYNE, C., BUTIN, M., DELAVAL, J., BIND J.L. 1997. Detection of *Listeria* spp in Food Samples by Immunomagnetic Capture: ListerScreen Method. *J Food Protection*, 60: 377-384.
- BENNET, A.R., MACPHEE, S., BETTS, R.P. 1996. The Isolation and Detection of *Escherichia coli* O157 by Use of Immunomagnetic Separation and Immunoassay Procedures, *Letters in Appl. Microbiol.* 22: 237-243.
- CUDJOE, K.S., KRONA, R., GRON, B. and OLSEN, E. 1994a. Use of Ferrous Sulphate and Immunomagnetic Separation to Recover *Salmonella enteridis* From Raw Eggs, *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 149-158.
- CUDJOE, K.S., KRONA, R., OLSEN, E. 1994b. IMS: A New Selective Enrichment Technique For Detection Of *Salmonella* In Foods, *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 159-165.
- CUDJOE, K. S., HAGTVEDT, T., DAINTY, R. 1995. Immunomagnetic Separation of *Salmonella* From Foods and Their Detection Using Immunomagnetic Particle (IMP)-ELISA, *Int. J. Food Microbiol.*, 27: 11-25.
- CUDJOE, K.S. 1999. Immunomagnetic Particle-based Techniques: Overview. "In Encyclopedia of Food Microbiology, Eds. R.K. ROBINSON, C.A. BATT, and P.D. PATEL", Academic Press, 3 rd Volume, Great Britain, p. 1087-1095.
- FRATAMICO, P. M. and CRAWFORD, C.G. 1999. Detection by Commercial Immunomagnetic Particle-Based Assay "in Encyclopedia of Food Microbiology, Eds. R. K. ROBINSON, C.A. BATT, and P.D. PATEL", Academic Press, 3 rd Volume, Great Britain, p: 646-651.
- FUNG, D.Y.C. 1997. Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis, "in Food Microbiological Analysis, Eds. M. L. TORTORELLO, S.M. GENDEL", 1st Basic Symposium Series, marcel Dekker Inc., NY (1997), p: 17-65.
- HARA-KUDO, Y., KONUMA, H., NAKAGAWA, H., KUMAGAI, S. 2000 *Escherichia coli* O26 Detection From Foods Using An Enrichment Procedure and an Immunomagnetic Separation Method, *Letters in Applied Mic.*, 30 (2): 151-154.
- KOHN, B. 1999. *Listeria* /Detection by Commercial Immunomagnetic Particle-Based Assays, "in Encyclopedia of Food Microbiology, Eds. R.K. ROBINSON, C.A. BATT, and P.D. PATEL", Academic Press, 3 rd Volume, Great Britain, p: 1222-1228.
- MOLLA, B., KNLEER, J. and SINELL, h. j. 1994. Detection of *Salmonella* In Foods By Immunomagnetic Separation, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 45 (5) : 97-120.
- NILSSON, H.O., ALELJUNG, P., NILSSON, I., TYSKIEWICZ, T., WASTRÖM, T. 1996. Immunomagnetic Bead Enrichment and PCR for Detection of *Helicobacter pylori* In Human Stools, *J. Microbiol. Methods*, 27: 73-79.
- OGDEN, I.D., MACRAE, M., HEPBURN, N.F., STRACHAN, N.J. 2000. Improved Isolation of *Escherichia coli* O157 Using Large Enrichment Volumes For Immunomagnetic Separation, *Letters In Applied Mic.*, 31 (4): 338-341.
- PATEL, P. D. 1995. Microbiological Applications of Immunomagnetic Techniques. "In Rapid Analysis Techniques In Food Microbiology, Eds. P.D. PATEL", Chapman and Hall, Blackie Academic and Professional, Great Britain, p. 104-137.

- RADCLIFFE, D.M. and HOLBROOK, R. 2000. Detection of Microorganisms in Food: Principles and Application of Immunological Techniques." In The Microbiological Safety and Quality of Food: Principles And Application of Immunological Techniques. "in The Microbiological Safety and Quality of Food, Eds. B. M. LUND, T.C. BAIRD-PARKER, G.W. GOULD" Aspen Pub. Inc., Gaithersburg, Maryland, p. 1804-1805.
- RIPABELLI, G., SAMARCO, M.L. and GRASSO G. M. 1999. Evaluation of Immunomagnetic Separation and Plating Media for Recovery of Salmonella From Meat, J. Food Protection, 62 (2): 198-201.
- SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. and FORSYTHE, S. J. 1995. The Application of Magnetic Separations In Applied Microbiology, J. Appl. Bacteriol., 78: 575-578.
- SAFARIK, I. and SAFARIKOVA, M. 1999. Use of Magnetic Techniques For The Isolation of Cells, J. Chromatography B, 722: 33-53.
- SHARPE, A.N. 2000. Detection of Microorganisms in Foods: Principles of Physical Methods for Separation and Associated Chemical and Enzymological Methods of Detection. "in The Microbiological Safety and Quality of Food. Eds T.C. BAIRD-PARKER, G.W. GOULD" Aspen Pub. Inc., Gaithersburg, Maryland, Pp: 1738-1739.
- SKJERVE, E. and OLSVIK, O. 1991. Immunomagnetic Separation of Salmonella From Foods, Int. J. Food Microbiol., 14: 11-17.

# TÜREKS

## MÜHENDİSLİK VE DANIŞMANLIK

Kurumumuz 25 Yıllık Tecrübesi ile aşağıdaki konularda hizmet vermektedir. Firmamız, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda, Makine, Ekonomi ve Süt Teknolojisi Bölümünden Mezun Yönetim Kadrosundan ve tüm mühendislik dalında hizmet verebilecek teknik kadrodan oluşmaktadır.

**Müşteri istekleri ya da etkili bir yönetim için uygulayabileceğiniz sistemler için, EĞİTİM, DANIŞMANLIK ve BELGELENDİRME hizmeti vermekteyiz.**

- ▼ ISO-9000 Kalite Yönetim Sistemi
- ▼ HACCP (Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi) Gıda Emniyeti Sistemi
- ▼ ISO-14000 Çevre Yönetim Sistemi
- ▼ AQAP 110-120 Nato Kalite Güvence Sistemi (Milli Savunma Bakanlığından)
- ▼ CE Markası Avrupa Normlarına Uygunluk Belgesi
- ▼ TSE Belgesi, İş Yeri Yeterlilik Ya da Ürün Yeterlilik Belgesi, (Türk Standartları Enstitüsü)
- ▼ Yatırım Teşvik Belgesi Alınması
- ▼ Fizibilite Hazırlama ve Teknoloji Seçimi

**İşletmelerin yaşamaları için zorunlu hale getirilen resmi belgeler ve izinlerin dosyalarının hazırlanması ve takibinin yapılması hizmeti vermekteyiz.**

- ▼ Gıda Üretim İzni ve Gıda Sicili Hizmetleri (Tarım Bakanlığından Gıda, Ambalaj İşletmeleri İçin Zorunlu İzinlerdir.)
- ▼ Gayri Sıhhi Müesseseler İçin Çalışma İzni (Sağlık Bakanlığından Gıda, Ambalaj İşletmeleri İçin Zorunlu İzinlerdir.)
- ▼ ÇED (Çevresel Etki Değerlendirmesi) Raporu (Çevre Bakanlığınca Haziran 1997'den sonra Kurulan Gıda İşletmeleri İçin Zorunlu İzinlerdir)
- ▼ Marka Tescili ve Patent (Türk Patent Enstitüsünün Tüm Firmalar İçin Oluşturduğu Belge)
- ▼ Kapasite Raporu (Ticaret ve Sanayi Odasınca Üretici Firmalar İçin Oluşturduğu Belge)

**ADRES: Gimat 3. Blok No: 29 Macunköy / ANKARA**

**Tel: (0312) 397 07 87 - (0312) 397 60 09 Fax: (0312) 397 00 58 E-mail: tureks@tr.net**