

## İMMUNOMANYETİK AYIRMA YÖNTEMİ İLE GIDALARDAN *Salmonella* spp. İZOLASYONU\*

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

Birce MERCANOĞLU, S. Aykut AYTAÇ<sup>1</sup>

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

**ÖZET:** Bu çalışmada ilk olarak, anti-*Salmonella* küreciklerinin özgünlüğü incelenmiş ve ardından *Salmonella* kontaminasyonu açısından riskli olarak değerlendirilen 50 adet gıda örneğinden *Salmonella* spp. izolasyonu amacı ile, immunomanyetik ayırma (IMA) yöntemi ve geleneksel kültürel bir metot olan ISO 6579 referans metodu karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca *Salmonella enteritidis*, anti-*Salmonella* kürecikleri ve *S. enteritidis*+anti-*Salmonella* kompleksleri, atomik kuvvet mikroskobu (AKM) kullanılarak görüntülenmiştir. Sonuç olarak; IMA yöntemi, doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinin 14'ünün *Salmonella* ile kontamine olduğunu belirleyebilmişken, ISO 6579 referans metodu 12 adedini belirleyebilmiştir. Bu verilere istatistiksel analiz uygulandıktan sonra, IMA yöntemi ile ISO 6579 referans metodu arasında önemli fark olmadığı belirlenmiştir. Ancak IMA yönteminin, ISO 6579 referans metoduna oranla hızlı ve yüksek duyarlılıkta olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** IMA, *Salmonella*, gıda

**ABSTRACT:** In this study, firstly the specificity of Dynabeads® anti-*Salmonella* has been examined and then (immunomagnetic separation) IMS method has been investigated in order to isolate *Salmonella* spp. from 50 food samples assumed that having the contamination of *Salmonella* risk in parallel with the traditional cultural method that is ISO 6579 reference method. Also *Salmonella enteritidis*, anti-*Salmonella* beads and the *S. enteritidis*+Dynabeads® anti-*Salmonella* complexes have been visualised by atomic force microscope (AFM). As a result, IMS method enabled the detection of 14 *Salmonella* positive samples from the 50 naturally contaminated food samples examined whereas ISO 6579 reference method enabled 12 *Salmonella* positive samples. After applying statistical analysis to these datas, this IMS method showed no difference in performance with the ISO 6579 reference method. But IMS method was found as a rapid and a highly sensitive method than the ISO 6579 reference method.

**Keywords:** IMS, *Salmonella*, food

### GİRİŞ

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) tarafından rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklar konusundaki veriler, 1999 yılındaki 10209 adet enfeksiyon vakasına bakteriyal ajanların neden olduğunu ve bu vakaların 1031'indeki etyolojik ajanın ise, *Salmonella* olduğunu göstermektedir (Bohra 2000).

*Salmonella* ile doğal olarak kontamine olmuş gıdalarda bu bakterinin sayısının çok düşük ancak gıdalarda bulunan rekabetçi bakterilerin sayısının ise yüksek miktarlarda olması, *Salmonellaların* gıdalardan izole edilebilme şanslarını büyük ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle son yıllarda, gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılabilecek, immunomanyetik ayırma (IMA) yöntemi gibi hızlı ve güvenilir teknikler geliştirilmiştir. (Mansfield ve Forsythe 2000).

\* Bu çalışmanın bazı kısımları Archiv für Lebensmittel Hygiene 2002 53(2): 43-45 ve Annals of Microbiology 2003 53 (3): 337-342 dergilerinde yayınlanmıştır.

<sup>1</sup> E-posta: aytac@hacettepe.edu.tr

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

IMA, karışık ve yoğun mikroflora içeren bir gıda örneğinden hedeflenen mikroorganizmayı yakalayabilen ve daha ileriki testlerde kullanılmak üzere küçük hacimlere yoğunlaştırabilen (Cudjoe, Hagtvædt ve Dainty 1995; Fratamico ve Crawford 1999; Safarik ve Safarikova 1999), çapları 2,8 µm, 4,5 µm veya 5,0 µm olan (De Boer ve Beumer 1999; Anonymous 2000a) homojen, polistiren, süperparamanyetik mikroküreciklerin kullanımını içermektedir.

Taramalı sonda mikroskoplarından biri olan ve 1986 yılında geliştirilen atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ise, bakterilerin ileri düzeyde incelenmesi amacıyla kullanılan yeni mikroskopik yöntemlerden biridir (Binnig, Quate ve Gerber 1986).

AKM, 100-200 nm uzunluğundaki tutucu bir kofa yerleştirilmiş 1-2 mm uzunluğa sahip bir sondanın incelenen örnek yüzeyine yakın bir mesafede hareket ettirilmesi ve bunun sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi ilkesine göre çalışmakta (Bowen, Hital, Lovitt ve Wright 1999; Anonymous 1994) ve böylelikle örneğin üç boyutlu görüntüsü elde edilebilmektedir (Tan 2001).

Bu çalışmada; IMA yönteminin, gıdalardan *Salmonella* izolasyonunda, ISO 6579 referans metoduna oranla daha hızlı ve etkili olup olmadığının incelenmesinin yanısıra *S. enteritidis*'in AKM ile görüntülenerek boyut analizinin yapılması ve bu iki yöntemin birlikte kullanılması ile, *Salmonella*ların çok daha kısa sürede ve düşük hata olasılığı ile tanımlanması amaçlanmaktadır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

#### Gıda örnekleri

Çalışmada kullanılan 50 adet gıda örneği, Ankara'daki marketlerden tesadüfi olarak toplanmıştır (Çizelge 3).

#### Kültürler

*S. enteritidis* ATCC 13076 ve *Escherichia coli* ATCC 35281 kültürleri, "ATCC, ABD" den; *Salmonella dublin* kültürü, "Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü, Ankara" dan liofilize formda sağlanmıştır. *Escherichia coli* O157:H7 937 kültürü, "Prof. M.P. Doyle, Georgia Üniversitesi, ABD" den; *Salmonella typhimurium* kültürü, "Prof. K. Halkman, Ankara Üniversitesi, Ankara" dan, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ve *Staphylococcus aureus* kültürleri, "Prof. A.G. Hasçelik, Hacettepe Üniversitesi, Ankara" dan ve *Yersinia enterocolitica* O:9 BL 87/46 kültürü ise, "Norwich AFRC Food Research Institute, İngiltere" den sağlanmıştır.

#### IMA yöntemi deney düzeneği ve immunomanyetik partiküller

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

### AKM deney düzeneği

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

### Yöntem

#### Partikül özgünlüğü

Çalışmanın bu bölümünde, ilk olarak, Enterobacteriaceae ailesine ve farklı ailelere ait bazı bakterilerin 24 saatlik saf kültürlerinden, serum fizyolojik (SF) çözeltisi ile, ardışık dilüsyonlar hazırlanmış ve triptik soy agar (TSA) besiyerlerine inokülasyonlar yapılmıştır. Daha sonra, aynı dilüsyonlara IMA yöntemi uygulanarak hem brilliant green fenol red laktoz sukroz (BPLS) agar hem de TSA besiyerlerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda; 24 saatlik saf *S. enteritidis* kültürünün de ardışık dilüsyonları hazırlanmış ve bu dilüsyonlardan ilk olarak BPLS agar besiyerlerine, sonra da aynı dilüsyonlara IMA yöntemi uygulanmasının ardından BPLS agar besiyerlerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bütün kültürler, 35-37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda koloniler sayılarak da, anti-Salmonella partiküllerinin bakteri hücrelerini ne oranda tutabildikleri belirlenmiştir.

#### Doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerinin IMA yöntemi ve ISO 6579 referans

##### Yöntemi için hazırlanması

Çizelge 3'de belirtilen 41 adet gıda örneğinin herbirinden 25 g alınarak, 225 mL tamponlanmış peptonlu su (TPS) içeren filtreli steril Stomacher torbalarına aktarılmış ve Stomacher aygıtında (Stomacher Seeward 400, İngiltere) 1 dakika tutularak, homojen hale getirilmiştir. Ancak 9 adet yumurta örneğinin herbiri, öncelikle çeşme suyu altında yıkanıp kurulanmış, 10 saniye süre ile %70'lik etil alkolde bekletildikten sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan yumurtalar steril erlenler içine kırılıp, homojen hale getirilmiştir. Daha sonra, bunlardan ISO 6579 referans metodunda kullanılmak üzere 11 g alınarak, 99 mL SF çözeltisi içeren erlene aktarılmıştır. Diğer taraftan; IMA yönteminde kullanılmak üzere geriye kalan 50 g yumurta homojenatı üzerine, 35 mg FeSO<sub>4</sub>/L ilave edilerek karıştırılmıştır (Anonymous, 1999). Hazırlanan homojenatların tümü, 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

##### ISO 6579 referans metodu yönetimi

Homojenatlardan 10 ve 0,1 mL alınarak, sırasıyla selenit sistin (SC) broth ve Rappaport-Vassiliadis (RV) broth besiyerlerine aktarılmış ve yine sırasıyla 37°C ve 42°C'lerde 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Ardından, BLPS agar ve Rambach agar besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

##### IMA yöntemi (çekirdek yöntemi)

IMA yöntemine göre, ön zenginleştirme kültürlerinden 1'er mL alınarak, manyetik tutucudaki steril Ependorf tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 20'şer µL Dynabeads® anti-Salmonella partikül süspansiyonu eklenerek 10 dakika süre ile örnek karıştırıcısında karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda manyetik çubuk, manyetik tutucuya yerleştirilerek 3 dakika da elde karıştırılmış ve böylelikle, Salmonella+anti-Salmonella komplekslerinin, tüplerin iç yüzeylerinde gözle görülebilir bir şekilde toplanmaları sağlanmış ve ardından tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Manyetik çubuk, manyetik tutucudan çıkarıldıktan sonra, 1 mL IMA yıkama çözeltisi eklenerek karıştırma yapılmış ve bu yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır. Son yıkamanın ardından yine manyetik çubuk yardımı ile oluşturulan Salmonella+anti-Salmonella komplekslerinin üzerine, 0,1 mL IMA yıkama çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve bu süspansiyon 10 mL RV broth besiyerine aktararak, 42°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu RV kültürleri, daha sonra, BLPS agar ve Rambach agar besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Ancak, yumurta homojenatları, IMA yöntemi öncesinde TPS ile beş kez seyreltilmişler ve IMA sırasında anti-Salmonella partiküllerinden bu kez 40 µL kullanılmıştır (Anonymous 1999).

Gerek ISO 6579 gerekse IMA yöntemi sonunda, izole edilen şüpheli *Salmonella* kolonileri, TSA besiyerlerinde 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek ileri biyokimyasal testler için, 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

#### Tanımlama ve doğrulama analizleri

TS broth besiyerlerinde canlandırılan izolatlar, Harlequin Salmonella ABC (Freeman Formülü) agar ve ksiloz lizin deoksişolat (XLD) agar besiyerlerine inoküle edilerek, koloni morfolojileri karşılaştırılmıştır. Ardından, Gram boyama, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, üre, mannitol, salisin testleri yapılmış ve asit, gaz ve H<sub>2</sub>S oluşumunun incelenmesi amacı ile de triple sugar iron (TSI) agar besiyerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 1998). Bu testlerin yanısıra, *Salmonella* lateks aglütinasyon testi (Anonymous, 2000b) ve ayrıca API 10S sistemi (Anonymous 2000c) de kullanılmıştır.

#### İstatistiksel analiz

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

#### AKM ile görüntü eldesi

İlk olarak, 24 saatlik saf *S. enteritidis* kültüründen SF çözeltilisi ile ardışık dilüsyonlar yapılmış ve yaklaşık 10<sup>2</sup> kob/mL olacak şekilde 1 mL örnek, manyetik tutucudaki steril Eppendorf tüpüne aktararak IMA işlemi gerçekleştirilmiştir. IMA işlemindeki son yıkamanın ardından, 0,1 µL IMA yıkama çözeltilisi eklenerek karıştırılmıştır. Ardından; *S. enteritidis*, anti-Salmonella partikülleri ve IMA işlemi sonrası elde edilen *S. enteritidis*+anti-Salmonella kompleksleri ultrasonik temizleme cihazında temizlenmiş lamalar üzerine alınarak, ince birer film halinde yayılmışlardır. Havada kurumaları sağlandıktan sonra, AKM ile açık havada incelemeye geçilmiştir. Bu sırada sonda ucunun preparatlara uyguladığı kuvvet 1-3 nN ve görüntü çözünürlüğü ise 400x400 piksel olup, elde edilen veriler bilgisayarın yazılımı sayesinde görüntüye çevrilmiştir.

### SONUÇ ve TARTIŞMA

Partikül özgünlüğü ile ilgili ilk aşama deneme sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1'den de görülebileceği gibi anti-Salmonella partiküllerinin *E. coli* O157:H7, *P. vulgaris*, *S. flexneri*, *Y. enterocolitica* O:9, *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterilerini tutamadıkları ancak, *E. aerogenes*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerini tutabildikleri saptanmış ve TSA besiyerinde sırasıyla %6,4, %2,3 ve %2,6, BPLS agar besiyerinde ise sırasıyla %4,5, %1,9 ve %1,8 gibi düşük geri kazanım yüzdelere sahip oldukları görül-

Çizelge 1. Enterobacteriaceae ailesine ve farklı ailelere ait bazı bakteriler ile yapılan anti Salmonella partikül özgünlüğü deneme sonuçları

Bakteri	Bakterinin geri kazanımı (%)*	
	TSA	BPLS agar
<i>E. aerogenes</i>	6,4	4,5
<i>E. coli</i>	2,3	1,9
<i>E. coli</i> O157: H7	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	2,6	1,8
<i>P. vulgaris</i>	0	0
<i>S. flexneri</i>	0	0
<i>Y. enterocolitica</i> O: 9	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0
<i>E. faecalis</i>	0	0

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

müştür. Bu bakterilerin anti- Salmonella partikülleri tarafından böyle düşük bir yüzde ile de olsa tutulabilmele-ri, onların partikül yüzeylerine yapışmalarından kaynaklanan özgün olmayan bağlanmaları ile açıklanmaktadır. Bu bağlanmaların, Salmonellaların tutulmasını engellemediği ancak IMA yöntemi sonrası inokülasyon yapılan seçici katı besiyerlerinde Salmonellalar ile birlikte bu bakterilerin de gelişmesine olanak verdiği ama yine de *Salmonella* kolonilerinin diğer kolonilerinden makroskopik olarak rahatlıkla ayrılabilirdiği belirtilmektedir (Molla vd 1994). Dolayısıyla, doğal olarak kontamine olmuş gıda örnekleri ile çalışılırken, IMA yöntemi sonrası RV broth besiyerinin kullanılmasının ardından seçici katı besiyerlerine inokülasyonlara geçilmesi, özgün olmayarak bağ-lanan bakterilerin bu besiyerlerindeki gelişimini önemli ölçüde sınırlandırdığı görülmüştür.

İkinci aşamada ise, IMA yönteminde kullanılan anti-Salmonella partiküllerinin özgünlüğü, *S. enteritidis* ile ortamda herhangi bir gıda örneği etkileşimi olmaksızın yapılan model sistem denemesi ile incelenmiştir. Partikül özgünlüğü ile ilgili ikinci aşama deneme sonucu Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. *S. enteritidis* ile yapılan anti-Salmonella partikül özgünlüğü deneme sonucu

Bakteri	Bakterinin geri kazanımı (%)*
	BPLS agar
<i>S. enteritidis</i>	65

\* *S. enteritidis*'in anti-Salmonella partikülleri ile BPLS agar besiyerindeki geri kazanım yüzdesini belirlemek için, IMA yöntemi uygulanarak inokülasyonlar yapılan BPLS agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayısı, direkt kültürel inokülasyonlar yapılan BPLS agar besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayısına oranlanmıştır.

Çizelge 2'den de görülebileceği gibi *S. enteritidis*'in BPLS agar besiyerindeki geri kazanım yüzdesi %65 olarak bulunmuştur. Bunun beklenilenden daha düşük olması; *S. enteritidis*'in anti-Salmonella partikülleri tarafından düşük bir yüzde ile tutulabilmesi olarak değil, IMA yöntemi sırasındaki ilk yıkama basamağı sonrası olası kaybı olarak açıklanmaktadır (Molla vd 1994). Bir başka deyişle, ortamda anti-Salmonella küreciklerinden fazla sayıda *Salmonella* bulunduğu takdirde, IMA yöntemi sırasındaki ilk yıkama basamağı sonrası kayıplar söz konusu olmaktadır.

### Doğal olarak kontamine olmuş gıda örneklerine ilişkin sonuçlar

Çizelge 3'den de görülebileceği gibi, 50 adet gıda örneği içerisinde kümes hayvanı etleri dışındaki gıda gruplarına ait örneklerde, *Salmonella* varlığına rastlanılmadığı görülmektedir. Ancak bu gıda grubuna bakıldığında; 24 adet gıda örneğinden 14 adedinin *Salmonella* ile kontamine olduğu IMA yöntemi kullanılarak saptanabilmişken, ISO 6579 referans metodu kullanıldığında, 14 adet gıda örneğinin ikisinde *Salmonella* izolasyonunun gerçekleştirilemediği görülmektedir.

IMA yönteminin ISO 6579 referans metoduna göre daha duyarlı olduğu gözlenmiş olursa da, istatistiksel analiz sonucunda, ISO 6579 referans metodu ve IMA yöntemi arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ( $P > 0,05$ ).

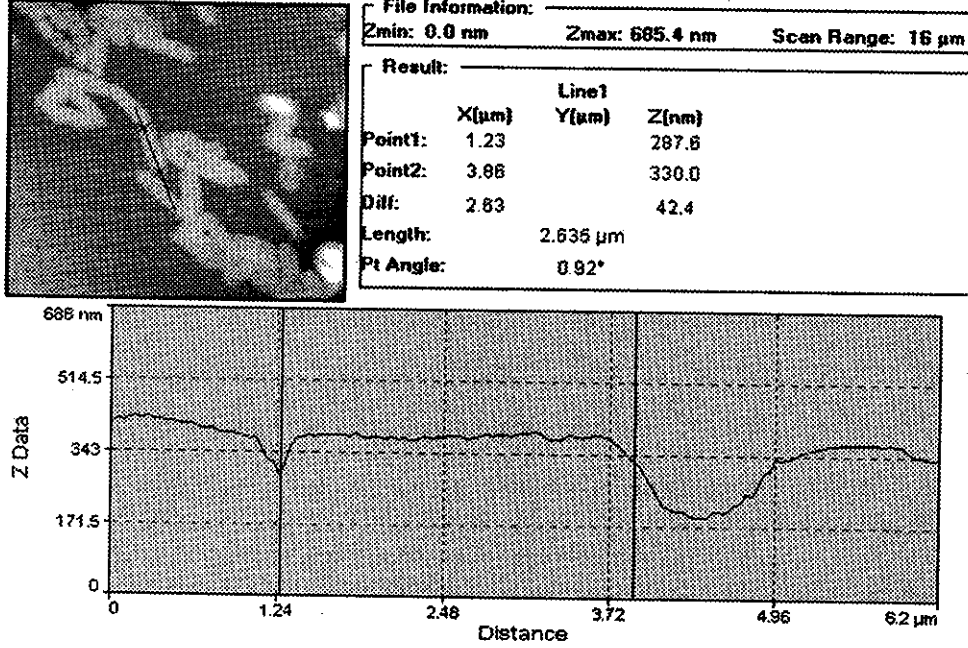
Çizelge 3. Doğal olarak kontamine olmuş 50 adet gıda örneğinde ISO 6579 referans metodu ve IMA yönteminin karşılaştırılması

Gıda Grupları	Gıda Örneği Sayısı	ISO 6579 REFERANS METODU		IMA YÖNTEMİ	
		POZİTİF	NEGATİF	POZİTİF	NEGATİF
Kümes hayvanı etleri	24	12	12	14	10
Kırmızı etler	4	0	4	0	4
Et ürünleri	4	0	4	0	4
Geleneksel gıdalar	5	0	5	0	5
Salatalar	4	0	4	0	4
Yumurtalar	9	0	9	0	9
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>12</b>	<b>38</b>	<b>14a</b>	<b>36</b>

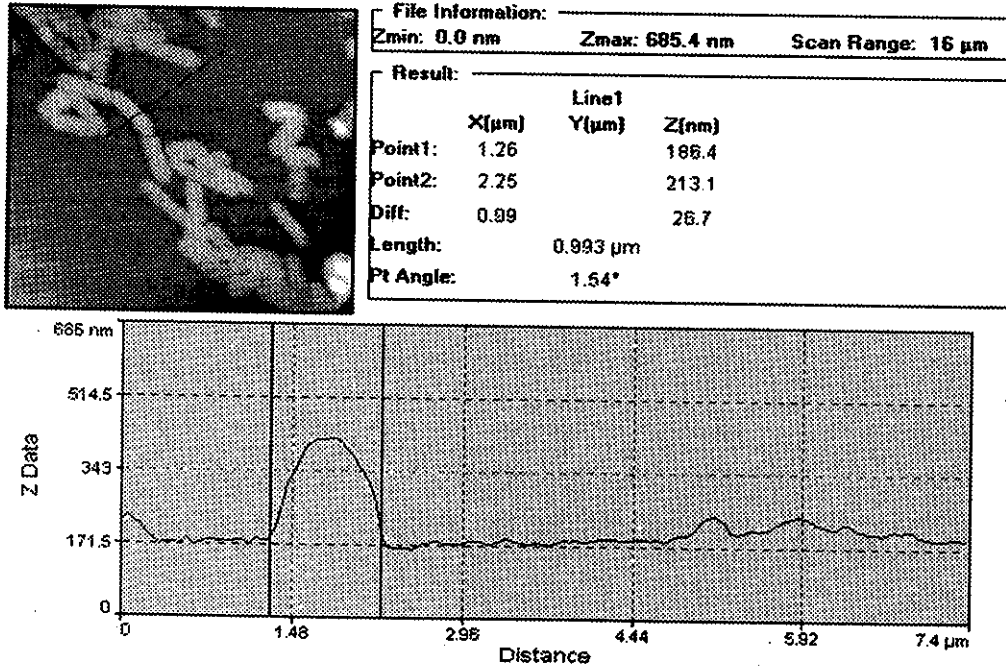
<sup>a</sup> IMA yöntemi, ISO 6579 referans metoduna göre 2 adet daha fazla gıda örneğinin *Salmonella* ile kontamine olduğunun saptanmasını sağlamıştır.

### AKM ile görüntü eldesine ilişkin sonuçlar

Şekil 1a ve 1b'de *S. enteritidis*'in boyutları analiz edilmiş ve bu patojenin boyu 2,635  $\mu\text{m}$ , eni 0,993  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur. Cox (1999), bu patojenin boyunun 2-5  $\mu\text{m}$ , eninin ise 0,7-1,5  $\mu\text{m}$  arasında olduğunu belirtmiştir. Bu verilere dayanarak, ölçümlerin literatür ile uygunluğundan bahsedilebilir.

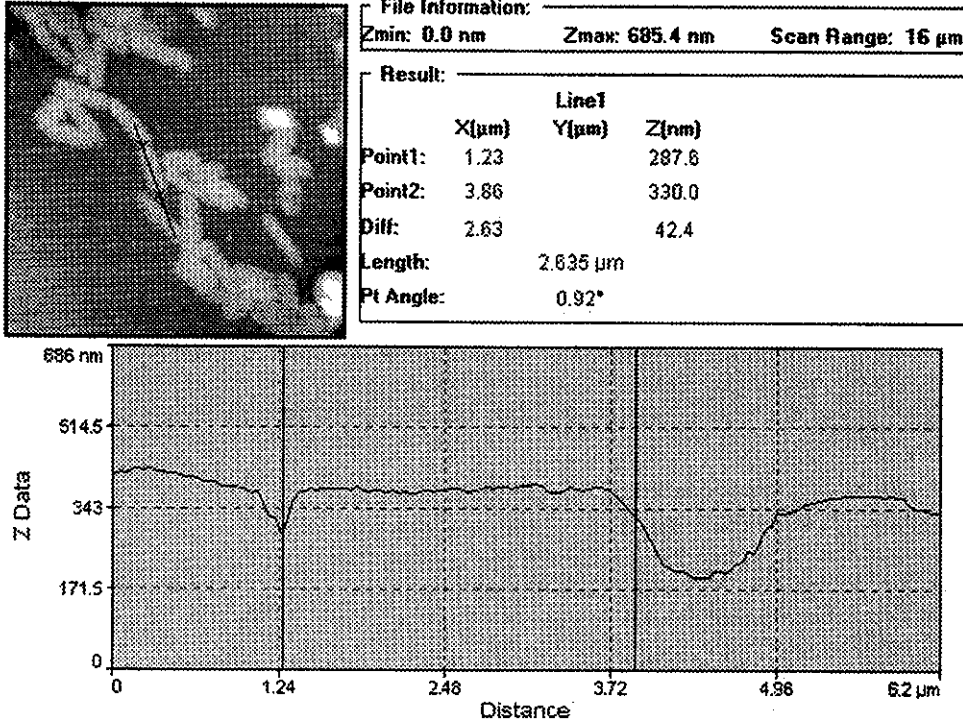


Şekil 1a. *S. enteritidis*'in boyut analizi (boy)  
\**S. enteritidis*'in boyu 2,635  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur.



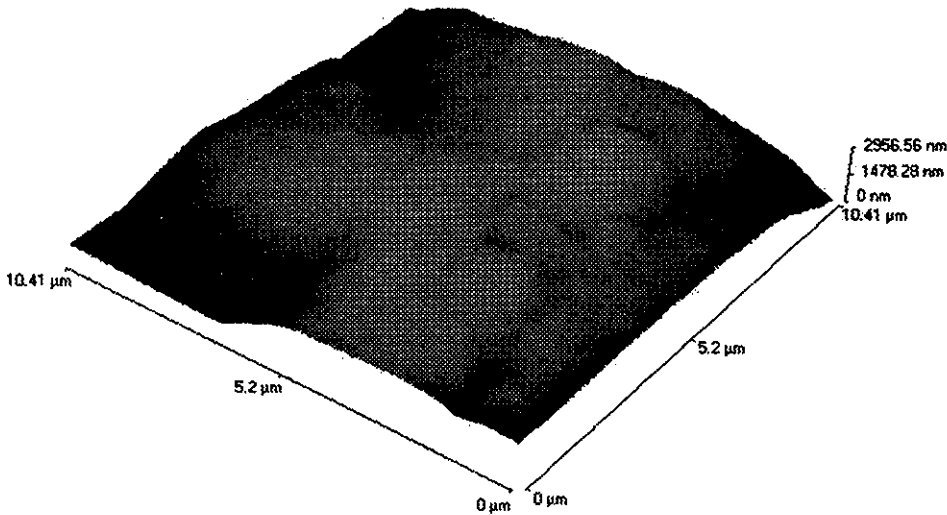
Şekil 1b. *S. enteritidis*'in boyut analizi (en)  
\**S. enteritidis*'in eni 0,993  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur.

Şekil 2'de, anti-Salmonella kürecikleri görüntülenmiş ve bu küreciklerin çapı 4,518 nm olarak bulunmuştur. Bu küreciklerin çapı, Anonymous (2000a)'da, 4,5 nm olarak belirtmiştir. Bu verilere dayanarak, ölçümlerin literatür ile uygunluğundan bahsedilebilir.



Şekil 2. Anti-Salmonella küreciklerinin boyut analizi

Son olarak, Şekil 3'de *S. enteritidis*+anti-Salmonella kompleksi görüntülenmiştir. Bu şekilden de görülebileceği gibi anti-Salmonella küreciklerine sadece *S. enteritidis* bağlanmıştır. Bu bağlanma, kullanılan IMA yönteminin yüksek özgünlüğe sahip olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3. *S. enteritidis*+anti-Salmonella küreciklerinin boyut analizi komplekslerinin topografik görüntüsü (iki anti-Salmonella küreğine tutunmuş bir *S. enteritidis*)

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

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın AKM ile yapılan görüntü analizlerinde yardımlarından dolayı, Dr. Erdal Tan'a (TAEK Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi Malzeme Araştırma Bölümü, Beşevler, Ankara) teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- Anonymous, 1994. Topometrix User's Manual Ver. 3.OX, Appendix 2, 85-10086.
- Anonymous, 1998. AOAC Off. Met. 967.27 *Salmonella* in Foods-Identification, 3s.
- Anonymous, 1999. Dynal Enrichment of *Salmonella*-Package Insert, Norway.
- Anonymous, 2000a. Dynal Bioscience Product Catalogue, Norway, 76 s.
- Anonymous, 2000b. Oxoid *Salmonella* Latex Test-Package Insert, England.
- Anonymous, 2000c. bioMérieux API 10S-Package Insert, France.
- Binnig G, Quate CF and Gerber C. 1986. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56: 930-933.
- Bohra LK. 2000. Evaluation of 5' nuclease based assays for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* from food, cattle feces and enrichment broth systems. Kansas State University, Thesis of PhD, 2-13, USA.
- Bowen WR, Hilal N, Lovitt RW and Wright CJ. 1999. Atomic force microscopy. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2, RK Robinson (chief ed), pp. 1418-1425, Academic Press, Great Britain.
- Cox J. 1999. *Salmonella*/Introduction. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 2, RK Robinson (chief ed), pp. 1929-1937, Academic Press, Great Britain.
- Cudjoe KS, Krona R and Olsen NN. 1994a. IMS: a new selective technique for detection of *Salmonella* in foods. *Int J Food Microbiol*, 23: 159-165.
- Cudjoe KS, Hagtvedt T and Dainty R. 1995. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. *Int J Food Microbiol*, 27: 11-25.
- De Boer E and Beumer RR. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 50: 119-130.
- 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.
- Mansfield LP and Forsythe SJ. 1993. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol*, 16: 122-125.
- Mansfield LP and Forsythe SJ. 2000. Detection of salmonellae in food. *Rev Med Microbiol*, 11 (1): 37-46.
- Molla B, Kleer J and Sinell H.-J. 1994. Detection of *Salmonella* in foods by immunomagnetic separation. *Arch Lebensmitelhyg*, 45 (5): 110-113.
- Safarik I and Safarikova M. 1999. Review: Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B*, 722: 33-53.
- Tan E. 2001. Atomik kuvvet mikroskobu. TMMOB Fizik Mühendisleri Odası (FMO) Bülteni., Haziran: 20-26.