

**TAMPON ÇÖZELTİDE İMMUNOMANYETİK AYIRMA VE ATP BİYOLÜMİNESANS
YÖNTEMLERİ İLE *ESCHERICHIA COLI* 0157:H7 SAYIMI**S. Aykut AYTAÇ¹Birce MERCANOĞLU¹Z. Yeşim ÖZBAŞ²**ÖZET**

Bu çalışmada; immunomanyetik ayırma yöntemi ile ATP biyoluminesans yöntemi birlikte kullanılarak, *Escherichia coli* 0157:H7 bakterisinin tampon ortamlarda sayımı yapılmıştır. Çalışma sonucunda, ATP biyoluminesans ölçümü ile *Escherichia coli* 0157:H7 sayımı arasında yüksek bir korelasyon katsayısı ($r=0.8303$) bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: İmmunomanyetik ayırma, ATP biyoluminesans, *Escherichia coli* 0157:H7, sayım

**ENUMERATION OF *ESCHERICHIA COLI* 0157:H7 BY USING IMMUNOMAGNETIC
SEPARATION AND ATP BIOLUMINESCENCE IN BUFFER SOLUTION****SUMMARY**

In this study, immunomagnetic separation and ATP bioluminescence methods have been combined and used in enumeration of the bacteria *Escherichia coli* 0157:H7 in sterile buffer solutions. As a result, a high correlation coefficient ($r=0.8303$) between the ATP bioluminescence assay and *Escherichia coli* 0157:H7 count was found as an acceptable value for such a study.

Key words: Immunomagnetic separation, ATP bioluminescence, *Escherichia coli* 0157:H7, enumeration

GİRİŞ

Escherichia coli 0157:H7'nin (Enterohemorajik *E.coli*, Verotoksijenik *E.coli*) ilk kez 1975'de Kaliforniya'lı ağır kanlı diyareli bir kadın hastadan izole edildiği bildirilmiştir. Bakterinin önemli bir gıda kaynaklı patojen olduğu ise; 1982 yılının başlarında Oregon ve Michigan'da kanlı kolit ile seyreden iki salgında hastalığa yol açan etmen olduğunun bulunması ile anlaşılmıştır. Halen günümüzde *E.coli* O157:H7, başta ABD olmak üzere pek çok ülkede ölümle sonuçlanan gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır (1).

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 edilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden birisi de immunomanyetik ayırma (IMA) yöntemidir. Bu yöntem; moleküler biyoloji, mikrobiyoloji ve immunoloji uygulamalarını

¹Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 06532 Beytepe, Ankara

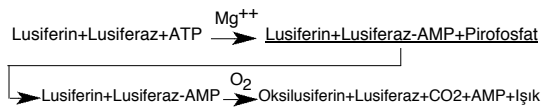
Geliş tarihi : 01.08.2000 Kabul ediliş tarihi : 26.06.2001

Yazışma adresi : Doç.Dr. Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 06532 Beytepe, Ankara

yapısında birleştiren bir manyetik ayırma teknolojisidir. IMA prensibi, manyetik veya manyetize olabilen süper-paramanyetik taşıyıcılar üzerine tutuklanmış antikorların hedef mikroorganizma hücrelerini tutabilmesi ve dış bir manyetik alan varlığında süspansiyondan kolayca ayrılabilmesine dayanmaktadır.

ATP biyolüminesans yöntemi, enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan ışığın şiddetinin ölçülmesi şeklinde tanımlanabilir. Bu yöntem uzun yıllardır bilinmekle birlikte zayıf özgünlük ve ajan stabilitesi, yüksek maliyet gibi nedenlerle yaygın kullanım olanağı bulamamıştır. Son yıllarda oldukça kararlı ışık sinyalleri veren kimyasal ajanların kullanılması ve maliyetlerin düşürülmesi yöntemin kullanılabilirliğinin artmasına önemli katkı sağlamıştır.

ATP, bütün yaşayan hücrelerde bulunan ve enerji transfer reaksiyonlarında rol oynayan önemli bir yapı taşıdır. Ortamda ATP'nin bulunması, biyokitlenin varlığını ortaya koymaktadır. Yöntemin ilkesi; ATP'nin, lüsiferin-lüsiferaz enzimi ile reaksiyona girerek biyolüminesans ışık vermesi ve açığa çıkan bu ışığın, lüminometre ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon şu şekilde gerçekleşmektedir (2, 3):



Bu çalışmada, IMA yöntemi ile ATP biyolüminesans birlikte kullanılmıştır. Böylece, steril tampion ortamda *E.coli* O157:H7'nin izolasyonunun ve bu bakterinin sayımının çok kısa sürede gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Klasik yöntemlerle bakterinin izolasyonu ve sayımı için en az 72 saat gerekirken, bu yöntemle 24-48 saatte sonuç alınabilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

IMA Partikülleri: IMA yönteminde kullanılan spesifik partiküller, Dynabeads® anti-*E.coli* O157 (710.04) ticari olarak Dynal® (Oslo-Norveç) firmasından sağlanmıştır. Bu partikül sisteminin

yüzeyleri, hedeflenen bakteri hücrelerini yakalayabilecek özellikte saflaştırılmış spesifik antikor ile kaplanmış durumdadır; %0.1 insan serum albumini ve %0.02 sodyum azid (NaN_3) içeren ortamda süspansiyon halinde bulunmaktadır (4).

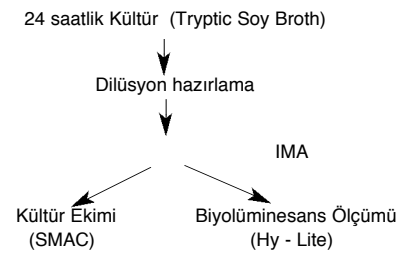
Bakteri kültürü: Denemede kullanılan bakteri kültürü; *E.coli* O157:H7 Prof. MP Doyle, Georgia Üniversitesi, ABD'den sağlanmıştır.

Besiyerleri ve çözeltiler: Çalışmada genel amaçlı olarak Tryptic Soy Broth (Difco, Michigan-USA) ve sayım amaçlı olarak ise Sorbitol MacConkey agar (SMAC) (Difco) besiyerleri kullanılmıştır. Tampion yıkama çözeltisi olarak 0.15M NaCl, 0.01M sodyum fosfat tampionu (pH 7.4) ve %0.05 Tween 20'den oluşan PBS-Tween 20 çözeltisi kullanılmıştır.

İmmunomanyetik ayırma yöntemi için deney düzeneği: Çalışmada Dynal® (Oslo-Norveç) firmasından sağlanan deney düzeneği kullanılmıştır. Düzenek; Dynal MX3 özel örnek karıştırıcısı, Dynal MPC-M manyetik yoğunlaştırıcısı ve manyetik çubuğundan oluşmaktadır.

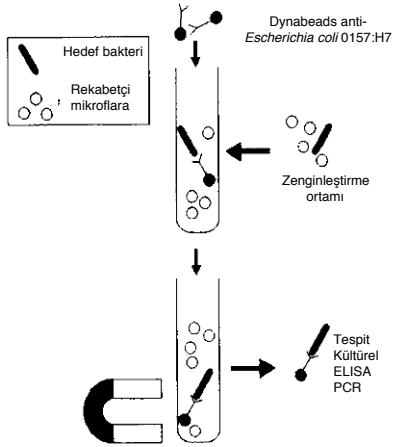
ATP biyolüminesans ölçümü için deney düzeneği: Araştırmada ATP biyolüminesans ölçümü için Hy-Lite™ (Merck, Darmstadt-Almanya) tipi lüminometre kullanılmıştır. Yine bu amaçla, içinde lüminesans ölçümünü sağlayan enzim bulunan özel kalemler (Merck) kullanılmıştır.

Deneme planı: Önce Tryptic Soy Broth besiyerinde 18-24 saatlik *E.coli* O157:H7 kültürü hazırlanmıştır. Bu kültürden uygun dilüsyonlar elde edilerek her bir dilüsyon için kültürel ekim (SMAC), IMA ve biyolüminesans ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Araştırmada izlenen deneme planı

IMA yöntemi: IMA yöntemi, Şekil-2'de gösterildiği gibi Dynal tarafından önerilen şekilde yapılmıştır. Bu amaçla, önce, 1 mL örnek alınarak özel tutucudaki steril Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 20 µl anti-*E.coli* O157:H7 Dynabeads partikül süspansiyonu eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında Dynal MX3 özel karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra; tutucu alınarak özel yuvasına manyetik çubuk yerleştirilerek, 3 dakika özel rotasyon hareketi ile elde karıştırılmıştır. Bu şekilde; partikül ve *E.coli* O157:H7 bakterilerinin, yaratılan manyetik alan yardımıyla, bir kompleks oluşturması ve bunun gözle görülür hale gelmesi sağlanmıştır. İşlem sonunda, tüpteki süpernatant uzaklaştırılmış ve steril 1mL PBS-Tween 20 çözeltisi ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama sonunda tekrar kompleks oluşumu sağlanmış ve bu iki kez tekrarlanmıştır.



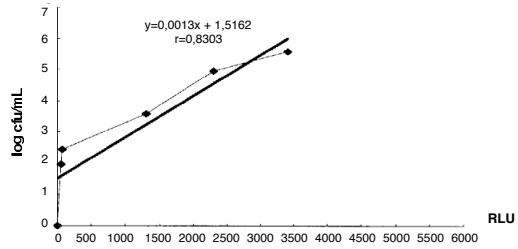
Şekil 2: IMA yönteminin çalışma mekanizması

ATP biyoluminesans ölçümü: ATP ölçümü, Hy-Lite® (Merck) tipi lüminometrede yapılmıştır. Bu amaçla; IMA ile elde edilen bakteri ve partikülden oluşan kompleks mikropipet ile alındıktan sonra, Hy-Lite için üretilmiş özel kalem içerisine aktarılmış ve hemen sonra okuma yapılmıştır. Okumalar, en az üç kez tekrarlandıktan sonra ortalamaları alınmıştır. Bu işlem; her bir bakteri dilüsyonu için tekrarlanmıştır.

***E.coli* O157:H7 sayımı:** IMA yöntemi ile elde edilen kompleks mikropipet ile alınarak, yüzeyleri önceden kurutulmuş SMAC agar besiyerine yüzeye sürme yöntemi ile ekilmiş ve 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra *E.coli* O157:H7 kolonileri sayılmıştır.

BULGULAR

Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular, Şekil-3'de gösterilmiştir. Mililitredeki *E.coli* O157:H7 sayısı ile ölçülen ATP biyoluminesans (RLU: Relative Light Unit) arasında $r=0.8303$ gibi yüksek bir korelasyon bulunmuştur.



Şekil 3: *E.coli* O157:H7 sayımı (log cfu/mL) ile ölçülen ışığın şiddeti arasındaki korelasyon

TARTIŞMA

Klasik yöntemlerle izolasyon ve sayım 24-72 saat gibi oldukça uzun bir süre gerektirmekte; hem zaman hem de ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Ancak; ATP biyoluminesans yöntemi ile, birkaç saat içinde toplam bakteri sayısı hakkında bilgi edinilmekte ve bu çalışmalarda oldukça yüksek korelasyon katsayıları elde edilmektedir.

Poggemann ve Baumgart (5) tarafından yapılan bir çalışmada, çelik yüzeylerdeki total bakteri sayısı ile RLU arasındaki korelasyon katsayısı $r=0.92$ olarak bulunmuştur. Waes ve ark. (6) ATP ölçümü ile çiğ sütteki total bakteri sayımı arasındaki korelasyonu $r=0.865$ olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Klasik ATP biyoluminesans ölçümlerinde sadece total bakteri sayımı ile ilgili bir sonuca

ulaşılabilen ve herhangi bir şekilde, sayılan bu bakterilerde cins/tür ayrımı yapılamamaktadır. Ancak; bu çalışmada, IMA yöntemi uygulandığı için, model steril bir tampon ortam kullanılmış

olsa da, sadece hedef bakteri hücresi ile oluşan kompleks alınarak *E.coli* O157:H7 bakterilerinin ATP biyoluminesans değerleri ölçülerek sayım yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Özbaş ZY, Aytaç SA. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiyolojisi, gıdalarla ilişkisi, patojenitesi ve izolasyon yöntemleri. Türk Hij ve Den Biyol Derg 1995; 52: 47-53.
2. Bautista DA. ATP Bioluminescence. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, eds. Encyclopedia of food microbiology. Great Britain: Academic Press, 1999: 80-8.
3. Cutter CN, Dorsa WJ, Siragusa GR. A rapid microbial ATP bioluminescence assay for meat carcasses. Dairy, Food and Environmental Sanitation 1996; 16: 726-36.
4. Anonymous Dynabeads magnetic separation. Cells and proteins, nucleic acids, microorganisms. Dynal Product Catalogue, Oslo, 1998: 5.
5. Poggemann HM, Baumgart J. Hygiene monitoring by ATP-determination with the Hy-Lite™ system. Fleischwirtschaft 1996; 76: 272-3.
6. Waes G, Van Crombrugge J, Reybroeck W. The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. Modern Microbiological Methods for Dairy Products, IDF, Brussels, 1989: 279-86.