

Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri

Rapid diagnostic methods in microbiology

Zeki ARAS¹

ÖZET

Mikrobiyoloji uygulamalarında önemli bir yere sahip olan hızlı yöntemler klinik, gıda ve çevresel örneklerde bulunan patojen mikroorganizmalar ve onların metabolitlerinin erken tespiti, izolasyonu, identifikasyonu ve sayımı için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İlk olarak 1960'ların ortalarında geliştirilmeye başlayan bu yöntemler, minyatürize biyokimyasal, immunolojik, genetik ve biyosensör tekniklerini kapsamaktadır. Minyatürize biyokimyasal identifikasyon yöntemleri 1965 ile 1975 yılları arasında geliştirilmiş, 1975 ile 1985 yılları arasında kalan süre immunolojik test yöntemlerinin altın çağı olarak adlandırılmıştır. Genetik tanı yöntemleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları 1985 ile 1995 yılları arasında gelişim göstermiştir. 1995 yılından günümüze kadar ise biyosensör ve mikroarray test sistemleri, çeşitli örneklerde bulunan patojen organizmaların direk tanısı amacıyla geliştirilmiştir. Bu derlemede anlatılan immunolojik testler, manüel ve otomatik ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) testlerini, lateral migrasyon immunoassay, latex aglutinasyon testlerini ve immunomanyetik separasyon yöntemlerini kapsamaktadır. Genetik tanı yöntemlerinden birisi olan PZR, patojen mikroorganizmaların doğru tanısını güçlendirmek için son yıllarda daha da geliştirilmiştir. Hızlı testlerin güvenilirliği ile ilgili bir çok

ABSTRACT

Rapid methods are an important part of applied microbiology and are widely used for isolation, identification, early detection, and enumeration of pathogen microorganisms and their products in clinical, food, and environmental samples. These methods which were comprised as miniaturized microbiological, advanced immunological, genetic, and biosensor techniques were began to be developed in mid-1960s. The miniaturized microbiological diagnostic kits were developed from 1965 to 1975. The years of among 1975-1985 were called the golden age of immunological tests. The genetic diagnostic methods and polymerase chain reaction (PCR) applications have developed between the years 1985 and 1995. Since 1995, the biosensor and microarray test systems have been developed for direct detection of pathogen microorganisms in different samples. The immunological tests described in this review include manual and automated enzyme linked immunosorbant assays, lateral migration immunoassays, latex agglutination tests and immuno-magnetic separation assays. PCR process which is one of the genetic procedures has been improved in order to strenghten the diagnosis of pathogen organisms. Numerous studies have been conducted to determine the sensitivity and specificity of these tests. They have determined that the

¹ Konya İl Sağlık Müdürlüğü, KONYA

İletişim / Corresponding Author : Zeki ARAS

Konya İl Sağlık Müdürlüğü, KONYA

Tel : +90 332 351 18 32

E-posta / E-mail : zekiaras@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 08.09.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 14.12.2010

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2011.96530

araştırmanın sonuçları göstermiştir ki; bu testler ucuz ve hızlıdır ayrıca yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptirler. Bu makalede hızlı testlerin çalışma prensipleri ve araştırma sonuçlarının karşılaştırılması sunulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Hızlı yöntemler; tanı testleri; ELISA; PZR, biyosensör

tests are rapid, highly sensitive, specific and inexpensive methods. Theoretical information and results of comparative studies about these methods are described in detail in this review.

Keywords: Rapid methods, diagnostic test, ELISA, PCR, biosensor

GİRİŞ

Mikrobiyolojik yöntemler; geleneksel ve hızlı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Geleneksel yöntemler halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Hızlı yöntemler terimi, farklı tiplerdeki minyatürize biyokimyasal kitleri, antikor temelli serolojik testleri, nükleik asit hibridizasyon kökenli yöntemleri ve biyosensörleri kapsamaktadır. Bu test yöntemleri manuel, yarı otomatik veya tam otomatik kullanıma sahiptirler (1, 2). Hızlı yöntemler; klinik, gıda ve çevresel örneklerde bulunan bakteri, mantar, virüs ve protozoon gibi mikroorganizmalar ile onlara ait metabolitlerin izolasyonu, identifikasyonu, erken tanısı, sayımı ve bakterilerin antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (1). Bu yöntemler yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olmalı, ayrıca ucuz ve kısa sürede sonuç vermelidir. Günümüzdeki yöntemlerin tamamı bu sayılan özellikleri taşımaktadır (2).

Mikrobiyoloji uzmanları, hızlı yöntemlerle ilk olarak 1960'ların ortalarında tanışmaya başlamışlardır. 1970'lerde gelişimi ivme kazanan bu yöntemlerin ilerlemesi 1980'lerden günümüze kadar devam etmiştir (1). Hızlı yöntemlerin yıllara göre gelişimi şöyle tanımlanabilir:

1965 - 1975 : minyatürize biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinin gelişimi,

1975 - 1985 : immunolojik testlerin gelişimi,

1985 - 1995 : moleküler sistemlerin ve polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) uygulanması,

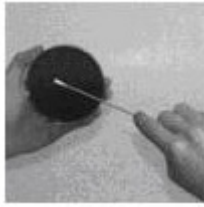
1995 - ... : biyosensör ve mikroarray gibi sistemlerinin gelişimi (3).

MİNYATÜRİZE BİYOKİMYASAL İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan geleneksel biyokimyasal testlerde yoğun işgücü ile yüksek miktarda ayıraç ve besiyeri tüketilmektedir. Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde ise dehidrate ayıraçlar veya kullanıma hazır besiyerleri kullanılmaktadır. Bu teknikler genellikle “modern biyokimyasal identifikasyon teknikleri” adı ile anılmakta ve günlük laboratuvar uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (2).

Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde, pleytlerde hazır bulunan çeşitli sıvı veya katı besiyerlerine saf kültürler inokule edilip inkübe edilir ve enzim-substrat ilişkisine bağlı oluşan renk değişimi ya da gaz oluşumu ile bakteri belirlenir. Sonuçlar tanı çizelgeleri ile karşılaştırılabileceği gibi veritabanları ile de analiz edilebilir (Şekil 1) (1, 2).

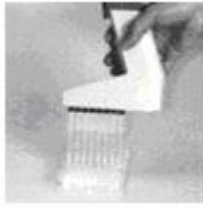
Bilim adamları tarafından, 1960 ve 1970 yılları arasında birçok sistem minyatürize edilmiş ve tanı amaçlı kullanılmıştır. Son yıllarda API (Biomerieux), Enterotube (Becton-Dickinson), Minitek (BBL Microbiology), Crystal ID (Bacto Laboratories), MicroID (Remel), RapID (Rapid), Biolog (Biolog Systems) ve Vitek (Biomerieux Diagnostics) gibi çeşitli minyatürize ticari tanı sistemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, önceleri enterik bakterileri (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter* vb.) identifiye etmek için tasarlanmışken daha sonraları fermentatif olmayan bakteriler, Gram pozitifler, anaeroblar ve mayaların identifikasyon ve antibiyogramlarını yapabilecek



1- Katı besiyerinde saf kültürün elde edilmesi ve kullanılacak test kiti çeşidinin belirlenmesi için gram boyama yapılması



2- İnokulumun yoğunluğunun ayarlanması



3- Mikropleyde inokulasyonun yapılması ve inkübasyona bırakılması



4- Mikropleyten okunması ve mikroorganizmanın idenfifiye edilmesi

Şekil 1. Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde işlem basamakları

şekilde geliştirilmişlerdir. Bu sistemlerde kullanılan test kartları, değişik büyüklükte ve antibiyotik veya identifikasyon substratları içeren değişik sayıda mikro kuyucuklardan oluşmaktadırlar. Plastik kartların her gözünde farklı ayraçlar bulunmaktadır. Bilinmeyen kültürün sıvı formu plastik kartların her bir gözünün vakum dairesinden verilmekte ve kart bir inkübatöre kaldırılarak 4-12 saat inkübe edilmektedir. Otomatik yöntemlerde, sistem belirli sürelerle her bir kartı taramakta ve renk değişimi veya gaz oluşumunu her bir göz için veritabanı ile karşılaştırmaktadır (1-4).

İlk karşılaştırmalı analizlerin çoğu klinik örneklerinin değerlendirilmesine odaklanmıştır. Minyatürize diagnostik sistemlerin kriterlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ilk çalışmalarda, minyatür sistemlerin geleneksel yöntemlerden daha hızlı, daha doğru ve daha ucuz oldukları ve ayrıca insan gücünden ve çalışma alanından tasarruf sağladıkları sonucuna varılmıştır. Başlangıçta, hızlı tanı kitlerinin her bir gözündeki renk değişimi gözle okunup daha sonra elde edilen manuel identifikasyon kodu kullanılarak mikroorganizma belirlenirken, son zamanlarda diagnostik tanı şirketleri bilinmeyen

kültürlerin identifikasyonlarının hızlı ve doğru yapılabilmesi için bilgisayarlı otomatik okuyucular geliştirmişlerdir (4).

Mikrobiyolojik yöntemlerin minyatürizasyonu, materyal ve zaman kazancı ile ticari mikrobiyolojiye hızlı ve kolay çalışma imkanı sağlamıştır. Geliştirilen sistemler ile özellikle rutin teşhis laboratuvarlarında kısa sürede fazla sayıda örnek işlenebilmektedir. Ayrıca bu sistemler gelişmiş laboratuvarların çok sayıda kültür işlenmesi gereken çalışmalarında ve birçok araştırmada kullanılabilir (1, 4).

Swanson ve Collins (5) tarafından 503 veteriner kökenli patojen enterik bakteri kullanılarak yapılan bir çalışmada, hızlı minyatürize test kitlerinden birisi olan API 20E'nin veteriner mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Test kiti veteriner izolatların % 96'sını doğru, % 3'ünü yanlış identifiye etmiş ve % 1'ini identifiye edememiştir. Yanlış identifikasyonun *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Escherichia coli* suşlarından ileri geldiği belirlenmiştir. Veteriner ve beşeri izolatlar arasındaki biotip farklılığı da bazı biyokimyasal reaksiyonlar (sitrat kullanımı gibi) arasındaki farklılığa bağlanmıştır.

Jayrao ve ark. (6) tarafından yapılan bir çalışmada, 144 veteriner kökenli *Streptococcus* suşu (mastitis vakalarından izole edilmiş suşların dağılımı: *Streptococcus uberis* (60), *Streptococcus dysgalactiae* (32), *Streptococcus agalactiae* (15), *Streptococcus bovis* (15), *Enterococcus faecium* (10) ve *Enterococcus faecalis* (12)) Vitek Gram pozitif identifikasyon kiti ve API Rapid Strep system kitleri ile değerlendirilmiş elde edilen sonuçlar klasik biyokimyasal identifikasyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Referans suşlar her iki kit ile de doğru identifiye edilmiştir. Vitek Gram pozitif identifikasyon kiti ile toplam 144 suşun % 94,4'ü identifiye edilebilirken bu sonucun türlere göre dağılımı ise şöyle olmuştur: *S. uberis* % 95, *S. dysgalactiae* % 93,8, *S. agalactiae* ve *S. bovis* % 93,3, *E. faecium* % 90 ve *E. faecalis* % 100. API Rapid Strep kiti ile ise % 96,5 doğrulukla identifikasyon sağlanmıştır. Suşların büyük bir çoğunluğu istenilen identifikasyon seviyesinde identifiye edilmişlerdir. Ayrıca suşların identifikasyonları ortalama 4-8 saatte gerçekleştirilmiştir.

API sistem birden fazla bakteriyel taksonomik grubu identifiye etmek için kullanılmıştır. Domuzlardan izole edilmiş 60 *Pasteurella multocida* suşu ile yapılan bir çalışmada, API 20NE testi PZR ile karşılaştırılmış ve API 20NE ile izolatların tamamı doğru identifiye edilmiştir. Ayrıca, API 20NE test kiti, API 20E, API 50CHB/E ve API ZYM kitleri ile birlikte kullanıldığında izolatların alt tiplerini de belirleyebildiği ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (7).

İMMUNOLOJİK YÖNTEMLER

Mikroorganizmaların belirlenmesi ve karakterizasyonunda antikor antijen reaksiyonu yıllardır uygulanmaktadır. Ayrıca, düşük moleküler ağırlığa sahip mikotoksin, pestisit veya veteriner ilaçları gibi gıda kontaminantlarının belirlenmesinde de tercih edilmektedir. Bir immunolojik yöntemin spesifitesini büyük ölçüde kullanılan antikorun spesifitesi belirlemektedir. İmmunolojik yöntemlerde üç çeşit

antikor kullanılmaktadır: Poliklonal antikorlar, monoklonal antikorlar ve rekombinant antikorlar (1, 2).

Antijen-antikor reaksiyonu tüm patojenlerin hızlı belirlenmesi için güçlü bir sistemdir. Bazı sistemler yüksek oranda otomatize edilmişken bazı sistemler ise basit kullanıma sahiptir. Bu testler şöyle sınıflandırılabilir:

1. Lateks Aglütinasyon Testleri

Antikor kaplı ve boyalı lateks ya da kolloidal altın partikülleri, hızlı serolojik identifikasyon ya da saf bakteri kültür izolatlarının teşhis ve tiplendirilmesinde kullanılır. Antijen ile antikorun birleşmesi sonucu gözle görülür aglütinasyon şekillenir. Ters lateks aglütinasyon testleri çözünebilir antijenler içindir ve çoğunlukla toksinlerin aranmasında kullanılırlar (2, 8).

Papasian ve ark. (8) tarafından, 191 stafilokok izolatı ile yapılan bir çalışmada, Staph Latex Kit (Remel), Staphaurex Plus (Murex), Staphyloslide (Becton Dickinson Microbiological Systems) rapid lateks aglütinasyon test kitleri tüp koagülaz testi ile karşılaştırılmıştır. Kitlerin ve tüp koagülaz testinin identifikasyon doğruluk yüzdeleri sırası ile % 98,4, % 100, % 99,5 ve % 99,5 olarak bulunmuştur.

Lee ve ark. (9) tarafından, veteriner kökenli 48 Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatı ile yapılan bir çalışmada, MRSA-Screen lateks aglutination test kiti (Denka Seiken) PZR ile karşılaştırılmıştır. Test kitinin spesifitesi ve sensitivitesi % 100 olarak bulunmuştur.

2. Otomatik ve Manuel ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemleri

Antijen antikor reaksiyonunu gerçekleştirmek için birçok yöntem olmasına rağmen son yıllarda en çok kullanılan yöntem ELISA testidir. Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir (10, 11). ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç ELISA gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı sandviç ELISA yöntemidir (1).

Patojen mikroorganizmaları ve toksinlerini belirlemek için birçok ELISA testi geliştirilmiştir. Fakat bunun yanında ELISA'nın manuel prosedürü çok zahmetli olduğu için son zamanlarda bazı ELISA testleri (VIDAS, Assurance EIA, Transia ElisamaticII, Detex vb) tamamen otomatik hale getirilmiştir. Bu sistemler ile *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *E.coli* 0157, stafilakokkal enterotoksin ve *Campylobacter* gibi patojen ve toksinleri kısa sürede otomatik olarak teşhis edilmektedir (1, 2). Günümüzde kullanılan birçok ELISA kiti yüksek standarda sahiptir ve otomatik olarak çalışmaları için hız ve verimi arttırmakta ve insan hatalarını azaltmaktadır (4).

Sewell ve ark. (12), doğal kontamine 44 çiğ süt örneğinde yaptıkları çalışmada, *Listeria spp.* araştırılması yönünden VIDAS sistemini klasik yöntemle karşılaştırmışlar ve sistemin duyarlılığını % 98,1 özgüllüğünü % 97 olarak belirlemişlerdir.

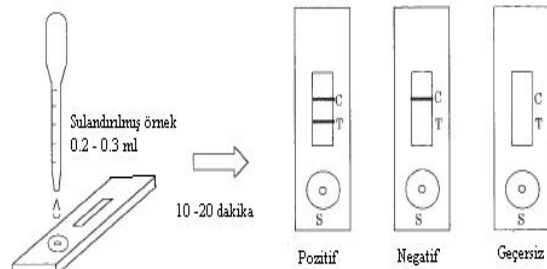
Oktay ve ark. (13) tarafından yapılan bir çalışmada, 42 kaşar peyniri, 42 tereyağı ve 38 kumpir örneği *L. monocytogenes* ve *Salmonella spp.* varlığı yönünden mini-VIDAS ve klasik yöntemle incelenmiştir. Doğal kontamine örneklerde *L. monocytogenes* analizinde klasik yöntemin özgüllüğü peynir için % 99, tereyağı için ise % 98 olarak belirlenmiştir. Bu örneklerde mini-VIDAS sisteminin duyarlılığı ve özgüllüğü ise % 100 olarak bulunmuştur. Gıda numunelerinde *Salmonella spp.* tayini açısından mini-VIDAS yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir. Mini-VIDAS cihazı ile *L. monocytogenes* ve *Salmonella spp.* tayininde hatalı sonuç alınmamış olması büyük bir avantaj olarak belirtilmiş, ayrıca cihaz kullanımının pratikliği ve tüm besiyerlerinin kullanıma hazır olmasının, işgücü ve zamandan tasarruf sağladığı da vurgulanmıştır.

3. Lateral Migrasyon İmmunoassay (İmmunokromatografi) Yöntemi

İmmunoloji alanındaki diğer bir gelişme ise antijen-antikor ilişkisine dayanan "Lateral Flow Teknoloji"sinin kullanımınıdır. Bu test formatında da sandviç prosedürü kullanılır fakat ikinci antikor

lateks partikülleri veya koloidal altın ile bağlanmıştır. Zenginleştirilmiş örnek bir seri dairelere transfer edilir ve yıkama işlemine gerek yoktur (2).

Bu sistemde, test kiti üç reaksiyon bölgesine sahiptir. Birinci kuyucuk hedef antijenle reaksiyona girecek antikoları içerir. Bu antikolar renk partikülleri ile bağlanmıştır. Sıvı formdaki örnek (bir gece süreyle zenginleştirilmiş) bu kuyucuğa eklenir eğer örnekte aranan organizma varsa antikolarla reaksiyona girecektir. Oluşan kompleksler kapiller hareket ile ikinci bölgeye lateral olarak yığılacaktır. İkinci bölge, hedef antijen ile reaksiyona girebilecek şekilde düzenlenmiş ikinci bir antikor grubu içerir. Eğer aranan mikroorganizma örnekte varsa oluşan kompleksler bu ikinci antikor grubunca kaplanacaktır ve birinci antikor grubunun renk partikülleri ile kaplı olmasından dolayı mavi bir çizgi hattı oluşacaktır. Fazla antikolar üçüncü bölgeye yığılmaya devam edeceklerdir. Üçüncü bölge ilk antikolar ile reaksiyona girebilen diğer bir üçüncü çeşit antikora sahiptir. Böylece üçüncü bölgede ikinci bir mavi hat oluşacaktır. Bu çizgiye "kontrol" çizgisi denilmektedir ve sistemin çalıştığını göstermektedir (Şekil 2). Tüm bu prosedürler yalnızca 10 dakikada oluşmaktadır ve gerçek bir hızlı testtir (4).



Şekil 2. Lateral migrasyon immunoassay
C: kontrol çizgisi, T: test çizgisi S: örnek gözü

Bacillus anthracis, *E. coli* 0157, *Salmonella*, *Listeria* ve Avian influenza gibi patojenlerin çeşitli örneklerden hızlı tespiti ve identifikasyonu için çeşitli testler geliştirilmiştir. Örnekler 8-24 saatlik zenginleştirmeye tabi tutulduktan sonra test kutusuna

aktarılmaktadır. Sadece kontrol çizgisinin oluşması sonucun negatif olduğunu, hem kontrol çizgisinin hem de test çizgisinin oluşması sonucun pozitif olduğunu gösterir.

Bird ve ark. (14), çeşitli gıda örneklerinden izole ettikleri toplam 1095 *E. coli* O157:H7 suşunu kullanarak, Reveal *E. coli* test kitini klasik yöntem ile karşılaştırmışlardır. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak ($p < 0,05$) bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

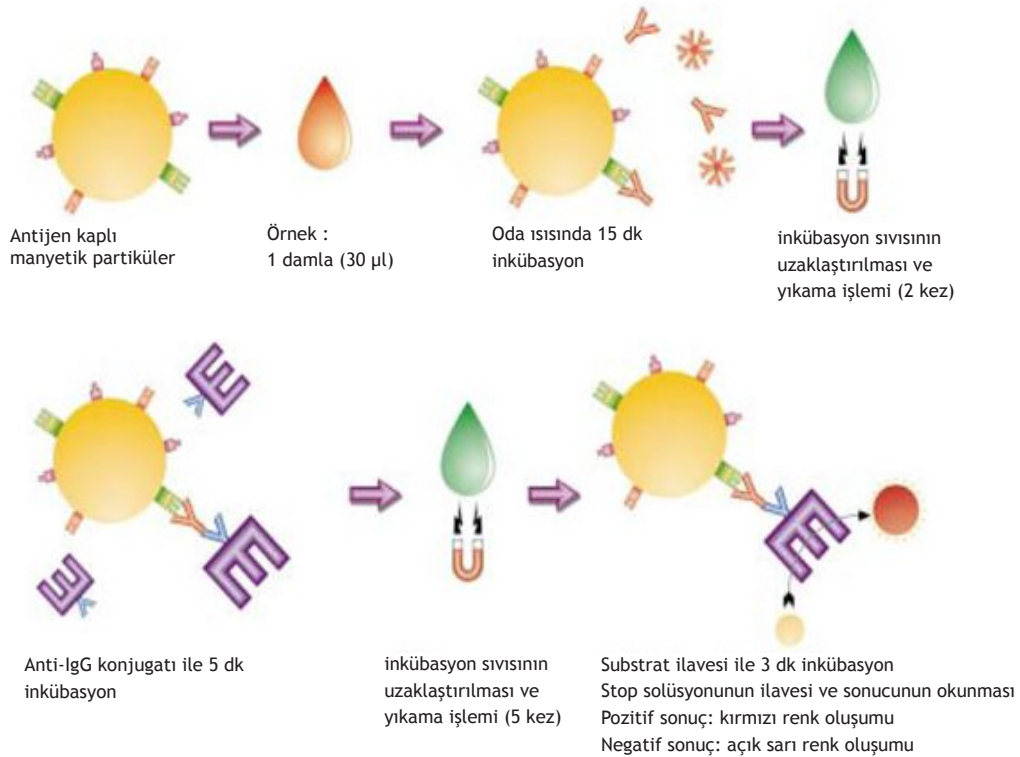
4. İmmüno-Manyetik Seperasyon (IMS) Teknolojisi

Bu yöntemde, metalik partikülleri antikorlarla kaplanmakta ve milyonlarca metalik partikül şüpheli sıvı numuneye eklenmektedir. Örnek bir saat kadar karıştırıldıktan sonra partiküllerdeki antikorlar antijen ile bağlanmaktadır. Reaksiyondan sonra tüp manyetik güç kaynağına yerleştirilip partiküller mıknatısın yardımı ile tüpten uzaklaştırılır. Daha sonra

bu metal partiküller selektif agar, ELISA, PZR ya da diğer mikrobiyolojik yöntemler ile saf kültür olarak elde edilebilirler (Şekil 3). IMS sistem, gıdalardan patojenlerin belirlenmesinde zenginleştirme ve ön zenginleştirme basamaklarından en az bir gün tasarruf sağlamaktadır (4). Son zamanlarda birçok tanı sistemi (ELISA, PZR vb) immüno-manyetik kaplama sistemi ile kombine edilmiştir. Bu sayede inkübasyon süresi kısaltılmış ve duyarlılık arttırılmıştır (2). Sommerfelt ve ark. (15) tarafından yapılan bir çalışmada, HIV virüsünü tespit amacı ile geliştirilmiş Bionor HIV-1&2 isimli test IMS kitinin spesifitesi ve sensitivitesi sırasıyla % 98 ve % 97,9 olarak bulunmuştur.

GENETİK YÖNTEMLER

Mikroorganizmaların fenotipik özellikleri üreme şartlarına bağlıdır. Bu üreme şartlarına örnek olarak, ısı, pH, besin ihtiyacı, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli, çevresel ve kimyasal stresler, toksinler



Şekil 3. İmmüno-manyetik seperasyon sistemlerinin çalışma prensibi

vb. verilebilir (4). Bakteri ve hücrelerin genotipik özellikleri ise çok stabildir. Bakteriyel kültürlerde doğal mutasyon oranı yüz milyonda birdir. Son yıllardaki gelişmeler genetik testlerde diagnostik mikrobiyoloji içerisinde identifikasyon ve doğrulayıcı testler olarak kullanılmasını sağlamıştır (2).

Bilinmeyen bir bakteriye ait DNA dizisinin bilinen bir DNA probu ile hibridizasyonu genetik testlerin ilk aşamasını oluşturmuştur. Genetrak Sistem (Framingham) patojenlerin enzimle işaretli DNA problemleri kullanılarak tespit edilmesi için geliştirilmiş hassas bir yöntemdir. Stewart ve ark. (16) tarafından yapılan bir çalışmada, *Salmonella* ile kontamine 64 su örneği kullanılarak "Assurance Gold *Salmonella* EIA", "BAX for Screening/*Salmonella*" ve "GENE-TRAK *Salmonella* DLP" test kitleri karşılaştırılmıştır. Test kitlerinin doğruluk oranları sırası ile % 100 (64/64), % 90,6 (58/64), % 100 (64/64) olarak bulunmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), çeşitli örneklerde bulunan patojen mikroorganizmaların hızlı ve doğru teşhisi için son yıllarda hızlı bir gelişim göstermiştir. Bu yöntemde, aranan mikroorganizmaya ait hedef gen bölgesinin kısa oligonükleotid parçaları ile amplifikasyonu yapılmakta ve çoğaltılan DNA parçaları elektroforez yardımı ile görüntülenmektedir. Bu yöntemin, çeşitli örneklerde bulunan mikroorganizmaları teşhis etmede, altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi kadar güvenilir olduğu tespit edilmiştir (17, 18). Birçok mikroorganizmanın tespit ve identifikasyonu için çok sayıda PZR protokolü geliştirilmiştir.

BİYOSENSÖR KÖKENLİ YÖNTEMLER

Biyosensörler, bünyesinde biyolojik bir duyarlıcı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörlerin amacı, bir veya bir grup analit (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir (19). Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır.

Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip "biyomolekül/ biyoajan", bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen "çevirici" ve "elektronik" bölümlerdir (4).

Biyosensörün görevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörler biyokomponentler (reseptör) ile fiziksel komponentlerden (transdeuser) oluşurlar. Yapılarında görev alan biyokomponentler çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Enzim - substrat ve antikor - antijen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır (19).

Biyosensörlerin, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, kalite kontrol, tarım ve veteriner hekimlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda kullanımı söz konusudur. Biyosensörler, enzim, mikrobiyal, immuno ve DNA-sensörler olarak gruplandırılabilirler (4).

"Detex" sistem bu alandaki otomatize edilmiş bir sistem olup elektroimmunoassay biyosensör teknolojisi kullanılmıştır. Tüm ayrıçlar kullanıma hazır bir şekilde cihazın içinde hazır bulunmaktadır. Test edilecek örnek test kasetine yerleştirilir ve immunolojik reaksiyonlar için ayrıç sekansı otomatik olarak başlar. Reaksiyonlar tamamlanınca sonuç cihaz tarafından rapor edilir. Et ve kültür örneklerinin sonuçlarına göre sensitivite ve spesifite *Salmonella* için sırasıyla % 100 ve % 99, *Campylobacter* için % 99 ve % 99 bulunmuştur (4).

SONUÇ

Hızlı yöntemler, yoğun numune akışının olduğu gıda ve hastane laboratuvarları başta olmak üzere tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda gelişimi ivme kazanan PZR yöntemi, birçok patojen mikroorganizmanın gen sekanlarının belirlenmesi

ile yaygın bir kullanım alanına kavuşmuştur. Bu yöntemle bir gün gibi kısa bir süre içerisinde sonuç verilerek zaman tasarrufu da sağlanmaktadır. Gelecekte, biyosensör çeşitlerinin gelişmesiyle,

hızlı tanı yöntemlerinin özellikle HACCP programları kapsamında kontaminasyon noktalarının değerlendirilmesinde kullanılacağı beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of development and predictions. *Bull Tech U Ist*, 2006; 54 (4): 45-55.
2. Blankenfeld-Enkvist GV, Brannback M. Technological trends and needs in food diagnostics. *Technol Review*, 2002; 132/2002.
3. Fung DYC. What's needed in rapid detection of foodborne pathogens, *Food Technol*, 1995; 6: 64-7.
4. Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology. *Compreh Rev Food Sci Food Safety*, 2002; 1: 3-21.
5. Swanson EC, Collins MT. Use of the API 20E system to identify veterinary Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 1980; 12: 10-4.
6. Jayarao BM, Oliver SP, Matthews KR, King SH. Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of Streptococcus species of bovine origin. *Vet Microbiol*, 1991; 26(3): 301-8.
7. Vera Lizarazo YA, Rodríguez Ferri EF, Gutiérrez Martín CB. Evaluation of different API systems for identification of porcine Pasteurella multocida isolates. *Res Vet Sci*, 2008; 85(3): 453-6.
8. Papasian CJ, Garrison B. Evaluation of a rapid slide agglutination test for identification of Staphylococcus aureus. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999; 33: 201-3.
9. Lee JH, Jeong J, Park Y, Choi S, Kim Y, Chae J, Moon J, Park H, Kim S, Eo S. Evaluation of the Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(6): 2780-2.
10. Uçan US, Aras Z, Zorlutuna M. Detection of canine brucellosis by a rapid agglutination test using Rhizobium tropici as antigen. *Revue Med Vet*, 2010; 161: 51-6.
11. Uçan US, Aras Z, Semaçan A. Serodiagnosis of Brucella canis infection in dogs by a dipstick enzyme immunoassay. *Eurasian J Vet Sci*, 2010; 26 (2): 109-12.
12. Sewell AM, Warburton DW, Boville A, Daley EF, Mullen K. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of Listeria spp. from foods. *Int J of Food Microbiol*, 2003; 81: 123-9.
13. Oktay İ, Heperkan D. Listeria ve Salmonella tayininde ISO yönteminin VIDAS otomatik sistemi ile karşılaştırılması. *Dünya Gıda Dergisi*, 2005; 74-81.
14. Bird CB, Hoerner RJ, Restaino L. Comparison of the Reveal 20-hour method and the BAM culture method for the detection of Escherichia coli O157:H7 in selected foods and environmental swabs: Collaborative study. *J AOAC Int*, 2001; 84(3): 737-51.
15. Sommerfelt MA, Ohlsson I, Flolid I, Thorstenson R, Sorensen B. A simple semi-rapid HIV-1&2 confirmatory immunoassay using magnetic particles. *J Virol Methods*, 2004; 115(2): 191-8.
16. Stewart DS, Reineke KF, Tortorello ML. Comparison of assurance gold Salmonella EIA, BAX for screening/Salmonella, and GENE-TRAK Salmonella DLP rapid assays for detection of Salmonella in alfalfa sprouts and sprout irrigation water. *J AOAC Int*, 2002; 85(2): 395-403.
17. Aras Z, Uçan US. Detection of Brucella canis from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. *Theriogenology*, 2010; 74: 658-62.
18. Aras Z, Uçan US, Ateş M. Brucella suşlarının identifikasyon ve biyotiplendirilmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 2009; 25: 51-9.
19. Ramsay G. Commercial biosensors applications to clinical bioprocess and environmental samples. A Wiley - Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc. Virginia, 1998.