

Gıdalarda *Salmonella* Aranması

Genel Bilgiler

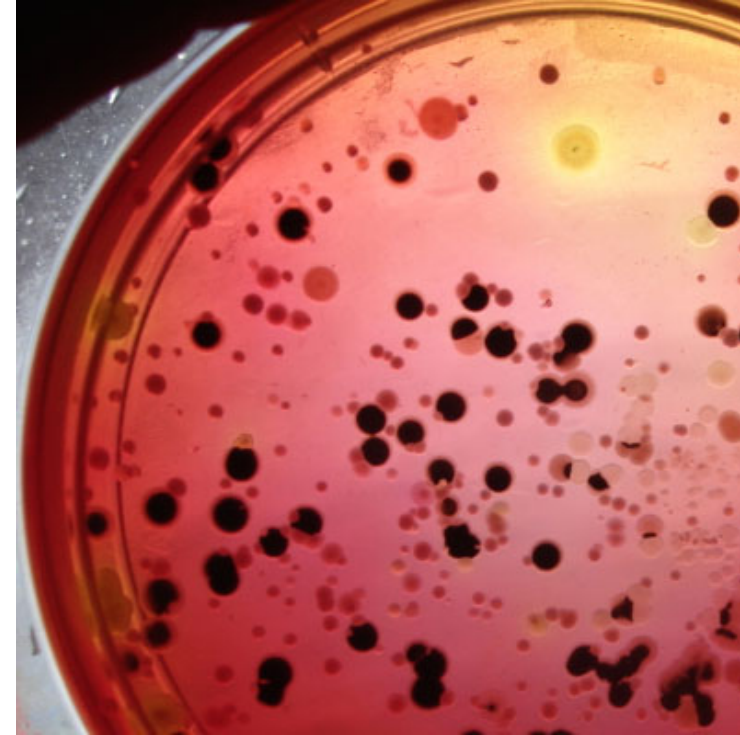
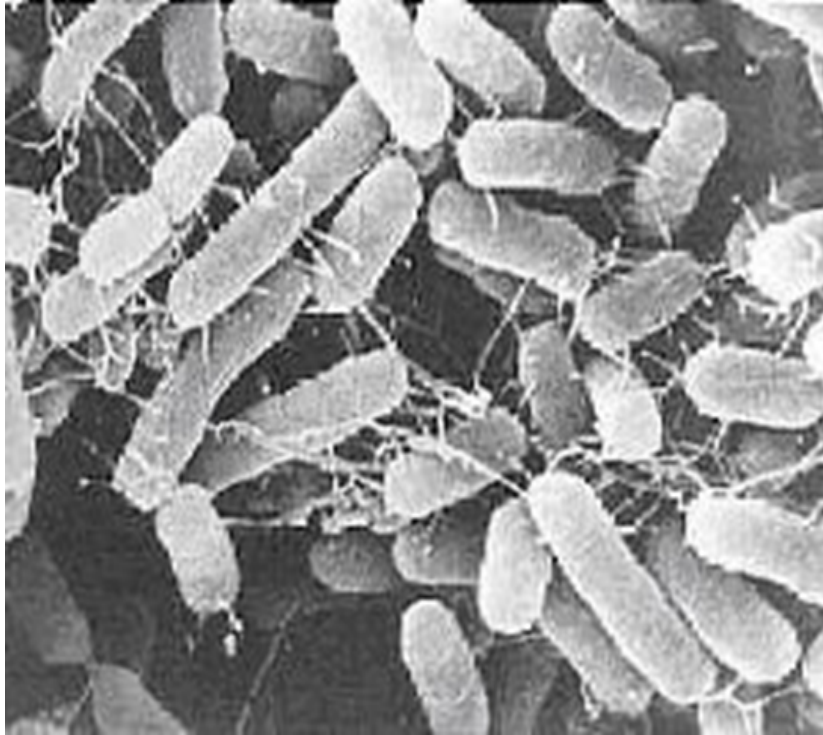
- Enterobacteriaceae familyasına ait, Gram negatif, spor oluşturmeyan, fakültatif anaerob, çubuk formunda olup, çoğu (*S.Pullorum*, *S.Gallinarum* ve *S.Arizona* serotipleri hariç) peritrik flagellaları ile hareketlidir.
- 6 – 47 °C'ler arasında üreyebilmektedirler. Optimum üreme dereceleri 35 - 37 °C'dir.
- Soğuğa karşı çok dayanıklıdırlar. Buz içerisinde aylarca canlı kalabilirler.

Genel Bilgiler

- Optimum gelişme pH değeri 6,5-7,5'dir. Ancak pH 4,0-9.0 değerleri arasında da üreyebilmektedir.
- Gelişebilecekleri su aktivitesi (a_w değeri) 0,945-0,999 değerleri arasındadır.
- % 8'lik tuz konsantrasyonlarında bulunabilmektedir.
- 55°C'de 1 saatte, 60°C'de 15-20 dakika inaktive olmaktadır.

Genel Bilgiler

- Karbonhidratlardan gaz ve asit oluştururlar. Yalnız laktoz ve sakkarozu fermente edemezler.
- *Salmonella* cinsi içinde yalnız insanlarda, yalnız hayvanlarda ve hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık yapan birçok serotip bulunmaktadır.
- Bunlardan ilk kez *Salmonella choleraesuis* 1886 yılında «Salmon» tarafından izole edilmiş, sonraları bu cinse «*Salmonella*» adı verilmiştir.



Salmonella spp.

Gıdalarda Bulunması

- *Salmonella*'ya genellikle koliform grup bakteriler tarafından yoğun düzeyde kontamine olmuş gıdalarda rastlanır.
- Klasik bir gıda enfeksiyonu olarak bilinen **Salmonellosis** etmeni *Salmonella*'ların gıda mikrobiyolojisindeki önemleri büyüktür.
- *Salmonella*'ların neden olduğu gastroenterit de ölümle sonuçlanabilir.

Gıdalarda Bulunması

- Mikrobiyal gıda zehirlenmeleri arasında dünyada en çok görülen hastalıklardan biri olan salmonellosisin sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 2-4 milyon kadar vakaya neden olduğu ve hastalık sayısının giderek arttığı tahmin edilmektedir.
- Gıda maddelerinde çok düşük düzeyde *Salmonella* bulunsa bile bunlar riskli olarak kabul edilir. Dolayısıyla gıda maddeleri, içme ve kullanma sularında **Salmonella bulunmasına izin verilmez.**

Gıdalarda Bulunması

- *Salmonella* 'nın en çok bulunduğu gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelir. Bunlar arasında kümes hayvanları eti, kıyma, sosisler, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süttozu ve krema *Salmonella* açısından önemli gıdalardır.
- Bunların yanında çeşitli soslar ve salatalar, pudingler, diğer süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalardır.
- Hammadde, işleme teknolojisi, depolama ve pazarlama şartları *Salmonella* riskinin büyümesine neden olmaktadır.

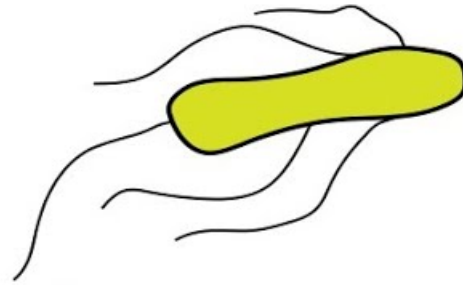
SALMONELLA

TYPHOIDAL

NON - TYPHOIDAL

common cause of food borne disease

Food Safety



lives in many animals



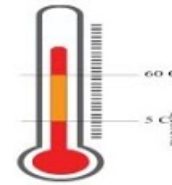
clean areas



*separate raw
and cooked*



*cook
thoroughly*



*safe
temperature*



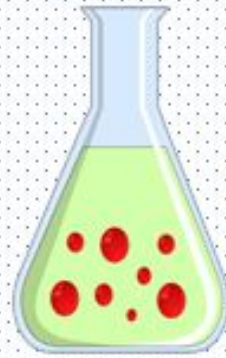
*clean
water*

Gıdalarda *Salmonella spp.* Aranması

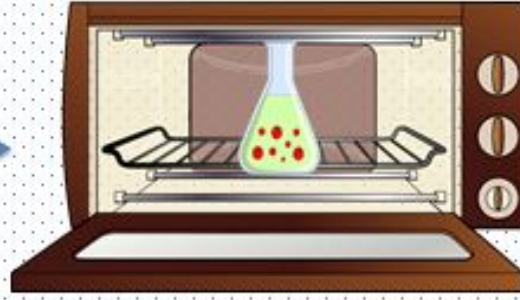
- Gıda maddelerinde *Salmonella* belirlenmesi genellikle klasik kültürel yöntemler ile yapılmaktadır.
- Bu yöntemlere ilaveten **membran filtrasyon** ve **enzim immunoassay yöntemleri** ile de *Salmonella* varlığı araştırılabilmektedir.
- Bunların yanında "**geliştirilmiş kültürel- enzimatik yöntemler**" olarak tanımlanan "**hızlı analiz yöntemleri**" üzerinde de son yıllarda büyük çalışmalar yapılmaktadır.
- Ancak bugün için yasal kuruluşlarca kabul edilen analiz yöntemleri çoğunlukla klasik kültürel yöntemlerdir.

Gıdalarda *Salmonella spp.* Aranması

- *Salmonella* 'nın klasik yöntemle tayininde
 1. önzenginleştirme,
 2. selektif zenginleştirme,
 3. selektif katı besiyerine sürme,
 4. biyokimyasal testler ve
 5. serolojik doğrulama aşamaları vardır ve bu tayin 7 gün sürmektedir.
- Bu yöntemde uygulamada görülen farklılıklar çeşitli kuruluşlar tarafından farklı besiyerleri ve farklı inkübasyon sıcaklıkları önerilmesinden kaynaklanmaktadır.



225 ml TPS
+
25 g örnek



Ön zenginleştirme
37 °C , 24 saat



Selektif zenginleştirme
RV Buyyon SC Buyyon
43 °C , 24 saat 37 °C , 24 saat



Çizme Yöntemiyle Ekim



XLD Agar

XLT-4 Agar

37 °C , 24 Saat İnkübasyon

Biyokimyasal
Testler



LSİ Agar TSİ Agar
37 °C , 24 Saat İnkübasyon

Ön Zenginleştirme

- Ön zenginleştirmenin başlıca fonksiyonu proses süresince dehidre olan hücrelerin rehidre olmasını ve hasar görmüş olan hücrelerin onarılmasını sağlamaktadır.
- 25 g ya da 25 mL örnek 225 mL önzenginleştirme besiyerine ilave edilir.
- Örnek sıvı ise (su, süt, peyniraltı suyu, yumurta vb.) çalkalanıp karıştırılarak doğrudan inkübasyona bırakılır.
- Örnek suda eriyebilir ise (şeker, süttozu, peyniraltı suyu tozu, krema, yumurta tozu vb.) önce eritilir sonra inkübasyona bırakılır. Gerekirse manyetik karıştırıcı kullanılır.

Ön Zenginleştirme

- Örnek katı ise (peynir, et ve et ürünleri vb.) steril blender gövdesine 25 g örnek alınır, üzerine 225 mL steril önzenginleştirme besiyerinden yaklaşık 150-200 mL aktarılır, homojenizasyondan sonra homojenizat steril 500 mL'lik erlene aktarılır.
- Kalan önzenginleştirme besiyeri (yaklaşık 50- 100 mL) ile blender gövdesi çalkalanır ve bu kısım da aseptik şartlar altında homojenizat olan erlene aktarılır.

Ön Zenginleştirme

- Önzenginleştirme besiyeri olarak tamponlanmış peptonlu su (Peptone Water) ve Salmosyst Broth kullanılmaktadır.
- Lactose Broth besiyeri ise yaygın kullanım alanı bulmamıştır.
- Tamponlanmış peptonlu su kullanıldığında inkübasyon 35-37°C' da 16-20 saat olarak yapılmaktadır.
- Yasal analizlerde önzenginleştirme besiyeri olarak tamponlanmış peptonlu su kullanılmaktadır.

Selektif Zenginleştirme

- Selektif zenginleştirme besiyerlerinde refakatçi bakteri türlerinin çoğalması sınırlanırken *Salmonella* hücrelerinin artışına izin verilir.
- Ön zenginleştirme işleminden sonra uygun bir selektif zenginleştirme besiyerine ekim yapılarak analize devam edilir.
- Selektif zenginleştirme amacı ile en yaygın kullanılan besiyerleri RVS Broth, Selenite Cystine Broth besiyerleri ve Salmosyst Selective Supplement' dir.

Selektif Zenginleştirme

- Standart analiz yönteminde 10 mL RVS Broth besiyerine 0,1 mL önzenginleştirme kültürü ve 100 mL Selenite Cystine Broth besiyerine 10 mL önzenginleştirme kültürü ilave edilip RVS Broth 42°C 'de 24 saat, Selenite Cystine Broth 35-37°C' de 48 saat inkübe edilir.
- Selenite Cystine Broth besiyeri selektiviteyi artırmak için 42°C'de de inkübe edilebilir ancak bu uygulama analiz raporunda belirtilmelidir.
- RVS Broth kültüründen 24 saatlik inkübasyon sonunda, Selenite Cystine Broth kültüründen ise 24 ve 48 saatlerde örnek alınarak selektif katı besiyerlerine sürme yapılır.



Uninoculated



Salmonella

RVS Broth



Uninoculated



Salmonella

Selenite Cystine Broth

Selektif Katı Besiyerine Sürme

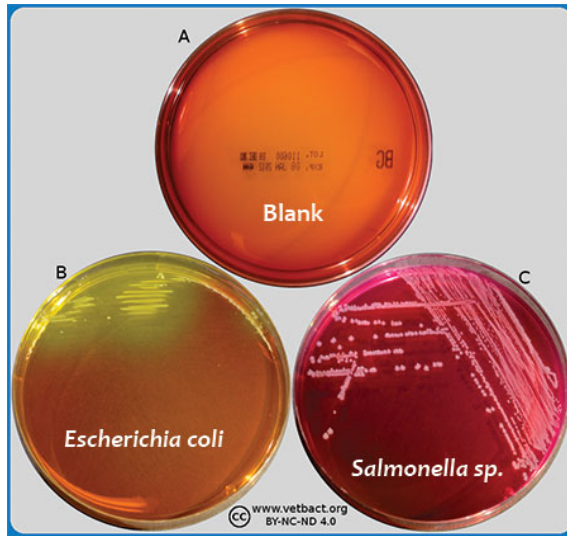
- Standart analizlerde selektif zenginleştirme kültürlerinden biri mutlaka Brilliant Green Phenol Red Agar olmak üzere 2 farklı selektif besiyeri kullanılması gerekmektedir.
- Diğer selektif zenginleştirme besiyeri analiz yapan laboratuvarın seçimine bırakılır.
- Bununla beraber Bismuth Sulfite Agar genellikle ikinci selektif besiyeri olarak kullanılır.

Selektif Katı Besiyerine Sürme

- Bunun dışında Rambach Agar, Hektoen Enteric Agar, Salmonella-Shigella (SS) Agar, Xylose Lysine Deoxycholate Agar besiyerleri de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.
- Son zamanlarda XLT₄ Agar besiyeri yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.
- Selektif katı besiyerine sürme işleminden sonra 35-37°C'de 24 saat, tipik koloni gelişmesi olmaz ise aynı sıcaklıkta 24 saat daha inkübasyon yapılır.
- Inkübasyon sonunda selektif katı besiyerine göre değişen morfolojilerdeki tipik *Salmonella* kolonileri izole edilip doğrulama için önce biyokimyasal test besiyerlerine ekilir.

Selektif Katı Besiyerine Sürme

- Prensip olarak her besiyerinden en az 5 adet tipik koloni biyokimyasal testler için izole edilir.
- Katı besiyerinde tipik koloni yoksa diğer kolonilerden 5 adet izole edilip yine biyokimyasal testler ile çalışmaya devam edilir.
- Bu testler izolat(lar)ın *Salmonella* olduğunu gösterirse serolojik doğrulama testleri yapılarak analiz tamamlanır.
- Hangi ön zenginleştirme veya selektif zenginleştirme veya selektif katı besiyerinden izole edilmiş olursa olsun 1 koloni dahi *Salmonella* olarak doğrulanırsa "**analiz edilen örnekte *Salmonella* bulundu**" şeklinde rapor verilir.



Brilliant Green Agar



**Bismuth sulphite
(BS)**

**Xylose lysine
desoxycholate
(XLD)**

**Hektoen
(HE)**

Biyokimyasal Testler ile Doğrulama

- **Üre Testi:** Bir öze dolusu koloni alınıp Urea Broth besiyerine inoküle edilir ve 35°C' da 48 saate kadar inkübe edilir.
- Bu işlem sırasında bir başka Urea Broth besiyerine pozitif kontrol olarak *Proteus*, bir başka besiyerine negatif kontrol olarak *E. coli* inoküle edilir, ayrıca bir tüp Urea Broth besiyeri şahit olarak kullanılır.
- Inkübasyon sonunda 4 tüpün rengi kontrol edilir. Şahit tüp sarımsı kırmızı renkte, pozitif kontrol kırmızı renkte, negatif kontrol sarı renkte olmalıdır.

Biyokimyasal Testler ile Doğrulama

- Asıl test tüpü kırmızı ise alınan koloni *Salmonella* değildir, analize son verilir. *Salmonella* üre negatif bir bakteridir.
- Besiyeri sarı renkli ise Triple Sugar Iron Agar Testi ile devam edilir.
- Zamandan kazanmak açısından çoğu kere üre testi sonucu beklenmeden aynı anda Urea Broth ve Triple Sugar Iron Agar besiyerlerine beraberce ekim yapılır. Ancak bu durumda da değerlendirme yine Urea Broth ile başlamalıdır.



Urea Broth Base (M111)

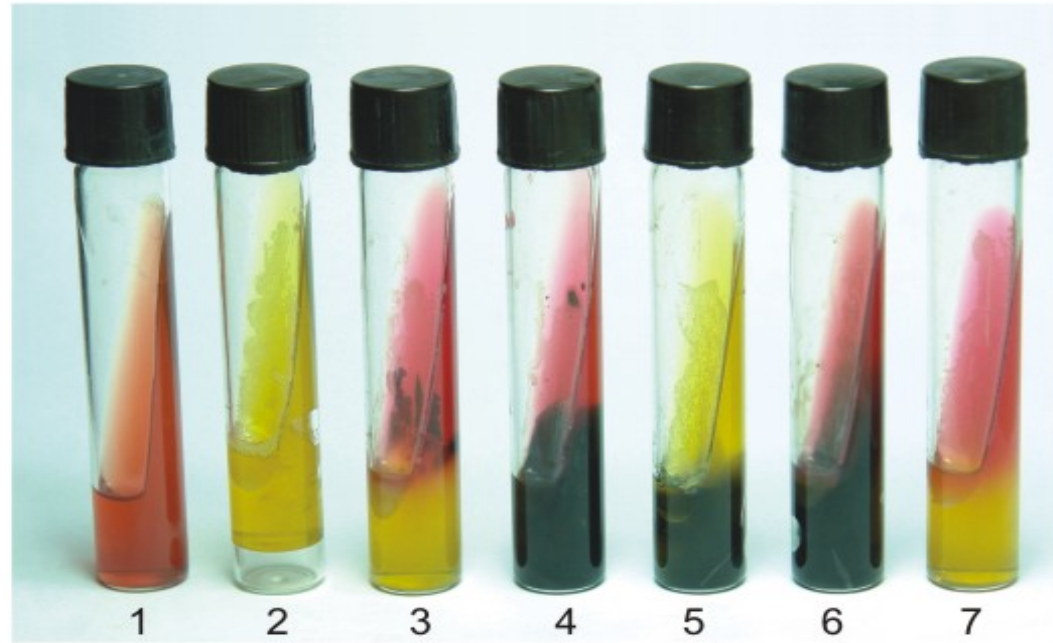
1. Control
2. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
3. *Escherichia coli* ATCC 25922
4. *Proteus vulgaris* ATCC 13315
5. *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028

Biyokimyasal Testler ile Doğrulama

- **Triple Sugar Iron Agar Testi:** Triple Sugar Iron Agar yatık besiyerine yüzeye sürme ve dibe daldırma yapılır.
- Bu amaçla aşı özesi ile besiyerinin yüzeyine sürme yapılır, aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. Daldırma işlemi bir defada tüpün merkezinden geçecek bir hat boyunca dibe kadar iğnenin sokulması ile yapılır.
- Besiyeri 35°C' de 48 saate kadar inkübe edilir. Ancak reaksiyon sonuçları 24 saat inkübasyon sonunda da izlenmelidir.

Biyokimyasal Testler ile Doğrulama

- Bu sürenin sonunda dip kısmın sarı (glukozun kullanımı) ve siyah olması (hidrojen sülfür oluşumu), yüzeyin kırmızı olması (laktoz ve sakkarozun kullanılmaması), besiyerinde gaz delikleri ve/veya yarıkları oluşması ve/veya besiyerinin dip kısmından yukarı doğru itilmesi (glukozdan gaz oluşması) *Salmonella* 'yı doğrular.
- Bazı hallerde siyah renk dipteki sarılığı örtecek kadar baskın olabilir. Bu durumda da kültür *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilir.
- *Salmonella* genel olarak glukoz pozitif, glukozdan gaz oluşturma pozitif, laktoz negatif, sakkaroz negatif ve hidrojen sülfür pozitif bir bakteridir.



Triple Sugar Iron Agar (M021)

1. Control
2. *Escherichia coli* ATCC 25922
3. *Salmonella Typhi* ATCC 6539
4. *Proteus vulgaris* ATCC 13315
5. *Citrobacter freundii* ATCC 8090
6. *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028
7. *Shigella flexneri* ATCC 12022

Videolar

- <https://www.youtube.com/watch?v=tjTPxS5yJOU>
- https://www.youtube.com/watch?v=as_kBbcW3iE
- <https://www.youtube.com/watch?v=nQxJnl9c1X4>
- <https://www.youtube.com/watch?v=tMWLFF33ctw>
- <https://www.youtube.com/watch?v=tE2IUyDrEVo>

Referanslar

- <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942122061.pdf>
- <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702050401.pdf>
- <https://gida.erciyes.edu.tr/upload/IVKSWT4mikrobiyoloji-5.pdf>
- <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/33800/10160311.pdf?sequence=1>
- https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/2400/mod_resource/content/1/GDM310%2002.pdf