



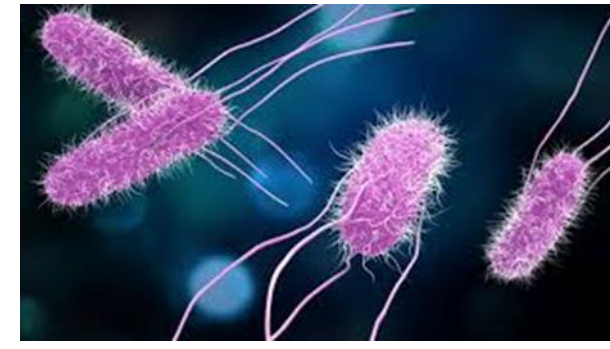
# Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvar Dersi

12.Hafta

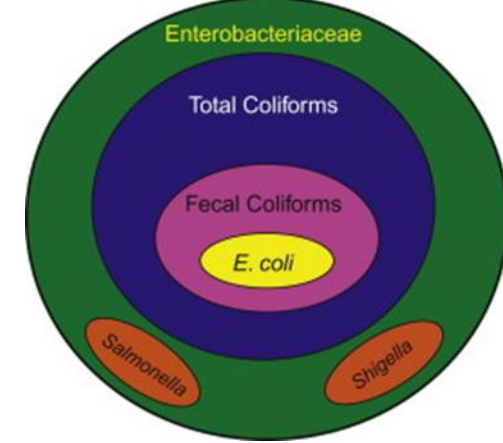
*Salmonella* Aranması

# SALMONELLA ARANMASI

## a. GENEL ÖZELLİKLER



- Enterobacteriaceae familyasına ait,
- **Gram negatif, spor oluşturmeyan, fakültatif anaerob, çubuk formunda** çoğu (S.pullorum, S.gallinarum ve S.arizona türleri hariç) peritrik flagellaları ile **hareketlidir**.
- 6 – 47 °C'ler arasında üreyebilmektedirler. Optimal üreme dereceleri 35 - 37 °C'dir. Soğuğa karşı çok dayanıklıdırlar. Buz içerisinde aylarca canlı kalabilirler.
- Optimal pH değeri 6.5 - 7.5'dir. Hatta pH 4.0 - 9.0 değerleri arasında da üreyebilmektedir.
- Su aktivitesi (aw değeri) 0.945-0.999 değerleri arasındadır. **% 8'lik** tuz konsantrasyonlarında bulunabilmektedir.



NOT: Salamuradaki tuz konsantrasyonu %12 ile %18 arasında iken beyaz peynirde %3-5 arasında olmalıdır.

# SALMONELLA ARANMASI

## Genel Özellikler



- Karbonhidratlardan gaz ve asit oluştururlar. **Yalnız laktoz ve sakkarozu fermente edemezler.**
- Sitrati tek karbon kaynağı olarak kullanırlar, H<sub>2</sub>S üretirler, lizin, ornithini kadaverin ve putresine dekarboksile ederler, oksidaz negatif, katalaz pozitifler, üreyi metabolize edemezler.

Not: Hidrojen sülfür, renksiz, çürük yumurta kokusunda zehirleyici bir gazdır.

# SALMONELLA ARANMASI

## Genel Özellikler



- 55 °C'de 1 saatte, 60 °C'de 15 - 20 dakika inaktive olmaktadır. 70 °C'de 10 - 15 dakika canlı kalabilmektedir.
- Başlıca gıda zehirlenmelerine *S.enteridis*, *S.typhimurium* ve *S.thyphi* yol açmaktadır.
- *S.enteritidis*'in  $10^6$  kob/g. miktarında alınması gıda zehirlenmesi yapması için yeterlidir.
- Salmonella'lar ise esasen insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinden bulaşmakta olup, dışkı ile bulaşan diğer kaynaklardan da gelmektedir.

# Yaptığı Hastalıklar ve Serotipleri



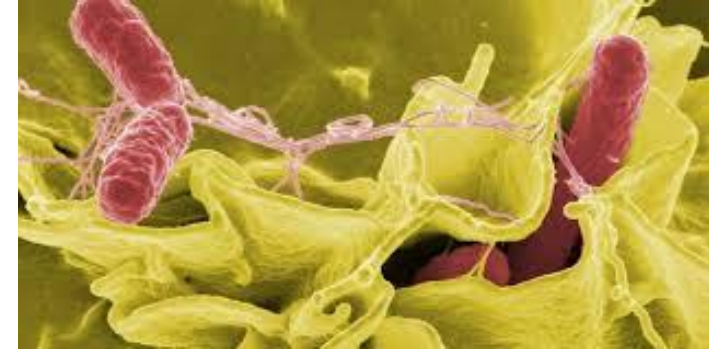
- Salmonella cinsinde 2000'nin üzerinde serotip (serovar) bulunmaktadır. İnsanlarda görülen salmonellozis iki adet klinik özellik gösterir.
- Birincisi *S. typhi* ve *S. paratyphi* A, B, C 'nin neden olduğu enterik ateştir. Bu enfeksiyonlar genellikle hayvanlara gerek kalmadan kişiden kişiye bulaşır.
- İkincisi tifoya neden olmayan salmonellozistir ve hayvanlarda bulunan diğer Salmonella serotiplerinin neden olduğu potansiyel zoonozdurlar.
- Tifoya neden olmayan Salmonella hayvanlarda ve insanlarda hastalıklara neden olur. Hayvanlar başlıca kaynaktır ve kişiden kişiye de yayılmasına rağmen hastalık genellikle gıda kaynaklıdır.
- Tifo ateşine ve diğer enterik ateşlere neden olan Salmonella ise dışkı ve ağız yoluyla kişiden kişiye bulaşır. Bu hastalık hayvansal kaynaklı olmayıp bu hastalığı asemptomatik insan taşıyıcıları yayar.

# Yaptığı Hastalıklar ve Serotipleri

- Salmonella türlerinin çoğu hayvanların sindirim kanalında yaşar ve hayvansal orijinli gıdalar vasıtasıyla insanlara nakledilir.
- Salmonella türleri iki hastalık oluşturur:
  - Tifo
  - Akut gastroenteritis

# Salmonella enterica Serovar Typhi—tifo

- Sadece insanlarda hastalık yapar
- Hasta kişilerin gıdaya teması, Kanalizasyon – Deniz ürünleri
  1. Çiğ yada yetersiz pişirilmiş ürünler
  2. Sindirim kanalı
  3. Bağırsak duvarına yerleşme
  4. Mezenterik lenf yumruları
  5. Çoğalma ve toksin üretimi
  6. Kan dolaşıma karışma ve hastalık
- Belirtiler : Yüksek ve kalıcı ateş, keyifsizlik, baş ağrısı, düşkünlük, karın ağrısı, bulantı, kusma, terleme, titreme, diare



# Salmonella (non-typhoid)



- Salmonella (non-typhoid) Bakteriyel gastroenteritis'in en önemli sebebidir (kusma, karın ağrısı, ishal, ateş)
- 2000 civarında serotipi hepsi patojen kabul edilir.
- Gıda zehirlenmelerinden daha çok *Salmonella Typhimurium* - *S. Enteritidis* serotipleri sorumludur. *S. Typhimurium* (mrDT104) Ampisilin, Kloramfenikol, Streptomisin, Sülfanamidler, Tetrasiklin başta olmak üzere çok sayıda antibiyotiğe dirençlidir.
- *S. Enteritidis*, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* A, B, C'nin insanlarda salmonella enfeksiyonlarına neden olan serotiplerin % 99'unu oluşturduğu belirtilmektedir.



# Salmonella Aranması Kontamine Kaynakları



- Hayvansal gıdalar içerisinde; kontamine kanatlı hayvan etleri ve bunlardan yapılan ürünler, et ve et ürünleri, yumurta, yumurtadan yapılan ürünler, pastacılık ürünleri kontamine süt, krema, dondurma ve soslar ile kabuklu deniz ürünleri, çoğu insanda Salmonella infeksiyonlarına neden olan en önemli gıda kaynakları oluştururlar.



# Salmonella Aranması Kontamine Kaynakları



- Gıda kaynaklı Salmonella enfeksiyonları ve gastroenteritislerin yurtdışında halen daha büyük bir dikkatle takip edildiği, değerlendirildiği ve rapor edildiği görülmektedir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İngiltere, Belçika, Fransa ve Kanada'da yapılan çalışmalar, gıda kaynaklı Salmonella enfeksiyonları ve gastroenteritis vakalarının son yıllarda artış gösterdiğini ortaya koymaktadır.

- Broilerler (etlik piliç) ise enfeksiyon ve gastroenteritise neden olan önemli bir Salmonella kaynağı olarak dikkat çekmektedirler.



# İzolasyonu ve Tanımlanması

- Gıda kaynaklı patojenik ve toksijenik mikroorganizmalar ile bunların insanda neden olduğu enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar konusunda sağlıklı veriler toplanmasının ilk aşamasını, bu mikroorganizmaların gıdalardan veya insan örneklerinden izolasyonu ve tanımlanması oluşturur. Bu bakımdan şüpheli örneklerden etken olan mikroorganizmanın izolasyonu ve tanımlanması amacıyla yararlanılan yöntemler üzerinde titizlikle durulması ve bu yöntemlerin ihtiyaçlara göre sürekli yenilenmesi ve iyileştirilmesi yönünde çabalar sarf edilmesi gerekli görülmektedir.

# İzolasyonu ve Tanımlanması

- Gıdalarda Salmonella belirlenmesi; günümüzde temelde klinik örnekler için başvuru kültürel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Ancak gıdalardaki Salmonella 'ların belirlenmesinde klinik  rneklerdekine göre daha büyük güçlüklerle karşılaşılabilmektedir.
- Çünkü kontamine olmuş gıdalarda bulunan patojenlerin miktarları genellikle klinik  rneklerdekinden daha azdır.
- Bunun da ötesinde bir çok mikroorganizma uygulanan teknoloji veya muhafaza yöntemi gereği hasara uğrayabilmektedir. Bu tür gıdalarda hasara uğramış düşük miktardaki Salmonella 'yı belirlemek ise oldukça güçtür. Hasar görmüş mikroorganizmaya selektif kültürel zenginleştirme ve izolasyon işlemleri uygulanması gerekli görülmektedir. Diğer taraftan; yumurta albumini, kakao ve baharat gibi kimi gıdalar Salmonella belirlenmesini güçleştiren özelliklere sahiptirler. Bu nedenle bu tip gıdalar için kültürel yöntemlerin uygulanmasında bazı işlem modifikasyonlarının yapılması zorunlu hale gelmiştir.

- Genel olarak; patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla kullanılan analiz yöntemlerinin bazı temel niteliklere sahip olması istenir. Bunlar; analizlerin kısa sürede tamamlanması (zaman faktörü), ucuz olması (maliyet faktörü), spesifik olması 3 (duyarlılık faktörü), doğru sonuç vermesi (doğruluk faktörü), kolay uygulanabilir olması, kalifiye eleman ve alet-ekipman gereksiniminin fazla olmaması şeklinde sıralanabilir.
- Günümüzde gıdalardan Salmonella 'nın izolasyonu ve tanımlanması için; klasik kültürel, immünolojik, iletkenlik, empedans, DNA-DNA hibridizasyon ve DNA ampifikasyon gibi farklı analiz yöntemlerinden yararlanılabilmektedir. İmmunomagnetik ayırma (IMA), enzime bağlı antikor-hidrofobik grid membran filtre (enzyme linked antibody hydrophobic grid membrane filter) ve IMA-PZR gibi kompleks metotlar da kullanılmaktadır

# Hızlı Sistemler

- Gıdalarda *Salmonella* serotiplerinin belirlenmesi için piyasada en az 15-20 adet ticari hızlı test sistemi bulunmaktadır. Bu testlerin değişik gıda örneklerindeki performansları ise oldukça farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca kabul gören hızlı testlerde sadece negatif sonuçlar kesindir. Pozitif olduğu tahmin edilen sonuçların ise standart yöntemlerle mutlaka doğrulanması gerekmektedir. Bütün bunların yanı sıra hızlı yöntemlerin başlangıç aşamasında çoğunlukla bir kültürel zenginleştirme aşamasına ihtiyaç duyması diğer bir dezavantaj olarak kabul edilmektedir.

# Hızlı Sistemler

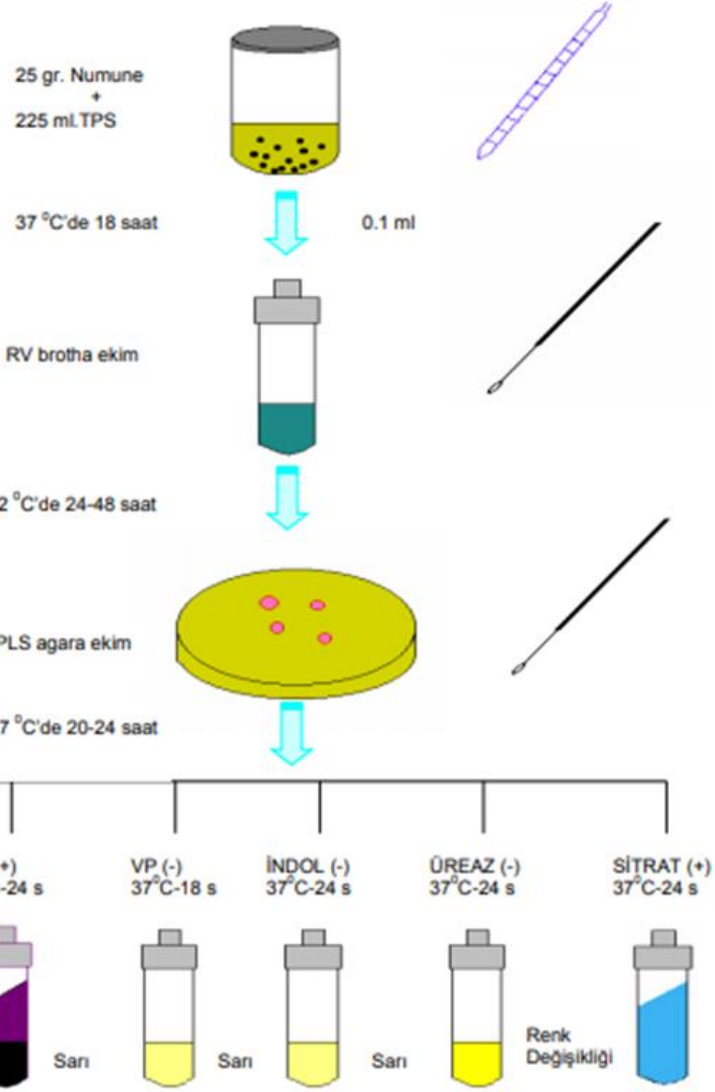
- Ön zenginleştirme yapılmayan dışkı örneklerinde **PZR** ile belirleme limiti 105 /g iken
- Aynı şekilde DNA hibridizasyon (DNAH) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile Salmonella için ortamda en az  $10^7$ /mL
- DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile ortamda  $10^8$ /mL , fluorescent antibody (FA)- microcolony yöntemi ile ortamda  $10^5$  - $10^6$  /mL (77)
- enzyme-linked immunosorbent 5 assay (ELISA) yöntemi ile ortamda  $10^4$  - $10^7$  /mL Salmonella 'nın belirlenebildiği bulunmuştur.
  - ✓ Hızlı yöntemler sahip oldukları dezavantajlar da dikkate alınarak ilgili resmi kurumlar tarafından hemen kabul edilip uygulamaya konulmamaktadır. Bunun doğal sonucu olarak da gıdalarda patojen mikroorganizmaların izolasyon ve tanımlanmasında büyük ölçüde kültürel yöntemlerden yararlanılmaktadır

# Klasik Kültürel Yöntemler

- Türk Standartları Enstitüsü'nün **TS 7438 nolu** "Salmonella Aranması Metotlarında Genel Kurallar" standardında da klasik kültürel yöntem tarif edilmektedir. Bu standart yöntem International Standard Organization (ISO) 6579'da tarif edilen yöntemi temel almaktadır.
- Salmonella 'ların gıdalardan izolasyonu ve tanımlanmasında yararlanılan klasik kültürel yöntemlerin uygulanması ve bu yöntemlerle gerçek ve doğru sonuçlar alınmasında bazı güçlükler ve olumsuzluklarla karşılaşılabilir. Bunlar klasik kültürel yöntemlerdeki işlem aşamaları dikkate alınarak aşağıdaki şekilde sıralanabilir.



## Klasik Kültürel Yöntem Aşamaları



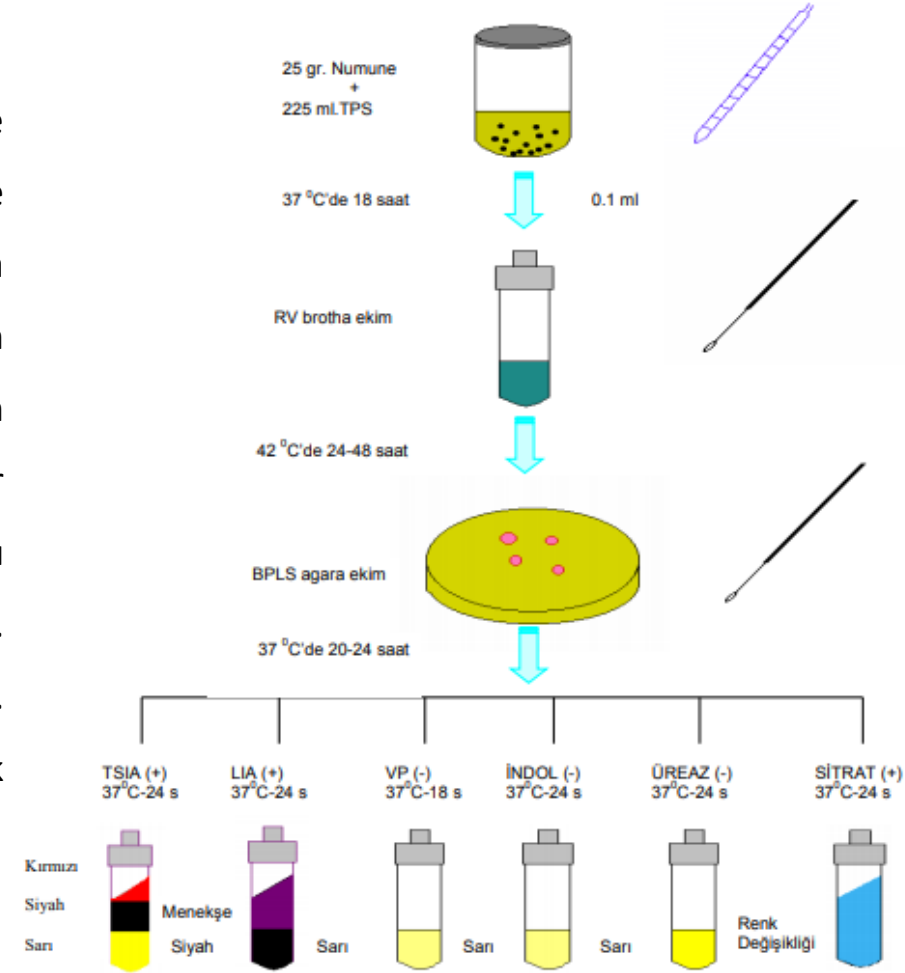
Salmonella 'nın belirlenmesindeki klasik kültürel yöntemler genellikle;

- Önzenginleştirme (16-20 saat),
- Selektif zenginleştirme (24-48 saat),
- Selektif katı besiyerlerinde izolasyon (24-48 saat),
- Biyokimyasal tanımlama ve şüpheli kolonilerin serolojik doğrulanması (48-72 saat) basamaklarından oluşur.

# Klasik Kültürel Yöntemler

## 1.Önzenginleştirme aşaması

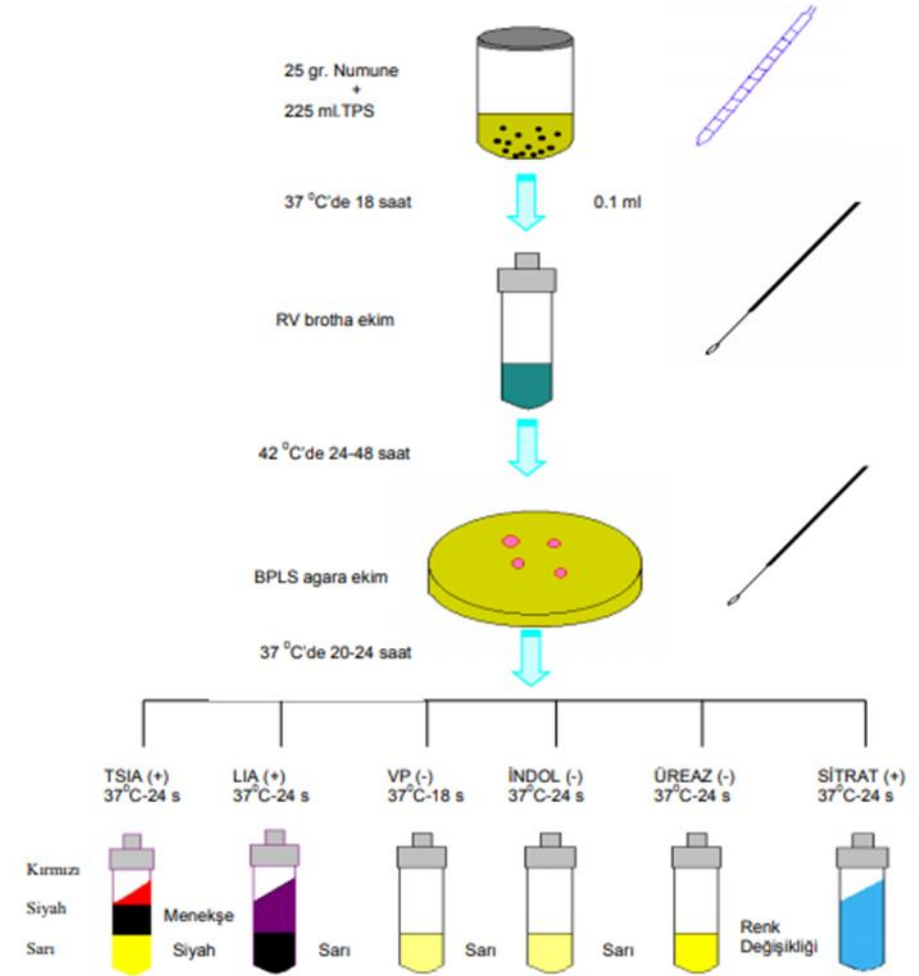
- İncelenen gıda çok düşük sayıda Salmonella içerebilir. Bu nedenle de besiyerleri ve kullanıldığı yöntemler gıdalarda düşük sayıda bulunan Salmonella hücrelerini inhibe etmeyecek niteliğe sahip olmalıdır. Diğer taraftan söz konusu gıdada bulunan Salmonella hücreleri gıdaya uygulanan dondurma, ısıl işlem, koruyucu olarak antimikrobiyal ajanların eklenmesi ve soğukta saklama gibi gıdalardaki patojenleri kontrol altına almayı amaçlayan işlemler sırasında veya gıdanın bileşiminde yer alan doğal bazı inhibitör etkili maddeler nedeniyle tamamen inaktive olabilir ya da hasara uğrayabilirler. Hasar görmüş hücreler aynı gıdada sayıca çok daha fazla olan rekabetçi mikroorganizmalar ile bir arada da bulunabilirler. Hasar görmüş hücrelerin belirlenmesi ise gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır . Bu sebeplerden dolayı kültürel işlemler Salmonella hücrelerini onaracak ve canlandıracak özellik taşımalı ve ayrıca rekabetçi florayı inhibe edici özelliklere sahip olmalıdır.



# Klasik Kültürel Yöntemler

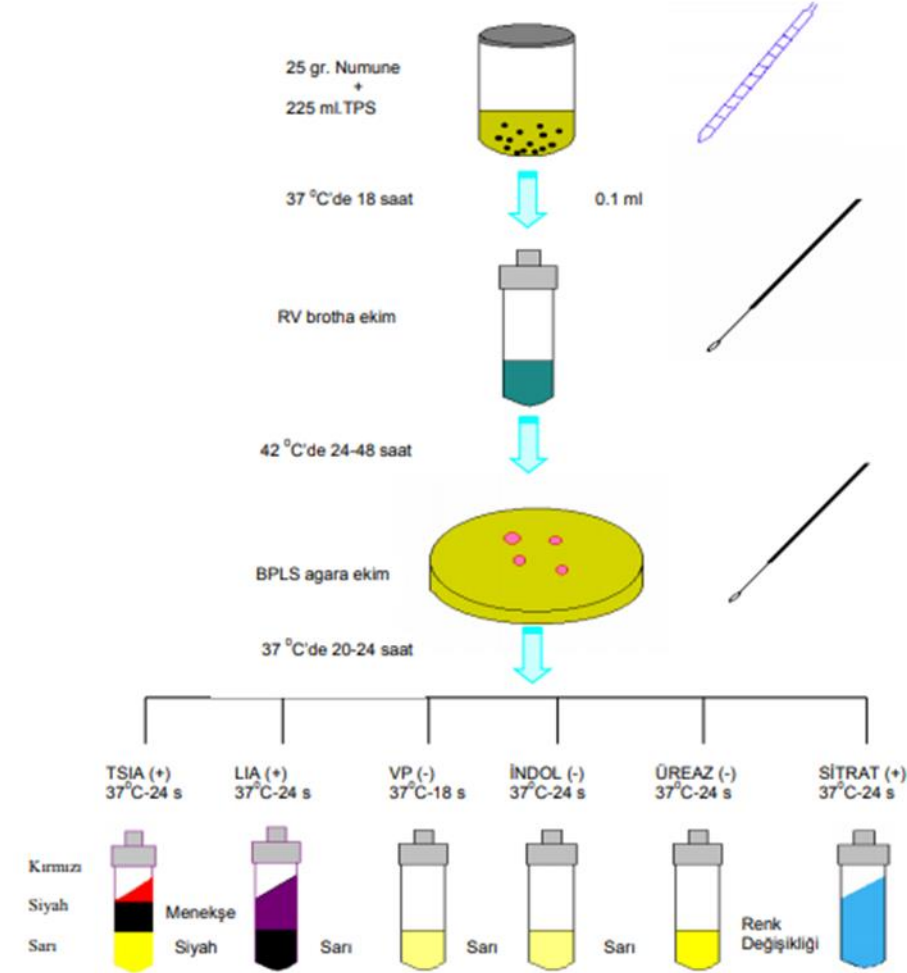
## 1.Önzenginleştirme aşaması

- Gelen numuneden 25 gram alınarak 225 ml. tamponlanmış peptonlu su (TPS) içinde homojenize hale getirilerek 37 °C'de 16 - 20 saat ( $\approx$ 18 saat) inkübe edilir.
- önzenginleştirme besiyeri olan Salmonella Enrichment broth (SEB) ve Universal Pre-enrichment broth (UB)
- TPS içine ferrioksamine E eklenmesi Salmonella hareketini arttırarak yarı katı Modified Rappaport-Vassiliadis agar (MRVA) besiyerinde daha iyi sonuç elde edilmesini sağlamaktadır.



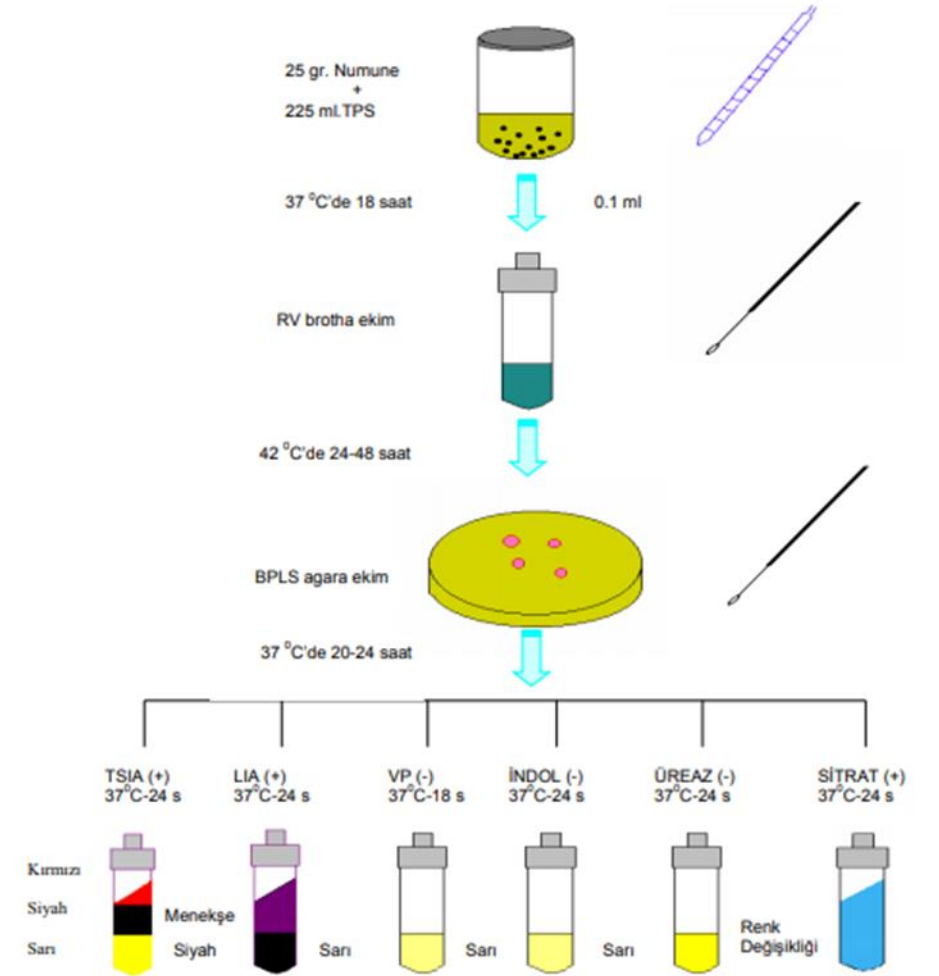
## 2. Selektif Zenginleştirme

- Selektif zenginleştirme basamağının amacı; gıdada bulunan diğer rekabetçi mikroorganizmaların üremesini engellerken Salmonella popülasyonunu arttırmaktır. Bu amaçla; safra tuzu, tetrathionate, sodum selenite ve brilliant green veya malaşit yeşili gibi inhibitörlerden yararlanılmaktadır. Bu inhibitörler selektif zenginleştirme besiyerlerinin bileşiminde iki veya daha fazla sayıda kombine şekilde yer almaktadır. Bu inhibitörlerin yanı sıra besiyerlerine inhibitör olarak novobiyosin gibi antibiyotikler de eklenebilmektedir. Diğer taraftan inhibitör ajanlarının aktivitesi inkübasyon sıcaklıklarında yapılan modifikasyonlarla da arttırılabilmektedir. Örneğin bu amaçla gerçekleştirilen bazı çalışmalarda 41-43 °C gibi yüksek sıcaklıklardaki inkübasyonların olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir.



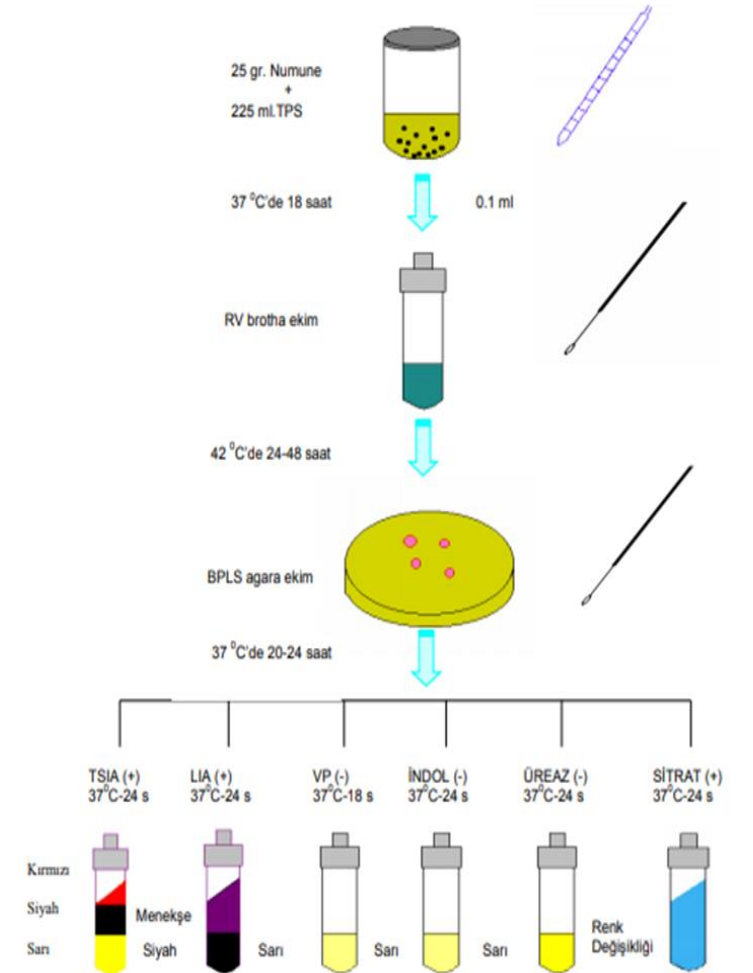
## 2. Selektif Zenginleştirme

- Selektif Zenginleştirme: Rappaport Vassiliadis (RV) broth'a öze ile TPS'den geçilerek 42 °C'de 24 - 48 saat inkübe edilir. İkinci zenginleştirme besiyeri olarak selenit/sistin besiyeri kullanılabilir.
- Bu besiyeri kullanıldığında ön zenginleştirme besiyerinden 10 ml alınarak aktarılır ve işleme devam edilir.



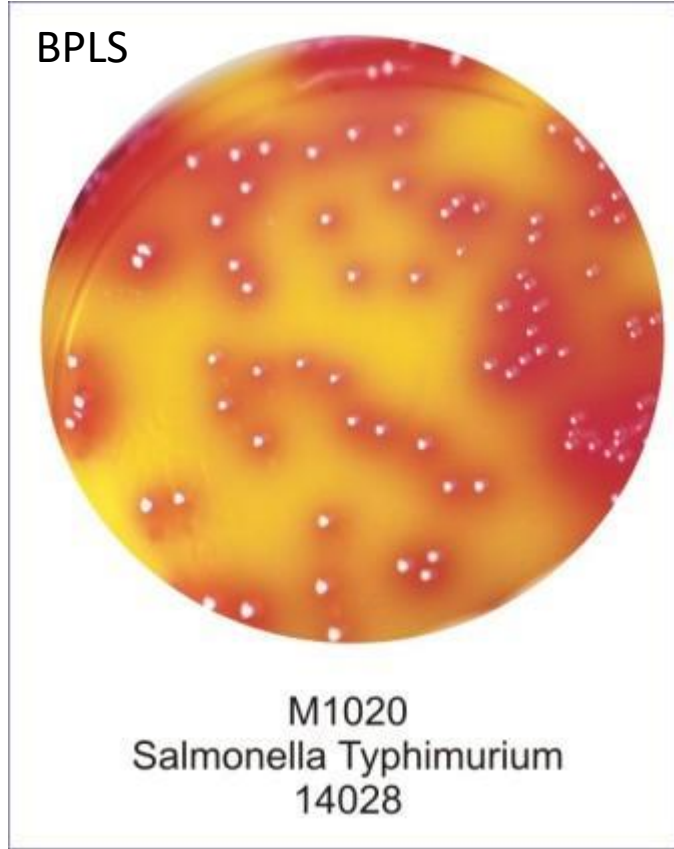
# 3. İzolasyon aşaması

- Klasik yöntemlerle gıdalardan Salmonella izolasyonunda kullanılan ve bileşiminde brilliant green ve safra tuzları gibi selektivite ajanları bulunan selektif katı besiyerlerinin bileşimine selektiviteyi artırmak ve rekabetçi flora üyelerinin gelişimini engellemek amacıyla diğer bazı inhibitörler de eklenebilmektedir. Diğer taraftan, izolasyon aşamasında selektiviteyi sağlamak amacıyla inkübasyon koşullarında bazı modifikasyonların denendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Selektif katı besiyerlerinin bileşimine nitrofurantoin (% 0,0015), tergitol-4 veya novobiyosin (12,5-15 mg/L) gibi selektivite ajanlarının eklenmesi ve bu besiyerlerinin 42 °C'de inkübasyonunun; *E. cloacae* ve *Cit. freundii* gibi Salmonella izolasyonunda yanlış pozitif sonuçlar veren Enterobacteriaceae familyasına ait diğer bakterilerin inhibisyonuna yardım ettiği bildirilmektedir.



# 3. İzolasyon aşaması

- Salmonella türlerini diğer Enterobacteriaceae üyelerinden ayırmak için kullanılan en az 8 adet selektif katı besiyeri vardır. Bu besiyerlerinin çoğu laktoz fermentasyonu ve hidrojen sülfür üretimine dayalı değişik konsantrasyonlarda inhibitör maddeler içeren besiyerleridir.



*Escherichia coli*



*Salmonella*



*Shigella*

- BPLS (Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose)
- XLD (Xylose Lysine Desoksikolat Agar)
- SS ( Salmonella Shigella) Agar

*Salmonella*  
*Typhimurium*  
on  
XLD agar.



# 4.Tanımlama aşaması

- Salmonella spp.'nin Enterobacteriaceae familyasına ait diğer türlerden ayrılıp tanımlanması için biyokimyasal özelliklerinden bir kaçının birlikte test edilmesi gerekmektedir. Çünkü tek bir biyokimyasal özellik Salmonella 'nın belirlenmesi için yeterli olamamaktadır.
- Bu amaçla SS, XLD, BPLS besiyerinden izolasyonun gerçekleştirilen kültürleri identifikasyonu amacı ile aşağıda belirtilen biyokimyasal testler uygulanır;
  - a. TSIA Testi
  - b. LIA Testi
  - c. VP Testi
  - d. İndol Testi
  - e. Üreaz Testi
  - f. Sitrat Testi



# 4.Tanımlama aşaması

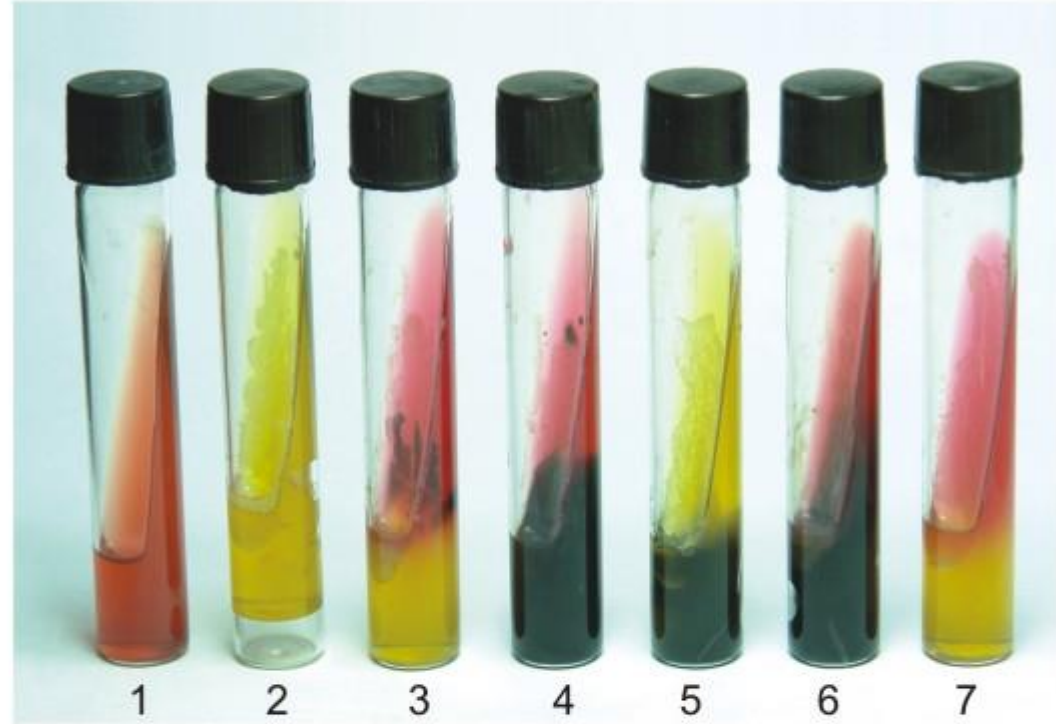
## a.TSIA Testi

- TSIA (Triple Sugar Iron Agar) yatık agara ekim yapılır ve 37 0C'de 24 saat inkübe edilir. Dip kısmının sarı, yatık kısmının kırmızı olması pozitiftir. Ayrıca orta kısımda meydana gelebilecek siyahlaşmada dikkate alınmalıdır.

**H<sub>2</sub>S-NEGATIVE:**  
no black precipitate formed



**H<sub>2</sub>S-POSITIVE:**  
black precipitate formed



### 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

## 4.Tanımlama aşaması

### b. LIA Testi

- LIA (Lysine Iron Agar) yatık agara ekim yapılır ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilir. Rengin değişmemesi (menekşe rengi) ve siyahlaşma olması pozitifdir.



### **Lysine Iron Agar (M377)**

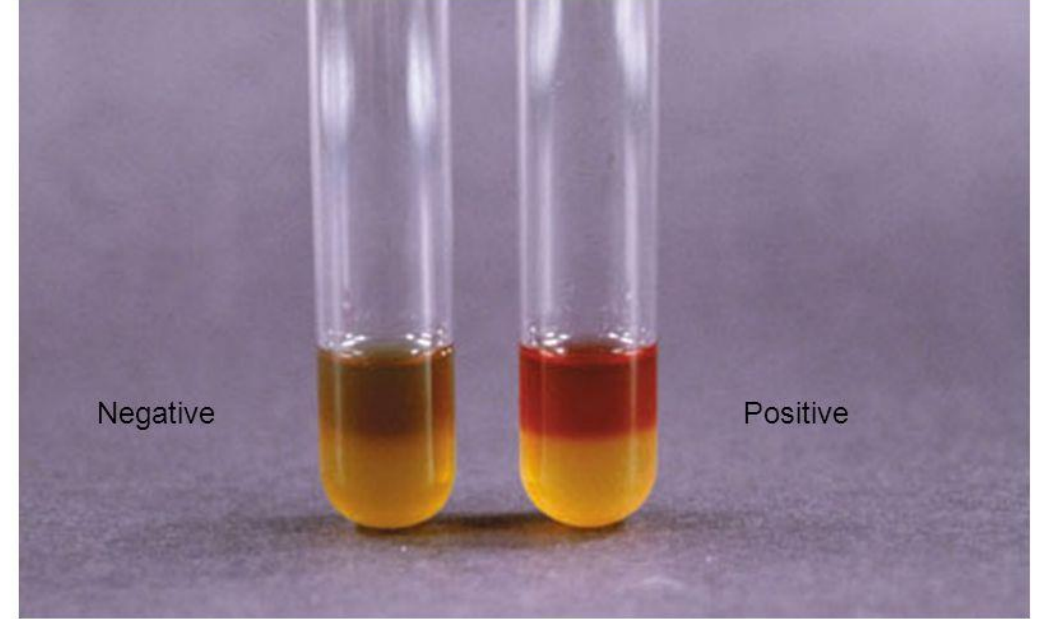
1. Control
2. Escherichia coli ATCC 25922
3. Citrobacter freundii ATCC 8090
4. Proteus mirabilis ATCC 25933
5. Salmonella Typhimurium ATCC 14028

# 4.Tanımlama aşaması

## c.VP Testi

- VP (Voges Proskauer )brotha ekim yapılır ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilir. Ayraçların ilavesi ile kırmızı renk meydana gelmemesi negatiftir.

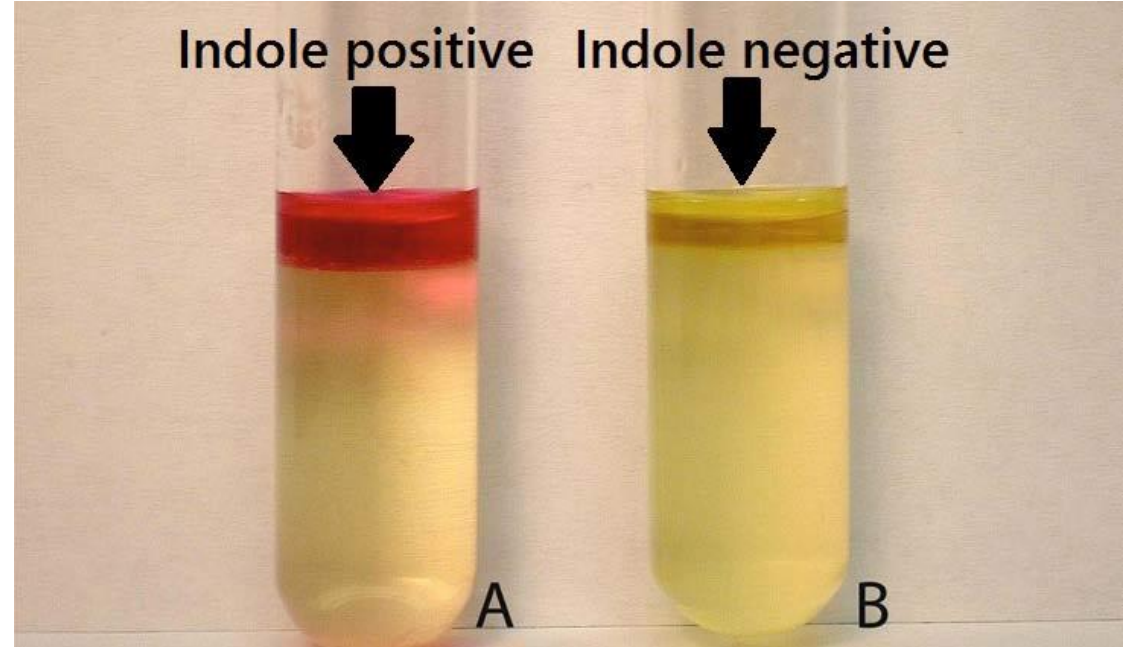
## VP Test



# 4.Tanımlama aşaması

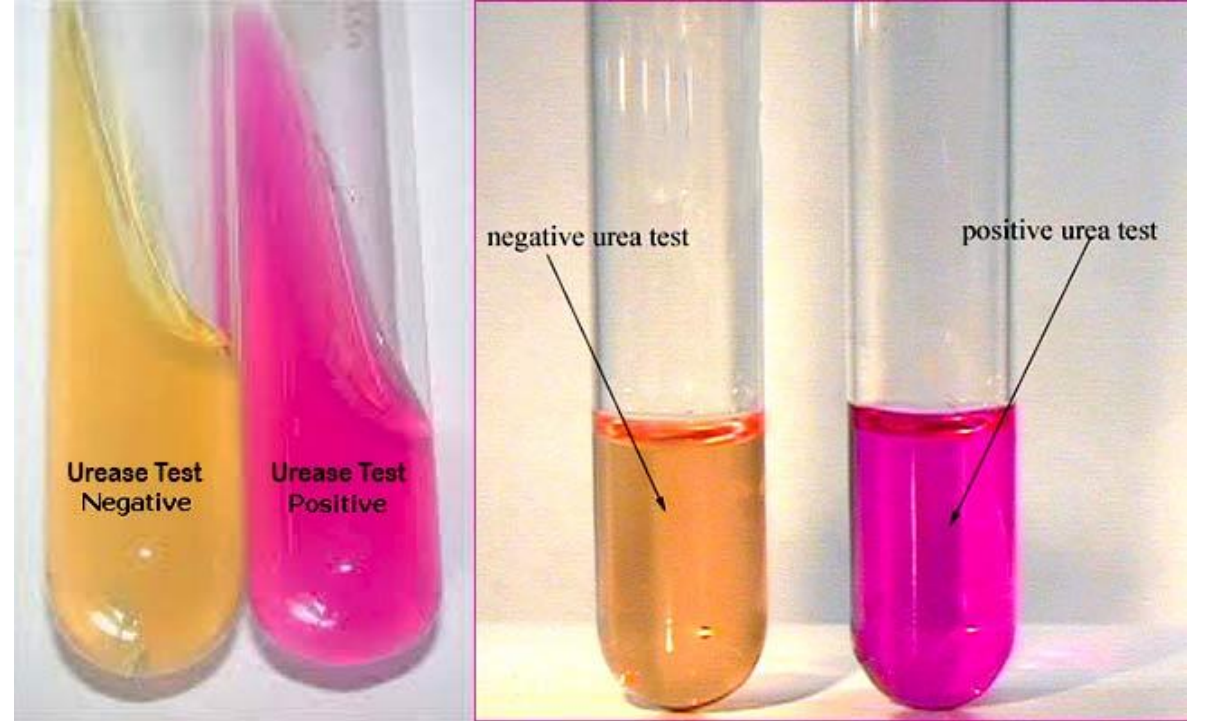
## d.İndol Testi

- İndol brotha ekim yapılır ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilir. İndolde Kovacs ayıracı ile reaksiyonda menekşe renginde halka oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.



## 4.Tanımlama aşaması e.Üreaz Testi

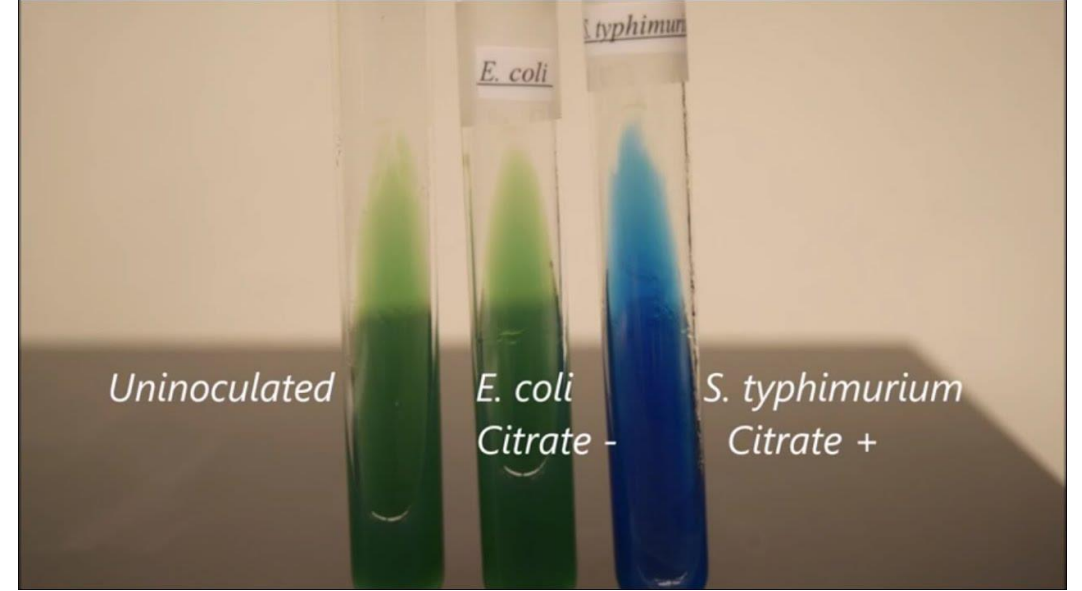
- Üre broth'a ekim yapılır ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilir. Test tüpünde kırmızı renk oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.



# 4.Tanımlama aşaması

## f. Sitrat Testi

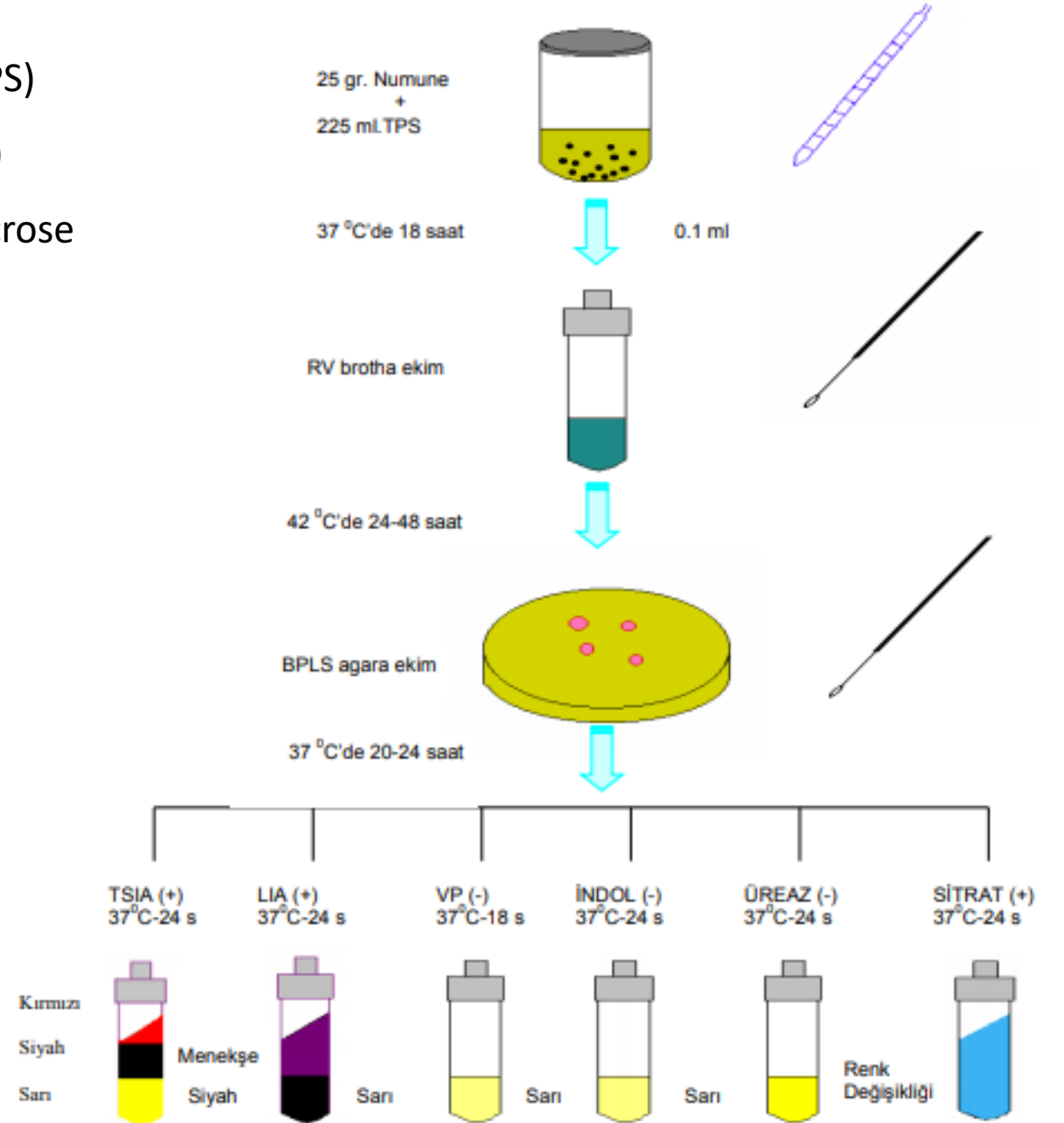
- Sitrat yatık agara ekim yapılır ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilir. Renk değişikliği pozitif olarak değerlendirilir.



- (1) **Ön Zenginleştirme:** tamponlanmış peptonlu su (TPS)
- (2) **Selektif Zenginleştirme:** Rappaport Vassiliadis (RV)
- (3) **İzolasyon:** Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose (BPLS), XLD, SS Agar'a

(4) **Biyokimyasal testler :**

- TSIA Testi +
- LIA Testi +
- VP Testi -
- İndol Testi -
- Üreaz Testi -
- Sitrat Testi +



# Kültürel yöntemlerin en önemli dezavantajı

- Sonuçlandırılması için oldukça uzun bir süreye gereksinim duyulmasıdır. Salmonella 'nın belirlenmesindeki klasik kültürel yöntemler genellikle
  - Ön zenginleştirme (16-20 saat),
  - selektif zenginleştirme (24-48 saat),
  - selektif katı besiyerlerinde izolasyon (24-48 saat),
  - biyokimyasal tanımlama ve şüpheli kolonilerin serolojik doğrulanması (48-72 saat) basamaklarından oluşur.
- Bu nedenle gıdalardan klasik kültürel yöntemlerle Salmonella izolasyonu ve tanımlanması için en az 5-7 güne ihtiyaç vardır . Sonuçların bu kadar uzun sürede alınması gıdanın mikrobiyolojik kalitesi ve tüketime uygun olup olmadığı hakkında karar verilmesini geciktirmekte bu da çoğu zaman gıdanın kesin belirleme yapılmaksızın tüketime sunulmasına neden olmaktadır. Bu durum gıdanın işleme ve depolanmasında ekstra harcamalar, ithalat ve ihracatta karşılaşılan güçlüklerden dolayı hem ekonomik hem de tüketici sağlığı açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bütün bunlara bağlı olarak da gıdalarda Salmonella belirlenmesi için hızlı yöntemler geliştirme çabalarının arttığı gözlenmektedir.