

**Floresanlı Yerde Hibritleme (FISH) Yöntemi ile Bazı
İndikatör ve Patojen Bakterilerin Çiğ Kanatlı Etlerinde ve
Kıymada Saptanması**

Proje No: 107O690

Dr. Ayşe Handan BAYSAL (Yürütücü)
Prof.Dr. Orhan INCE (Danışman)

MART 2010
İZMİR

ÖNSÖZ

Gıda sanayiinde hammaddelerde, son ürünlerde, üretim sırasında proses kontrolü, temizlik ve hijyen uygulamaları sırasında muhtemel patojen bulunma olasılığı üzerine yeterli bilgiyi sağlamak ve üretim sırasında gerekli müdahalelerin yapılabilmesi için daha hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç vardır. Son yıllarda birçok araştırma ve geliştirme çalışmaları test süresini azaltabilen ve mikrobiyolojik yöntemi basitleştiren alternatif yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Floresanlı yerinde hibritleme (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH), mikroorganizmaların nükleik asit dizilerine özgül, floresan işaretli DNA problrarı ile hedefin işaretlenmesi ve floresan mikroskobunda görüntülenmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemle ilgili olarak sürdürülen çalışmalar çoğunlukla klinik örnekler üzerinde yapılmakla birlikte yöntemin gıda mikrobiyolojisinde de kullanılabilirliği araştırmalarla saptanmaya çalışılmaktadır.

TÜBİTAK Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu (TOVAG) grubu tarafından desteklenen bu çalışmada; Gıda güvenliği ve sanitasyon indeksi olarak kullanılan indikatör mikroorganizma (*Escherichia coli*) ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenlerin (*Salmonella* ve *Listeria* türleri) İzmir'de satışa sunulan tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti ve kıymada saptanması için floresanlı yerinde hibritleme yönteminin (FISH) kullanım olanağı araştırılmıştır. Çalışma 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada söz konusu indikatör ve patojen mikroorganizmaların kıyma örneğine inokülasyonu yapıldıktan sonra geleneksel yöntemlerle ve FISH tekniği ile sayım yapılmış ve ikinci aşamada ise piyasadan satın alınan örneklerde söz konusu mikroorganizmalar geleneksel yöntemlerle ve FISH tekniği ile saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslanarak yöntemin uygulanabilirliği belirlenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER	3
TABLolar LİSTESİ	4
ŞEKİLLER LİSTESİ	5
EKLER LİSTESİ	6
ÖZET	7
ABSTRACT	8
GİRİŞ	9
GENEL BİLGİLER	10
GEREÇ ve YÖNTEM	18
1. GEREÇ	18
1.1. Referans Bakteri Kültürleri	18
1.2. Gıda Örnekleri	18
1.3. Çözelti ve Besiyerleri	18
1.4. Bakteri Problemleri	18
1.5. Epifloresan Mikroskop	19
2. YÖNTEM	19
2.1. Deneme Planı	19
2.2. İnokülasyon Yapılmadan Önce Örneklere Uygulanan Kültürel Mikrobiyolojik Analizler	20
2.2.1. Toplam Canlı Sayımı	20
2.2.2. Koliform sayımı	20
2.2.3. <i>Enterobacteriaceae</i> sayımı	20
2.2.4. <i>E. coli</i> aranması/sayımı	20
2.2.5. <i>Salmonella</i> türlerinin aranması	20
2.2.6. <i>Listeria</i> türlerinin aranması	20
2.3. İnokülasyon Yapıldıktan Sonra Örneklere Uygulanan Kültürel Mikrobiyolojik Analizler	21
2.4. İnokulum Hazırlanması ve Gıdalara İnokülasyon	21
2.5. FISH Yöntemi	21
2.5.1. Örnek Alma	22
2.5.2. Fiksasyon	22
2.5.2.1. PFA Fiksasyonu	22
2.5.2.2. ETOH Fiksasyonu	23
2.5.3. Hibridizasyon	23
2.5.4. Yıkama	23
2.5.5. Görüntü Alma	23
BULGULAR VE TARTIŞMA	23
SONUÇ	41
REFERANS	42
EKLER	
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Kültüre dayalı ve kültürel olmayan mikrobiyal yöntemlerin avantaj ve dezavantajları	14
Tablo 2. Farklı hibridizasyon sıklığı (stringency) elde etmek için kullanılan hibridizasyon tamponu bileşimi	16
Tablo 3. Farklı yıkama sıklığı (stringency) elde etmek için kullanılan yıkama tamponu Bileşimi	16
Tablo 4. Gıda kaynaklı mikroorganizmaların saptanmasında kullanılan bazı problemler ve Özellikleri	17
Tablo 5. Çalışmada kullanılan referans bakteri kültürleri	18
Tablo 6. Sentezlenen problemlerin isimleri ve sekansları	19
Tablo 7. Deneylerde kullanılan mikroorganizma, gıda örnekleri, inokulum seviyesi ve sayım Yöntemleri	19
Tablo 8. İnokülasyon yapılmadan önce tavuk/hindi fileto ve kıyma örneklerine uygulanan geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analizler	20
Tablo 9. Yoğunluk ölçerde McFarland standardına karşılık gelen hücre yoğunluğu	21
Tablo 10. İnokülasyon yapılmadan önce tavuk/hindi fileto ve kıyma örneklerine uygulanan geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz sonuçları	27
Tablo 11. Çiğ kanatlı etleri için mikrobiyolojik kriterler	27
Tablo 12. Çiğ kırmızı et ve kıyma için mikrobiyolojik kriterler	27
Tablo 13. İnokülasyon yapıldıktan sonra tavuk fileto örneklerine uygulanan geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçları	28
Tablo 14. İnokülasyon yapıldıktan sonra hindi fileto örneklerine uygulanan geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçları	28
Tablo 15. İnokülasyon yapıldıktan sonra kıyma örneklerine uygulanan geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçları	29
Tablo 16. Denemelerde kullanılan bakterilere problemlerin özgüllüğü (specificity)	29
Tablo 17. Denemelerde kullanılan FISH koşulları	30
Tablo 18. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Tavuk Göğüs Filetolarında <i>E. coli</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i> Analiz Sonuçları	36
Tablo 19. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Hindi Göğüs Filetolarında <i>E. coli</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i> Analiz Sonuçları	36
Tablo 20. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Kıymada <i>E. coli</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i> Analiz Sonuçları	36
Tablo 21. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Tavuk Göğüs Filetolarında <i>Salmonella</i> ve <i>Listeria</i> Analiz Sonuçları	37
Tablo 22. Standart Kültürel Yöntem ve FISH Yöntemi ile Hindi Göğüs Filetolarında <i>Salmonella</i> ve <i>Listeria</i> Analiz Sonuçları	37
Tablo 23. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Kıymada <i>Salmonella</i> ve <i>Listeria</i> Analiz Sonuçları	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. FISH yönteminin akım şeması	15
Şekil 2. Denemelerde kullanılan epifloresan mikroskop	19
Şekil 3. FISH yönteminin aşamaları	22
Şekil 4. Spesifik prob ile hibritlenen ETOH ve PFA fiksasyonu uygulanmış <i>E. coli</i> hücrelerinin FISH görüntüleri	24
Şekil 5. Spesifik prob ile hibritlenen ETOH ve PFA fiksasyonu uygulanmış <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium hücrelerinin FISH görüntüleri	25
Şekil 6. Spesifik prob ile hibritlenen ETOH ve PFA fiksasyonu uygulanmış <i>Listeria innocua</i> hücrelerinin FISH görüntüleri	25
Şekil 7. Nonspesifik prob ile hibritlenen ETOH fiksasyonu uygulanmış <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> , PFA fiksasyonu uygulanmış <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium hücrelerinin FISH görüntüleri	26
Şekil 8. Özgül problarla FISH yöntemi ile saptanan <i>E. coli</i> (Cy3, kırmızı), <i>Salmonella</i> (Carboxyfluorescein, yeşil) ve <i>Listeria</i> (Cy3, kırmızı), toplam bakteri (DAPI, mavi) floresan görüntüleri	32
Şekil 9. İzmir'deki farklı marketlerden satın alınan toplam 216 adet tavuk ve hindi göğüs fileto ile kıyma örneğinde <i>E. coli</i> (A); <i>Enterobacteriaceae</i> (B); <i>Salmonella</i> (C) ve <i>Listeria</i> (D) türlerinin varlığının saptanması için gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) ve FISH yöntemi sonuçları	35

EKLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
EK-1 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	52
EK-2 Bakteri Probları	53
EK-3 Standart Kültürel Yöntemlerin Sonuçları	56
EK-4 FISH Yöntemi ile Elde Edilen Bazı Görüntüler	58

ÖZET

Floresanlı yerinde hibritleme (FISH, Fluorescent *in situ* hybridization), mikroorganizmaların nükleik asit dizilerine özgül, floresan işaretli DNA problrarı ile hedefin işaretlenmesi ve floresan mikroskopunda görüntülenmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Bu çalışmada gıda güvenliği ve sanitasyon indeksi olarak kullanılan indikatör mikroorganizma (*Escherichia coli*) ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenlerin (*Salmonella* ve *Listeria*) İzmir'de satışa sunulan tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti ve kıymada saptanması için floresanlı yerinde hibritleme yönteminin (FISH) kullanım olanağı araştırılmıştır. Çalışma 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada söz konusu indikatör ve patojen mikroorganizmaların tavuk/hindi göğüs filetolarına veya kıyma örneğine inokülasyonu yapıldıktan sonra geleneksel yöntemlerle ve FISH tekniği ile sayım yapılmış ve ikinci aşamada ise piyasadan satın alınan örneklerde söz konusu mikroorganizmalar geleneksel yöntemlerle ve FISH tekniği ile saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyaslanarak yöntemin uygulanabilirliği belirlenmiştir.

FISH tekniğinin uygulanabilirliği *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *L. monocytogenes* ve *L. innocua* kültürleri kullanılarak test edilmiştir. Tüm bakteri kültürleri türe spesifik problrarla pozitif hibridizasyon sinyali vermiştir. Tüm bakteri suşları Eub338 ile hibridize olurken hiç bir bakteri kültürü Non338 ile hibridize olmamıştır. Ent, Sal3 ve Lis637 problrarının kullanıldığı 16S veya 23S rRNA FISH metodu tavuk/hindi göğüs filetolarında veya kıymada *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin saptanması için hızlı bir yöntem olarak uygulanmış ve Standart kültürel yöntemle kıyaslanmıştır. Analiz edilen 216 örnekten Standart kültürel yöntemle 5 örnekten *Salmonella* izole edilirken, FISH yöntemi ile 9 örnekte *Salmonella* saptanmıştır. Ancak, Standart kültürel yöntemle 27 örnekte *Listeria* saptanırken FISH yöntemi ile 25 örnekte *Listeria* belirlenmiştir.

Sonuçlar FISH'in *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin tavuk/hindi göğüs filetolarında veya kıymada saptanmasında ve sayımında umut verici bir teknik olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: floresanlı yerinde hibritleme yöntemi (FISH), kültürel yöntem, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti, kıyma

ABSTRACT

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is based on the principle that hybridization of a nucleic acid sequence target of a microorganism with a specific DNA probe labeled with a fluorochrome and imaging by a fluorescence microscope. In this study the possibility to use FISH method for detecting an indicator microorganism (*Escherichia coli*) and food-borne pathogens (*Salmonella* and *Listeria*) that used as food safety and sanitation index in ground meat in market place of Izmir was evaluated. The work consists of two steps. In the first step specified indicator and pathogen microorganisms were inoculated in chicken/turkey breast fillet or ground beef and the applicability of FISH method was evaluated. In the second step the indicator and pathogen microorganisms were detected in fresh chicken/turkey breast fillet or ground beef by conventional cultural methods and FISH method. Results obtained were compared and applicability of FISH method in these conditions was determined.

The applicability of the FISH technique was tested against *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *L. monocytogenes* and *L. innocua*. All cultures showed positive hybridization signal with species specific probes. All strains were able to hybridize with Eub338, and none hybridized with Non338. 16S or 23S rRNA FISH method using Ent, Sal3 and Lis637 was applied as a rapid method for *E. coli*, *Salmonella* and *Listeria* detection in chicken/turkey breast fillet or ground beef samples and compared with Standard culture method. FISH was performed for all fresh samples and pre-enriched samples, in order to evaluate the influence of this step in the FISH performance. From the 216 analysed samples, *Salmonella* was isolated from 5 samples by Standard culture method, while FISH detected 9 pre-enriched samples. However, *Listeria* was isolated from 27 samples by Standard culture method, while FISH detected 25 pre-enriched samples.

Results show that FISH is a promising technique for the rapid detection and enumeration of *E. coli*, *Salmonella* and *Listeria* species in fresh chicken/turkey breast fillet or ground beef samples.

Keywords: Fluorescent *in situ* hybridization (FISH), cultural method, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, chicken breast meat, turkey breast meat, ground beef

GİRİŞ

Gıdaların mikrobiyolojik kalitesi ve güvenilirliği, öncelikle gıdanın üretimi, dağıtımı, depolanması ve hazırlanması aşamalarındaki kritik risk noktalarının tanımlanmasına ve sağlıklı üretim ve dağıtım koşullarının gerçekleştirilmesine bağlıdır. İşletmelerde bu ilkeler doğrultusunda özellikle üretim hattı boyunca alınan örneklerin ve son ürünün mikrobiyolojik durumu değerlendirilmelidir. Bu amaçla kullanılacak mikrobiyolojik yöntemler olabildiğince basit, hızlı, doğru, tekrarlanabilir ve ekonomik olmalıdır. Gıda güvenilirliğini ve kalitesini sağlamada, gıdalarda bulunan indikatör, bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların veya bu mikroorganizmaların mikrobiyal metabolitlerinin belirlenmesi için gıdaların analiz edilmesi standart bir uygulamadır.

Gıda sanayiinde hammaddelerde, son ürünlerde, üretim sırasında proses kontrolü, temizlik ve hijyen uygulamaları sırasında muhtemel patojen bulunma olasılığı üzerine yeterli bilgiyi sağlamak ve üretim sırasında gerekli müdahalelerin yapılabilmesi için daha hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç vardır. Son yıllarda birçok araştırma ve geliştirme çalışmaları test süresini azaltabilen ve mikrobiyolojik yöntemi basitleştiren alternatif yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Alternatif ve hızlı yöntemler geleneksel yöntemlerin modifiye edilmesi ve otomasyonu, biyoluminesans, mikroskopik yöntemler, elektriksel yöntemler, immünojenik yöntemler, nükleik asit esaslı yöntemler olmak üzere sınıflandırılabilir.

Mikrobiyolojik çalışmalarda izolasyon ve tanımlamada çoğunlukla kullanılan direkt (klasik/geleneksel) yöntemler kültürel ve mikroskopik yöntemlerdir. Gıdaların mikrobiyolojik analizinde kullanılan hızlı mikrobiyolojik yöntemler arasında hidrofobik grid membran filtre tekniği, direkt epifloresan mikroskop yöntemi, ATP biyoluminesans yöntemi, elektriksel yöntemler, immünojenik yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) ve DNA hibridizasyon gibi nükleik asit esaslı yöntemler sayılabilir. Gıdaların analizinde kullanılan mikrobiyolojik yöntemler; Kültürel yöntemler, Mikroskopik yöntemler, İmmünojenik yöntemler (IMA, IFA, ELISA) ve Moleküler yöntemler (PCR, RT-PCR) olarak sınıflandırılabilir (BAYSAL, 2005). DNA problemleri ve monoklonal antikorların bulunmasıyla gelişen, hızlı ve duyarlı olan bu yöntemler patojen mikroorganizmaların teşhisinde geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. Günümüzde *Salmonella* ve *Listeria* gibi önemli patojenler için ticari kitler mevcut olup, daha birçok patojen mikroorganizma için DNA problemleri geliştirilmektedir.

Moleküler yöntemler özellikle son yıllarda patojen bakterilerin ve türlerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler yöntemler genomik DNA, RNA, proteinleri ve fosfolipit yağ asitleri hedef alan yöntemler olmakla birlikte, çoğunlukla 16S rRNA'yı hedeflemektedir. Tüm hücreler korunmuş ve değişken bölgelerin her ikisini de içeren 16S RNA'ya sahiptir. Bu nedenle 16S rRNA'ların birincil yapılarındaki benzerlikler ve farklılıklar filogenetik sınıflandırmada kullanılabilir. Ayrıca 16S rRNA filogenetik sınıflandırma için gerekli olan bilgiyi içerecek 1500 baz uzunluğuna da sahiptir. Moleküler bir teknik olan Floresanlı yerinde hibritleme (FISH, Fluorescent *in situ* hybridization) yönteminde de 16S rRNA hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

Et ve Et Ürünlerinde İndikatör Mikroorganizmalar ve Patojenlerin Önemi

Ete bulaşan mikroorganizmalar insanlarda hastalığa neden olabilen patojen, indikatör ve ette bozulmaya neden olan saprofit mikroorganizmalar olarak gruplandırılabilir. Ette indikatör olarak genellikle aerobik mezofilik bakteri, *Enterobacteriaceae*, toplam koliform, fekal koliform ve *Escherichia coli* sayıları önemlidir. Karkaslarda ve kıyılmış etlerdeki aerobik mezofilik bakteri sayısı genellikle kesim ve kesim sonrası işlemler sırasındaki sanitasyon uygulamalarının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. *Enterobacteriaceae*, toplam koliform ve fekal koliform bakterileri ile *E. coli* genellikle barsak orjinli kontaminasyon düzeyini göstermekle birlikte, bu mikroorganizmaların aynı zamanda hayvan derisinde de bulunmaları ve bazılarının ise doğada serbest halde yaşayabilmeleri nedeniyle dış çevreden gelen kontaminasyonu da ifade etmektedir. Ette bozulmaya neden olan saprofit mikroflora ise etin depolanma ve paketlenme şekline göre farklılık göstermektedir. Soğukta saklanan etlerde bozulma genellikle *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* ve *Alteromonas* (*Pseudomonas putrefaciens*) gibi aerobik psikrotrof bakterilerin metabolik aktivitesi sonucunda oluşmaktadır (ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2003).

Ete bulaşan mikroorganizmalar kan, lenf kanalları ve bağ doku boşlukları aracılığıyla dokulara yayılır. Etin kıyma haline getirilmesi ise mikroorganizmaların tüm dokuya yayılmasını sağlar. Hayvanın ölümünden sonra mikroorganizmaların dokulara yayılmasına barsaktaki yük, kesimden önce hayvanın fizyolojik durumu, kesim ve kanatma yöntemleri ve soğutma hızı gibi faktörler etki etmektedir. Taze etlerde bozulma yüzeyde veya etin iç kısımlarında mikroorganizmaların gelişerek yüksek sayılara ulaşması sonucu oluşmaktadır. Bozulmanın belirgin hale gelmesi için ise genel olarak yüzeyde 1 cm²'deki mikroorganizma sayısının 10⁶-10⁸ düzeylerine ulaşması gerekmektedir. Sığır eti, tavuk eti ve bazı işlem görmüş etlerde bozulma belirtileri ortaya çıktığında ulaşılan mikroorganizma sayılarındaki varyasyonlar mevcut mikroorganizmaların cinsi, türü ve aktivitesindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (DOYLE ve DİĞ., 2001; JAY ve DİĞ., 2005; ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2003).

Hayvansal kaynaklı gıdalar insan patojeni olan birçok mikroorganizmanın da kaynağını oluşturmaktadır. Hatta hayvansal gıdalar bu tür patojen mikroorganizmaların gelişebilmesi için mükemmel bir besin ortamıdır. Özellikle kıyma, bakterilerin gelişmesi ve çoğalması için çok elverişli bir ortama sahiptir. Etin yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar kıymanın hazırlanması, özellikle çekme ve karıştırma aşamalarında tüm ürüne bulaşarak gelişmekte ve kıymanın raf ömrünün azalmasına neden olmaktadır. Kıymanın özellikle sağlıklı olmayan hayvanlara ait etlerden hijyenik olmayan koşullarda elde edilmesi, paketlenmesi ve muhafaza edilmesi mikroorganizmaların üremesini hızlandırmakta ve ayrıca tüketici sağlığı açısından da tehlike oluşturmaktadır. Yine, kanatlı etlerinde *Salmonella* bulunması ve bu durumun *Salmonella* barsak enfeksiyonlarının oluşmasındaki rolü bilinen bir gerçektir. Tavuk etlerinde *Salmonella* bulunma oranının % 20'lere kadar ulaştığı bildirilmektedir. Et ve et ürünleri ile yaklaşık 30 zoonoz hastalık insanlara geçmekte ve hastalığa neden olmaktadır. Bu hastalıkların önemi hastalığın epidemiyolojisine, mikroorganizmanın patojenitesine, hastalığın kontrol altına alınmasında uygulanan programlara, kesim sırasında uygulanan kontrol ve sanitasyon düzeyine gıda işleme ve hazırlama tekniklerine göre değişiklik göstermektedir. Et ve et ürünleri ile insanlara geçen zoonoz hastalıkların önlenmesi için kesimden önce ve sonra hayvanda bir veteriner hekim tarafından mutlaka klinik, patolojik, anatomik inceleme yapılması ve kesimden tüketici mutfağına kadar uzanan zincirde ette bulunan mikroorganizmaların gelişmesini ve dışarıdan gelebilecek bulaşmaları önleyecek her türlü önlemin alınması gerekmektedir. Hatta et üretiminde hijyen, sürüde veya çiftlikte, kesimden önce beslenme sırasında zoonoz hastalıkların kontrolü ile mümkündür. Et ve et ürünlerinin tüketimi sonucunda insanlarda gıda enfeksiyonu ve zehirlenmelere neden olan patojen mikroorganizmaların başında *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* gelmektedir (FARBER ve DİĞ., 1989; DOYLE ve DİĞ., 2001; EROL, 1999; JAY ve DİĞ., 2005; ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2003).

Yapılan araştırmalar, toplam gıda zehirlenmelerinin % 54,7'sinin et ve et ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıktığını ve bunların çoğunluğunun *Salmonella* ve *Listeria* nedeniyle olduğunu göstermektedir. Gıda zehirlenmelerine neden olan patojenlerin de genellikle sığır etlerinden ve kanatlı etlerinden ileri geldiği bildirilmiştir. Salmonellozis, Avrupa Birliği'nde en yaygın bildirilen zoonoz hastalıklarda ikinci sırada yer almaktadır (EFSA, 2009).

Gıda zehirlenmeleri gelişmiş, gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde hijyenik koşulların yetersizliği, üretici ve tüketicilerin bilinçsiz olması; gelişmiş ülkelerde ise yaşam koşullarına bağlı olarak hazır, yarı-hazır gıda tüketimindeki artış ve yeni işleme teknikleri gıda kaynaklı zehirlenmelerin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır (ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2003).

Salmonella türleri mezofilik bakteriler olup geniş sıcaklık aralığında aktif olarak gelişen ve ekstrem çevre koşullarına kolay adapte olabilen mikroorganizmalardır. Üreme sıcaklık aralığı 2-54°C'dir ve 2-4°C'de depolanan gıdalarda gelişebilmeleri nedeniyle psikrotrofik özelliktedir (ÜNLÜTÜRK ve TURANTAŞ, 2003). Halk sağlığı açısından bakıldığında süt sığırları, kümes hayvanları ve diğer hayvanlar yanında doğal olarak enfekte kuş dışkılarında, su ve atık sularında, gıda işleme çevrelerinde, gıdalarda ve yemlerde *Salmonella* türlerinin uzun süre canlı kalması özellikle dikkate alınmak zorundadır. *Salmonella*'nın aside direnç kazanması sonucunda, starter kültür kullanılarak elde edilen ürünler de, *Salmonella* türlerinin gelişimi için uygun bir ortam oluşturmuştur. Gıdalarda aside dirençli *Salmonella* türlerinin varlığı ileri aşamalarda halk sağlığı riskinin artmasına neden olmaktadır. İngiltere'de gerçekleştirilen bir yıllık bir araştırmanın sonucunda bütün halinde analiz edilen 884 kanatlı etinin 25'inde (% 2,8) *Salmonella* türlerinin bulunduğu ve örneklerin ikisinin *Salmonella enterica* serovar Typhimurium içerdiği belirlenmiştir (HPACI, 2006).

Listeria monocytogenes et ve et ürünlerinin mikroflorasında bulunan önemli patojenlerden bir diğeridir. Gıda enfeksiyonları arasında Listeriozis, özellikle son yıllarda bazı ülkelerde gıdalarla bulaşan ve ölümle sonuçlanan birçok enfeksiyon vakasının ortaya çıkması nedeniyle dünya gıda endüstrisini yakından ilgilendiren önemli bir sorun oluşturmuştur (WHO, 1988; FLEMING, 1985). *Listeria* cinsi içinde yer alan 5 türden sadece *L. monocytogenes* patojendir. *Listeria* türleri içerisinde *L. monocytogenes* insan ve hayvanlarda ciddi sporadik enfeksiyonlar oluştururken, *L. ivanovii* sadece hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır (MULLER, 1988; SEELIGER ve JONES, 1986; WHO, 1988; FLEMING, 1985). Listeriozis ender rastlanan bir hastalık olmasına rağmen (3-10 vaka/bir milyon kişi/yıl) vakalarının % 30'unun ölümle sonuçlanması bakımından özel bir önem kazanmaktadır. *L. monocytogenes* çiğ süt, çiğ sebze, peynir, çiğ ve pişirilmiş etlerin tüketiminden kaynaklanan pek çok enfeksiyonu neden olmuştur. (BRACKET, 1988). *L. monocytogenes* çevrede (toprak, su, bitkiler, atık sular, hayvansal yemler ve silaj) yaygın bir şekilde bulunan patojen bakteridir (LOVETT ve HITCHINS, 1988). Bu kaynaklardan hayvanlara ve hayvanların dışkı, kan ve sütleri ile de çevreye bulaşmakta, sanitasyon uygulamaları yetersiz olduğunda da gıda maddeleri üretim, taşıma ve tüketim sırasında kontamine olabilmektedir (WHO, 1988; BRACKET, 1988). Gıda kaynaklı listeriozis olaylarında çevresel bulaşmanın yanı sıra *Listeria* türlerinin psikrotrofik olmaları, üreme sıcaklık aralığının geniş olması, besinden yoksun ortamlarda üreyebilmeleri ve düşük pH, tuz, nitrit ve düşük su aktivitesi gibi faktörlere karşı dirençli olmaları hastalığın yayılmasında etkili olmaktadır (SEELIGER, 1988). Et, tavuk eti, kıyma, çiğ salam ve diğer et mamulleri Listeriozis'in ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Amerika'da nadiren görülen Listeriosis olaylarının % 20'sinin sebebinin et ürünleri olduğu, bunun yanında karides gibi kabuklu deniz ürünleri, hazır salata ve mezeler, pasta ve kremalardan alınan örneklerden de *L. monocytogenes*'in izole edildiği bildirilmiştir (TERPLAN, 1989). Hastalık insanlarda tanımlanmadan önce hayvanlarda tanımlanmıştır. Hastalığın sıcakkanlı hayvanlardaki seyri insanlardakine benzemektedir. Enfeksiyona *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* neden olur (MARTH, 1988; MULLER, 1988; SEELIGER ve JONES, 1986). Enfeksiyon ruminantlarda özellikle sığır, koyun ve keçilerde etkili ve ekonomik olarak önemlidir. Bunun yanında birçok memeli türünde, kanatlılarda ve alt sınıf hayvanlarında görüldüğü bildirilmektedir. Hastalığın bulaşma ve yayılmasında aseptomatik, infekte ve taşıyıcı hayvanların rolü büyüktür. *Listeria* türleri çevrede, toprakta, suda, kötü kaliteli silajlarda yaygın olmasından dolayı buradan hayvanlara ve hayvanların dışkıları, kan ve sütleri ile tekrar çevreye bulaşmakta ve sonuçta iyi bir sanitasyonun uygulanmadığı durumlarda gıda maddelerinin üretimi, taşınması ve tüketimi sırasında ürünler kontamine olmaktadır (BRACKET, 1988; FENLON, 1985; WEIS ve SEELIGER, 1975; TERPLAN, 1989). Gıdalardan kaynaklanan Listeriozis olaylarında öncelikle süt ve süt ürünleri sorumlu (FLEMING ve DİĞ., 1985; LINNAN ve DİĞ., 1988) tutulmuşsa da yapılan çalışmalar et ve et ürünlerinin bu mikroorganizmalar ile daha çok kontamine olduğunu göstermiştir (FARCHMIN, 1963; LEISTNER ve DİĞ., 1989; NICALAS ve DİĞ., 1989; SCHMIDT ve DİĞ., 1988; SCHÖNBERG ve DİĞ., 1989; WEISE, 1987). *Listeria* türlerinin et ve et ürünlerinde bulunması ve gelişmesi ürünün çeşidine, doğal mikroflorasına, pH'sına ve kontaminasyon miktarına bağlıdır. En iyi gelişme pH 6 ve yukarısında olurken, pH 5 ve altında çok az ya da hiç gelişme olmaz. Et ve ürünleri işleme, taşınma ve depolama sırasında önemli ölçüde kontaminasyona maruz kalmaktadır. (GLASS ve DOYLE, 1989; HARRISON ve CARPENTER, 1989). Ticari sterilizasyon uygulanan ve soğukta saklanan ürünler, *Listeria* bakımından güvenilir ise de tüketime

hazır ürünlerde sonraki aşamalarda oluşan kontaminasyonlar ile etkenin mutfağa ulaşması tehlike arz etmektedir (HARRISON ve CARPENTER, 1989; HUDSON ve MEAD, 1989). Ayrıca mikroorganizmaların buzdolabı ısısında üremesi de önemlidir. Çiğ etler *L. monocytogenes*'in hayvanlardan insanlara geçişinde bir faktör olabilmektedir ve hastalık primer olarak gıdalardan kaynaklanmaktadır (ELISCHEROVA ve DİĞ., 1979).

Et ve et ürünlerinde patojen olmayan *Listeria* türleri fazlaca bulunur. *L. innocua* çoğu kere *L. monocytogenes*'den daha sık izole edilmiştir (BREUER ve PRANDL, 1988). Ayrıca *L. seeligeri*, *L. welshimeri*'de yaygın olup *L. grayi* ve *L. murrayi* de saptanmıştır. Kıymalarda *Listeria* kontaminasyonu karkas ya da parça etlerden daha fazladır ve kontaminasyon bıçakla, bıçak sapları, diğer çalışma materyalleri ve çalışanlar aracılığıyla olmaktadır. Nitekim mezbaha ve çevresinin et ürünlerinin kontamine olmasında birinci kaynak olduğu bildirilmiştir (JOHNSON ve DİĞ., 1990).

Literatürde tüm dünyada ve ülkemizde tüketicilerin sağlığının korunması açısından satışa sunulan et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışma mevcuttur. Genel olarak bu çalışmalar sonucunda et ve et ürünlerinde patojen mikroorganizmaların önemli bir oranda bulunduğu, ortaya çıkan halk sağlığı sorunlarına ve ekonomik kayıplara neden olan gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarının oluşumunda bu gıdaların büyük önem taşıdığı görülmektedir.

Fransa'da yapılan bir çalışmada, 378 et ürününün % 29,1'inde *L. monocytogenes*, % 9,3'ünde *L. innocua* ve % 1,9'unda da *L. welshimeri* saptanmıştır (NICALAS ve DİĞ., 1989). SCHÖNBERG ve DİĞERLERİ (1989), inceledikleri tavuk etlerinin % 85'inde *L. monocytogenes*, % 8'inde *L. innocua* ve % 1'inde *L. welshimeri*'yi tespit etmişlerdir. Etler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, incelenen tavuk etlerinin % 70,2'sinde *L. monocytogenes* izole edilmiştir (ELISCHEROVA ve DİĞ., 1979). WEIS (1989) tarafından yapılan bir çalışmada, 8 tavuk eti örneğinin % 62,5'inde *L. monocytogenes*, % 62,5'inde de *L. innocua* tanımlanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada, tavuk etlerinin % 21,8'inde *L. monocytogenes* saptanmıştır (NITCHEVA ve DİĞ., 1990). FARBER ve DİĞERLERİ (1989), inceledikleri tavukların % 56,3'ünde, *L. monocytogenes*'i tanımlamışlardır. KWIATEK ve DİĞERLERİ (1992), tavuk etlerinin % 60'undan *L. monocytogenes*, % 10'undan ise diğer *Listeria* türlerini izole etmişlerdir. BAILEY ve DİĞERLERİ (1989), tavuk etlerinin % 23'ünden *L. monocytogenes*, % 38'inden diğer *Listeria* türlerini tespit etmişlerdir. Diğer taraftan TERNSTRÖM ve MALIN (1987), tavuk etlerinde *L. monocytogenes*'i saptayamadıklarını ifade etmişlerdir. Ülkemizde ÇİFTÇİOĞLU (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, 100 tavuk etinde *Listeria* türleri araştırılmıştır. İncelenen tavuk etlerinin, % 3'ünde *L. monocytogenes*, % 14'ünde *L. innocua* olmak üzere % 17'sinde *Listeria* türlerinin bulunduğu bildirilmiştir. SHARIF ve TUNAİL (1995), çeşitli et ürünlerinden oluşan toplam 200 örneğin % 43'ünde *Listeria* türlerini, % 38,6'sında da *L. monocytogenes*'i saptamışlardır. Aynı araştırmacılar izolatların % 23,49'unun *L. monocytogenes*, % 58,6'sının *L. innocua*, % 14,88'inin *L. welshimeri*, % 2,79'unun *L. grayi* ve % 0,23'ünün *L. ivanovii* olduğunu bildirmişlerdir. BERKTAŞ ve DİĞERLERİ (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda, kıymanın % 73 (73/100)'ünde ve parça etin % 74 (37/50)'ünde çeşitli *Listeria* suşları saptanmıştır. Kıyma et örnekleri üzerinde yapılan çalışmalara baktığımızda; FARBER ve DİĞERLERİ (1989) 22 örnekte % 77,3 oranında *L. monocytogenes*, saptadıklarını; LEISTNER ve DİĞERLERİ (1989) % 93 oranında *Listeria* suşu saptadıklarını ve bunların % 63'ünün *L. monocytogenes* olduğunu, SCHÖNBERG ve DİĞERLERİ (1989) 76 örnekte % 38 oranında *L. monocytogenes* ve % 40 oranında *L. innocua* saptadıklarını, ERDLE (1988) bir çalışmada 50 örnekte % 68 oranında *Listeria* suşu saptadığını, bunların % 30'unun *L. monocytogenes* olduğunu, GÜVEN (1999) 100 örnekte % 35 oranında *Listeria* suşu saptadığını bunların % 13'ünün *L. monocytogenes*, % 26'sinin *L. innocua* ve % 4'ünde de her ikisinin birlikte bulunduğunu, ÇİFTÇİOĞLU (1992) 100 örnekte % 34 oranında *Listeria* suşu saptadığını, bunların 11 (% 32,4)'inin *L. monocytogenes*, 20 (% 58,8)'sinin *L. innocua*, 2 (% 5,9)'sinin *L. murrayi*, 1 (% 2,9)'inin *L. seeligeri* olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde kasap ve marketlerde satılan kıymaların mikrobiyolojik yükü ile ilgili çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ankara (AKILLI, 1982-1983; TEKİNŞEN ve DİĞ., 1980; EROL, 1999), Kayseri (GÖNÜLALAN ve KÖSE, 2003), Kars (GÜVEN ve DİĞ., 1997), Van (SANCAK ve DİĞ., 1993) ve Aydın (SIRIKEN, 2004), İstanbul (BAŞKAYA ve DİĞ., 2004), illerinde satışa sunulan hazır kıymaların mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, laboratuvar bulguları hazır satılan kıymaların insan sağlığı açısından, ne kadar riskli bir gıda grubu olduğunu göstermektedir.

Bakterilerin Saptanmasında Kullanılan Kültüre Dayalı ve Kültürel Olmayan Yöntemler

Bakterilerin gıda veya diğer örneklerde saptanması ve tanımlanmasının geleneksel yolu kültürel yöntem kullanımı, sayım ve şüpheli kolonilerin daha sonra uygulanacak tanımlama testlerine tabi

tutulmak üzere izolasyonuna dayanmaktadır. Gerekli olduğu durumlarda gıda örneği homojenize ve konsantrite edilmeli ve kültürel yöntem uygulanmadan önce ön zenginleştirilmelidir. Bakteri hücreleri gıda işleme aşamaları sırasında ısı, soğuk, asit ve ozmotik şok gibi sublethal stresler nedeniyle hasar görebilmekte (injured) veya canlı fakat kültür edilemeyen (viable but nonculturable, VBNC) duruma gelebilmektedir (KELL ve DİĞ., 1998). Bu bakteri hücreleri gıda endüstrisi ve halk sağlığı açısından bir tehlike olmaya devam etmektedir. Bu nedenle hasar görmüş hücrelerin saptanma seviyelerini artırmak için yöntemler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemlerle bile tüm bakteri hücreleri özellikle VBNC saptanamadığı durumlar olmaktadır. Bir gıda örneğindeki bakterilerin ön zenginleştirilmesi seçici olmayan (non-selective) veya seçici (selective) sıvı besiyerlerinde veya hasar görmüş hücrelerin kendine gelmesi için seçici katı besiyerinin yüzeyinde geliştirilmesi suretiyle gerçekleştirilebilmektedir (HURST, 1977; RAY, 1986; ZHAO ve DOYLE, 2001). Canlı hücrelerin saptama seviyelerini artıran bir başka yol da kültür edilmeden önce filtrasyon veya santrifüj edilerek gıda örneğinin konsantrite edilmesidir. Heterojen veya kirli örneklerden spesifik bakterilerin seleksiyonu immunomagnetik veya metal hidroksit temelli ayırma gibi modern konsantrite etme yöntemleri ile mümkün olmaktadır (GRACIAS ve McKILLIP, 2004). Ön bir uygulama yapılan örnekten daha sonra seçici olmayan (non-selective), seçici (selective) ve ayırt edici (differential) besiyerlerine ekim yapılabilmektedir (GRACIAS ve McKILLIP, 2004). Aerobik plak sayım yönteminde kullanılan besiyerleri gibi seçici olmayan veya standart yöntem besiyerleri örneklerdeki bakterileri saptamak ve miktarını belirlemek için kullanılabilir. Seçici besiyeri antibiyotik, bakteriyosin, bir gelişme besin elementi gibi spesifik mikroorganizmaların gelişmesini seçici olarak engelleyen veya baskılayan bir bileşiği içermektedir. Ayırt edici besiyeri ise gelişme sırasında gerçekleşen çeşitli kimyasal reaksiyonlarla bakterileri ayırt ettiren kromojenik (chromogenic) veya florojenik (fluorogenic) substrat gibi bir indikatör içermektedir. Seçici bir besiyerine kromojenik veya florojenik enzim substratlarının ilave edilmesiyle mikroorganizmaların tanımlanması ek bir kültür etme veya biyokimyasal test gerektirmeden doğrudan yapılabilir. Bu kültür besiyerleri substratlar için spesifik ve tam enzimleri üreten bakteriler için kullanılmaktadır. Kromojenik veya florojenik substratla enzim tepkimeye girdiğinde sırasıyla, ortamda renk değişimi veya floresan oluşacaktır. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus* türleri ve *S. aureus*'un sayımı ve tanımlanması için kullanılan kromojenik ve florojenik kültür besiyerlerindeki gelişmeler MANAFI (2000) tarafından derlenmiştir. Kültürel yöntemler zaman alıcı olmasına ve iş gücü gerektirmesine rağmen mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılması daha sonra uygulanacak alt tiplendirme (subtyping) analizi ve kültür koleksiyonlarında saklanmasına olanak tanımaktadır. Bakterilerin en geleneksel alt tiplendirmesi mikroorganizmaların fenotipik (phenotypic) özelliklerinin çalışılmasını kapsamaktadır. Bu fenotipik yöntemler biyotiplendirme (biotyping), serotiplendirme (serotyping) ve faj tiplendirme (phage typing) yöntemlerini içermektedir (ARBEIT, 1995). Serolojik ve faj tiplendirmede daha çok bakterilerin yüzey yapılarındaki farklılıklar üzerinde yoğunlaşılırken Biyotiplendirmede, biyokimyasal gelişme ihtiyaçları, çevresel koşullar (pH, sıcaklık, antibiyotik direnci, bakteriyosinlere duyarlılık) ve fizyolojik (koloni ve hücre morfolojisi, mikroskopi ile hücre duvarı bileşimi ve yağ asidi analizi ile hücre membranı bileşimi) araştırılmaktadır. (TOWNER ve COCKAYNE, 1993; VANDAMME ve DİĞ., 1996). Fajlar bakterilerin alt tiplendirilmesinde faydalı olmakla kalmayıp gıdalardan patojen bakterilerin doğrudan saptanmasında da kullanılmaktadır (HAGENS ve LOESSNER, 2007; KRETZER ve DİĞ., 2007). Bununla birlikte bu fenotipik tiplendirme yöntemleri mikroorganizmalar çevresel değişiklikler veya genetik mutasyonlar nedeniyle fenotipik özelliklerini aniden değiştirebilme yeteneğine sahip olduğu için sınırlı olmaktadır. Bu nedenle fenotipik yöntemlerle gerçekleştirilebilen bu problemlerden kaçınmak için genotipik (genotypic) özellikler ile tanımlama geliştirilmiştir. Genotipik özellikler ile tanımlamanın esas alındığı yöntemler nükleik asit amplifikasyon yöntemleri (polimeraz zincir reaksiyonu, PCR, multiplex PCR, reverse transcriptase PCR, quantitative PCR gibi çeşitli varyasyonları), Restriction endonuclease analizi (DNA fingerprinting analizi), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), immünolojik yöntemler (ELISA), flow cytometry, DNA microarrayleri, biyosensörler ve spektroskopik yöntemler (reflectance, fourier transform raman and kütle spektroskopisi) gibi çeşitli yöntemleri içine almaktadır. Kültüre dayalı ve kültürel olmayan mikrobiyal yöntemlerin kısaca özellikleri, avantaj ve dezavantajları Tablo 1'de verilmektedir.

Kültürel olmayan hibridizasyon yöntemi ile ilk olarak radyoaktif problemlerle, *Xenopus oocytes*'in 28S rRNA'ları, hücre yapıları bozulmadan hibritleme ile tespit edilebilmiştir (GALL ve PARDUE, 1969; JOHN ve DİĞ., 1969). Daha sonra radyoaktif problemler, bakteri türlerinin tespitinde kullanılmıştır (GIOVANNONI ve DİĞ., 1988). Floresan işaretli oligonükleotid problemlerin mikrobiyal türlerin tespiti için kullanılması ise 1989 yılında başlamıştır.

Tablo 1. Kültüre Dayalı ve Kültürel Olmayan Mikrobiyal Yöntemlerin Avantaj ve Dezavantajları

Kültüre Dayalı Yöntemler		Kültürel olmayan Yöntemler	
Seçici ve seçici olmayan gelişme ortamlarında kultivasyon Fenotipik (fizyolojik ve biyokimyasal) Genotipik (tür spesifik PCR, DNA fingerprinting, sekanslama) karakterizasyon ve tanımlama		Görsel ve organoleptik özellikler, mikroskopi, biyomass, mikrobiyal metabolitler (uçucu bileşikler, toksinler vd.), antikor teknikleri veya direkt DNA/RNA yaklaşımları (PCR, PCR-DGGE, RT-PCR, real-time PCR), hibridizasyon (FISH) , klonlama, sekanslama ve transcriptional profiling	
Avantaj	Dezavantaj	Avantaj	Dezavantaj
Daha sonraki uygulamalar için mikroorganizma izolatının mevcut olması	Zaman alması	Kültür edilemeyen mikroorganizmaların saptanması	Daha sonraki uygulamalar için mikroorganizma izolatının mevcut olmaması
İzolatin belirli bir türü temsil etmesi	İş gücü gerektirmesi	Gerçek ortamda genetik çeşitliliği göstermesi	Genetik bilgi gerektirmesi (sekans data)
Canlılığı göstermesi	Birçok mikroorganizmanın kültür edilememesi	Kompleks ekosistemlerdeki spesifik mikroorganizma gruplarının saptanması	Birçok tekniğin ölü hücreleri de saptaması

Aktif çamur sistemlerinde nitrifikasyondan sorumlu bakterilerin tür ve sayılarının tespit edilmesinde, sülfatlı atık suların anerobik arıtımında rol alan mikrobiyal türlerin tanımlanmasında da FISH yönteminden yararlanılmıştır. Çevre alanında FISH yönteminden doğal ekosistemlerde, mühendislik tasarımı ekosistemlerde mikroorganizmaların saptanmasında ve sayılarının belirlenmesinde, mikroorganizmaların arasındaki simbiyotik ilişkilerin incelenmesi, mikroorganizmaların işlevlerinin belirlenmesinde yararlanılabilmektedir (AMANN ve DİĞ., 1995, 2001). Günümüze değin temiz su kaynakları (göl, nehir), deniz kaynakları, sedimentler, toprak, ekstrem ortamlar (termal sular, tuz gölleri v.b.), biyofilmler olmak üzere farklı doğal ekosistemlerde mikroorganizmaların tespit edilmesi ve sayılarının belirlenmesi amacıyla FISH yöntemi kullanılmıştır. Tarım alanında bitki patojenlerinin tayininde, hayvancılık alanında ise veterinerlik uygulamalarında hayvan hastalıklarının teşhisinde, tıp alanında karmaşık mikrobiyal grupların tanımlanması, mantarların tayini, kanser ve kromozomal anomalilerin (aykırılık) teşhisinin yanı sıra bu yöntem tıpta diagnostik bir araç olarak normal ağız florasının ve enfeksiyon şartlarındaki floranın, solunum ve gastro-intestinal yolunda kolonize olan kompleks komünitelerde bakterilerin tanımlanması için de rutin olarak kullanılmaktadır (MOTER ve GOBEL, 2000). Genomların fiziksel haritalanması, toksikolojik çalışmalar ve virüslerin tespitinde de FISH yönteminin uygulama alanı bulması söz konusudur. FISH, yöntemi ile ilgili olarak sürdürülen çalışmalar çoğunlukla klinik örnekler üzerinde yapılmakla birlikte yöntemin gıda mikrobiyolojisinde kullanılabilirliği üzerine araştırmalar sürdürülmektedir. Gıda alanında henüz çok yeni olan bu yöntem araştırma konusu olmaktadır.

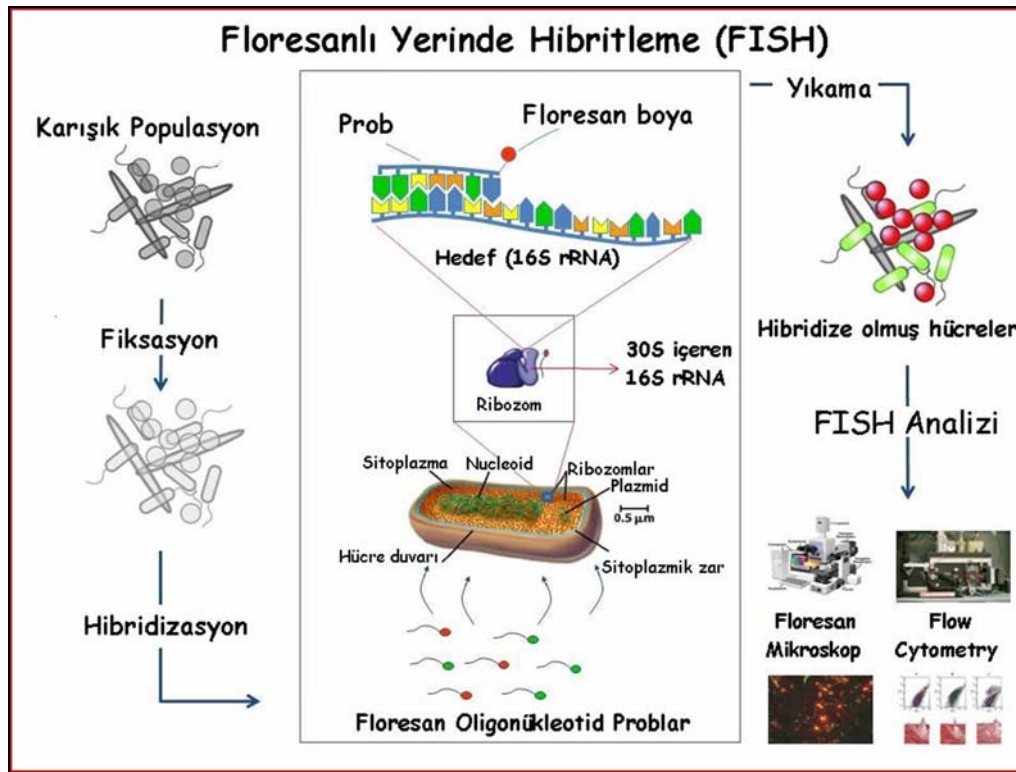
Gıdalarda insan sağlığını tehdit eden patojen bakterilerin (Enterik patojenler) tayini için kullanım alanı bulabilecek hızlı, pratik güvenilir bir yöntem olduğu gıda alanı dışında birçok çalışmada gösterilmiş bu yöntemin gıdalarda bulunan ve tayini önemli olan mikroorganizmaların belirlenmesinde önemli bir potansiyele sahiptir.

Floresanlı Yerde Hibritleme (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) Yöntemi

FISH moleküler genetiğin hassasiyeti ve duyarlılığı ile hücreleri doğal çevrelerinde ve/veya gelişme ortamlarında tanımlanmasına ve mikroskopla görünür hale getirilmesine olanak tanıyan bir moleküler yöntemdir. Öyle ki nükleik asit sekansları hücrenin morfolojisini veya çeşitli bölümlerinin bütünlüğünü değiştirmeksizin hücrelerin içerisinde incelenebilmektedir (MOTER ve GOBEL, 2000). Floresan işaretlenmiş mikrobiyal hücrelerin yerinde (*in situ*) tanımlanması, rRNA-hedefli oligonükleotid probolar, filogenetik boyalar olarak adlandırılan tüm canlı organizmalarda bulunan ribozomların ve sonuç olarak çoğu 16S ve 23S rRNA moleküllerinin de olduğu gibi yüksek hücresel içeriğine dayanmaktadır. rRNA asıl hedef moleküldür çünkü göreceli olarak stabildir, ayrıca değişken ve oldukça yüksek seviyede korunmuş 16S ve 23S sekanslarının her ikisini de içermektedir (AMANN ve DİĞ., 2001). FISH yönteminde uygun reaksiyon koşulları altında probdaki komplementer sekanslar ve hedef hücre yapışmakta (annealing) ve prob hibridizasyonunun yeri floresan mikroskop ile saptanmaktadır (AMANN ve DİĞ., 1990). FISH yönteminde göreceli olarak yavaş mutasyon hızı nedeniyle kullanılan rRNA molekülünün özel bölgelerinin seçimi tür seviyesine kadar filogenetik spesifisiteyi mümkün

kılmaktadır (AMANN ve DİĞ., 1990). rRNA molekülü genel olarak prokaryotik türlere ait suşları ayırt edecek herhangi bir hedef bölgesi içermemektedir (WAGNER ve DİĞ., 1998). Bu özellikleri nedeniyle, en çok kullanılan FISH yöntemlerinden biri olan "ribozomal RNA (rRNA)-hedefli oligonükleotid problemlerin kullanıldığı FISH yöntemi" gıda mikrobiyolojisinde karışık mikrobiyal topluluklardaki spesifik mikroorganizmaları ön bir kültürel işlemi gerektirmeksizin belirlemek için kullanım alanı bulmuştur (AMANN ve DİĞ., 1990; LANGENDIJK ve DİĞ., 1995). Gıda mikrobiyolojisi açısından FISH kullanımı peynir (KOLLOFFEL ve DİĞ., 1999) ve şarap (BLASCO ve DİĞ., 2003) gibi fermente olmuş ürünlerde mikroorganizmaların belirlenmesinde bir bakış açısı sağlamıştır. Bu yöntem toplam mikrobiyal populasyon arasında kültür edilebilen bakterilerin oranının düşük olduğu örneklerde dahi birçok bakterinin saptanmasını mümkün kılmaktadır.

Tipik bir FISH protokolu (Şekil. 1) hücrede bulunan 16S rRNA moleküllerinin bütünlüğünün korunması amaçlanan sabitleme/fiksasyon (fixation) ve örneğin hücre duvarının problemlara geçirgen hale getirilmesi (permeabilization), Prob ve hedeflediği 16S rRNA moleküllerinin birbirlerine bağlanması amacıyla hibridizasyon, bağlanmayan probun uzaklaştırmak için yıkama (washing) ve işaretlenmiş hücrelerin mikroskop veya flow cytometry ile görüntülenmesi (imaging)/saptanması olmak üzere 4 aşama içermektedir (AMANN ve DİĞ., 2001).



Şekil 1. FISH yönteminin akım şeması

FISH yönteminde hibridizasyondan önce, bakteriler sabitlenmeli ve floresan problemlerin hücre içerisine penetrasyonuna izin vermek ve RNA'yı endojen RNases enziminden korumak için geçirgen hale getirilmelidir (MOTER ve GOBEL, 2000). Örnek ya membran filtre üzerine yerleştirilir ve sabitleyici ajan ile kaplanır, ya da sabitleyici ajan ile karıştırılır, inkübe edilir, santrifüjlenerek sedimente edilir, yeniden süspansiyon edilir, cam lamlara aktarılır ve kurutulur. Örneklerin cam lamlara daha iyi tutunması için, bazı araştırmacılar lam yüzeyine jelatin, poly-L-lysine veya silan edici maddeler gibi kaplama ajanları uygulamayı önermiştir. Eğer hücre süspansiyonu araştırılıyorsa, bakteriler süspansiyon içerisinde sabitlenir, mikroskop lamı üzerine örnek aktarılır, havada kurutulur ve artan konsantrasyonda etanol çözeltilerinde dehidre edilir. Bazı durumlarda, örneğin Gram-pozitif hücreler için, lizozim, lysostaphin veya bir enzim karışımı ile ilave bir enzimatik uygulama peptidoglikon tabakasını açmak için gerekli olabilir. Hibridizasyon problemlerinin hedef sekansa düzgün bir şekilde tutunması/yapışması için en uygun koşullarda gerçekleştirilmelidir. FISH tekniğinin bu önemli aşaması için hedef RNA'ya komplementer floresan işaretli problemler içeren önceden ısıtılmış hibridizasyon

tamponu örneğe uygulanmaktadır. Hibridizasyonda farklı sıklık (stringency) seviyeleri hibridizasyon tampon bileşimi değiştirilerek elde edilebilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Farklı hibridizasyon sıklığı (stringency) elde etmek için kullanılan hibridizasyon tamponu bileşimi (DAIMS ve DİĞ., 2005)^a

	Hibridizasyon Tamponundaki %FA konsantrasyonu										
	%0	%5	%10	%15	%20	%25	%30	%35	%40	%45	%50
5M NaCl	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
1M Tris-HCl	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ddH ₂ O	799	749	699	649	599	549	499	449	399	349	299
FA	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
%10 SDS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

^a Hacimler µl biriminde verilmiştir ve çözelti son hacmi daima 1 ml olmalıdır. FA=formamide, SDS=sodium dodecyl sulfate

FISH problemlerinin seçiminde özgüllük (specificity), hassasiyet (sensitivity) ve doku penetrasyonunun kolaylığı göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdir. Problemlerin spesifitesi rRNA üzerindeki hedeflenen bölgeye bağlı olarak değişmektedir (LOY ve DİĞ., 2003, 2007). Sinyal yoğunluğu/şiddeti hücrel rRNA içeriği ile doğrudan ilişkilidir. Hibridizasyon genellikle 37-50°C arasındaki sıcaklıklarda karanlık bir "humid chamber" da gerçekleştirilir. Hibridizasyon süresi 30 dakika ve birkaç saat arasında değişmektedir. Lam üzerindeki örnekler daha sonra bağlanmayan probun uzaklaştırılması için yıkama aşamasına tabi tutulmaktadır. Yıkama aşamasında farklı stringency seviyeleri yıkama tampon bileşimi değiştirilerek elde edilebilmektedir (Tablo 3). Son olarak destile su ile yıkanan lamlar bir anti-soldurucu ajan ile muamele edilerek epifloresan mikroskop veya lazer taramalı konfokal mikroskopta incelenmektedir (MOTER ve GOBEL, 2000).

Tablo 3. Farklı yıkama sıklığı (stringency) elde etmek için kullanılan yıkama tamponu bileşimi (DAIMS ve DİĞ., 2005)^a

	Yıkama Tamponundaki %FA konsantrasyonu										
	%0	%5	%10	%15	%20	%25	%30	%35	%40	%45	%50
5M NaCl	9,0	6,30	4,50	3,18	2,15	1,49	1,02	0,70	0,46	0,30	0,18
1M Tris-HCl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,5M EDTA	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ddH ₂ O											

^a Hacimler ml biriminde ve son hacim daima 50 ml dir. FA=formamide, SDS=sodium dodecyl sulfate

FISH yönteminde genel olarak 15–30 nükleotid içerecek uzunlukta ve tek bir floresan boyaya kovalent olarak bağlanmış oligonükleotid problemler kullanılmaktadır. Fluorescein, tetramethylrhodamine, Texas red, Cy3 or Cy5 gibi carbocyanine boyalar yaygın olarak kullanılan floresan boyalar (fluorophores) arasında yer almaktadır (AMANN ve DİĞ., 2001). Gıda kaynaklı mikroorganizmaların saptanmasında kullanılan problemler ve bazı özellikleri Tablo 4'te yer almaktadır.

Bakterilerin ya da incelenecek mikroorganizmanın kültürünü gerektirmeyen FISH yönteminde hedef zarar görmemiş, eksiksiz bir bakteri hücresinde tespit edilirken bakteri cins ve türlerinin yerinde saptanması ve miktarının belirlenmesi mümkündür. Moleküler analiz yöntemlerinin bazılarında yer alan PCR analizini gerektirmeyen bu yöntem ile hücrelerin saptanması, morfolojik tanımlaması, hücrelerin dağılımının ve hatta dokunun histolojik bölümlerinin incelenmesi yapılabilmektedir. Sayıca baskın bakteri türlerinin saptanabildiği ve sayılabildiği bu yöntemde gram pozitif bakteriler gibi bazı bakteriler için gereken ön işlemler, fazla sayıda örnek analiz edilmesi durumunda ve daha doğru sayım sonuçları elde edilebilmesi için otomasyon gerektirmesi ve prob spesifitesinin sadece bilinen bakteriler için geçerli olması bu yöntemin dezavantajlarıdır.

Tablo 4. Gıda kaynaklı mikroorganizmaların saptanmasında kullanılan bazı probler ve özellikleri

Mikroorganizma	Prob	Hedef Bölge (rRNA pozisyonu)	%FA	Referanslar
Bakteri	EUB338	16S (338-355) ^a	0-60	AMANN ve DİĞ., 1990
<i>Bifidobacterium</i>	BIF164	16S (164-181) ^a	0	LANGENDIJK ve DİĞ., 1995
<i>Brevibacterium</i>	BRE1239	16S (1239-1257) ^a	30	KOLLOFFEL ve DİĞ., 1997
<i>Betaproteobacteria</i>	Bet42a	23S (1027-1043) ^a	35	MANZ ve DİĞ., 1992
<i>Gammaproteobacteria</i>	Gam42a	23S (1027-1043) ^a	35	MANZ ve DİĞ., 1992
<i>Actinobacteria</i>	HGC69a	23S (1901-1918) ^a	25	ROLLER ve DİĞ., 1994
<i>Campylobacter</i>	CAMP653	16S (653-670)	35	SCHMID ve DİĞ., 2005
<i>Firmicutes</i>	LGC354ab	16S (354-371) ^a	35	MEIER ve DİĞ., 1999
<i>Lactococcus lactis</i>	LactV5	16S (821-839) ^a	25	ERCOLINI ve DİĞ., 2003b
<i>Leuconostoc</i>	LU2	16S (221-242) ^a	0	NISSEN ve DİĞ., 1994
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i>	Lpara	16S (94-113) ^a	0	BLASCO ve DİĞ., 2003
<i>Lactobacillus brevis</i>	Lbrev	16S (64-83) ^a	0	BLASCO ve DİĞ., 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LbpV3	16S (468-486) ^a	25	ERCOLINI ve DİĞ., 2003b
<i>Listeria</i>	Lis-637	16S (288-305) ^a	35	SCHMID ve DİĞ., 2003
<i>Listeria</i> , <i>Brochothrix</i>	Lis-1255	16S (1255-1272) ^a	35	WAGNER ve DİĞ., 1998
<i>Salmonella</i>	Sal-3	23S	35	VIEIRA-PINTO ve DİĞ., 2008
<i>Oenococcus oeni</i>	OENOS 5/1	5S	0	HIRSCHHAUSER ve DİĞ., 2005
<i>Oenococcus oeni</i>	OENOS 5/2	5S	0	HIRSCHHAUSER ve DİĞ., 2005
<i>Oenococcus oeni</i>	OENOS 5/3	5S	0	HIRSCHHAUSER ve DİĞ., 2005
<i>Enterobacteriaceae</i>	ENT D	16S (1251-1274) ^a		OOTSUBO ve DİĞ., 2002
<i>Escherichia coli</i>	ECO1482	16S (1482-1499) ^a	30	FUCHS ve DİĞ., 1998
<i>Pseudomonas</i> spp.	Pae997	16S (997-1014) ^a	0	AMANN ve DİĞ., 1990
<i>Pseudomonas</i> spp.	PS	16S (1284-1304) ^a	0	GUNASEKERA ve DİĞ., 2003
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Sth	16S (69-87) ^a	25	BEIMFOHR ve DİĞ., 1993
Eukarya	EUK	18S (502-517) ^a	20	AMANN ve DİĞ., 2003

^a *Escherichia coli* rRNA numaralandırmasına göre

^b *Bacillus subtilis* rRNA numaralandırmasına göre

^c Hibridizasyon tampon çözeltisindeki formamide (FA) konsantrasyonu (vol/vol)

GEREÇ VE YÖNTEM

1. GEREÇ

1.1. Referans Bakteri Kültürleri

Yöntemlerin duyarlılıklarının test edilmesi için 3 farklı *E. coli* suşu, 2 farklı *Salmonella enterica* serotipi (*S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*), 2 farklı *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* suşu, 2 farklı *Listeria* türü (*Listeria innocua* ve *Listeria monocytogenes*) ve 2 farklı *L. monocytogenes* suşu kullanılmıştır (Tablo 5). Çalışmada standart geleneksel (kültürel) yöntemlerde ve yapay inokülasyon yapılan gıdalarla ilgili denemelerde aşağıdaki bakteri kültürleri kullanılmıştır.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan referans bakteri kültürleri

Bakteri Kültürü	ATCC No	Orjin
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	Klinik izolat
<i>E. coli</i> K12	ATCC 25253	<i>E. coli</i> K-12'den türetilmiştir
<i>E. coli</i> NCTC12900	ATCC 700728	serotype O157:H7, toksijenik değil
<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445		
<i>S. Enteritidis</i>	ATCC 13076	
<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 51812	İnsan kanı
<i>Listeria innocua</i> Seeliger	NRRL-B 33314	Hindi/jambon (ham)/peynir deli sticks (CA, USA)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	Kanatlı eti (İngiltere), serotype 1
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19118	Tavuk, (İngiltere)

1.2. Gıda Örnekleri

Çalışmada bakteri kültüründen inokülasyon yapılacak materyal olarak belirli bir semtteki hipermarketten, inokülasyon denemelerinden 1 gün önce satın alınan taze kanatlı etleri (tavuk fileto/hindi fileto) ve dana eti kıyması kullanılmıştır. Materyallerde yapay inokülasyon uygulanmadan önce söz konusu mikroorganizmaların varlığı/yokluğu standart (geleneksel kültürel) yöntemle saptanmıştır.

Çalışmada Mart 2009-Şubat 2010 arasında İzmir'in farklı semtlerindeki marketlerden (Firma A, B, C) ve kasaplardan (Kasap D, E, F) 72 adet tavuk göğüs filetosu (Firma A, B, C), 72 adet hindi göğüs filetosu (Firma A) ve 72 adet kıyma örneği (Firma A, B, C; Kasap D, E, F) olmak üzere toplam 216 adet örnek Standart geleneksel (kültürel) yöntemler ve FISH tekniği ile analiz edilmiştir. Marketlerden tavuk, hindi ve kıyma örnekleri orijinal ambalajında (tavuk göğüs fileto ve kıyma) veya ambalajlanmamış (hindi göğüs fileto ve kıyma) örnekler satın alınmıştır. Kasaplardan ise satışa sunulduğu şekilde paketlenmiş örnekler (kıyma) satın alınmıştır. En az 200 g kıyma veya 3 adet tavuk/hindi göğüs fileto olmak üzere satın alınan örnekler, soğuk zincirde laboratuara getirilerek aynı gün içerisinde aseptik koşullarda analize alınmıştır.

1.3. Çözelti ve Besiyerleri

FISH tekniğinde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışı ve EK-1'de verilmektedir. Standart geleneksel (kültürel) yöntemler ile referans kültürlerin yapay olarak inokule edildiği ve mikroorganizma inoküle edilmeyen piyasadan satın alınan örneklerde söz konusu mikroorganizmaların saptanmasında kullanılan çözelti, ayıraç ve hazır besiyerleri (Bkz. Yöntem) satın alındığı firmanın direktiflerine göre hazırlanmıştır.

1.4. Bakteri Probları

FISH yönteminde kullanılan oligonükleotid proplar (Thermo Fisher Scientific, Almanya) tek zincirli, 18 bp uzunluğunda, HPLC saflığında ve 5' ucundan florokromlar (Cy3) ile işaretlenmiştir. 23S rRNA'yı hedefleyen Sal3 probu hariç sentezlenen diğer proplar 16S rRNA'yı hedef almaktadır (Tablo 6). Hibridize edilecek her bir örnek için non-sense prob (non 338, spesifik olmayan bağlanmaların gözlenmesi için), universal prob (univ 1390, hücre geçirgenliğinin ve rRNA seviyesinin kontrolü için), bakteri probu (Eub 338, Eub 338 II, Eub 338 III), *Escherichia coli* probu, *Enterobacteriaceae* probu (Ent), *Salmonella* (Sal3) ve *Listeria* (Lis637) propları kullanılmıştır (EK-2).

Tablo 6. Sentezlenen problemlerin isimleri ve sekansları

Prob ismi	5' Prob Sekansı 3'	Hedef (Spesifisite)	Referans
NonEub338	ACT CCT ACG GCA GGC AGC	^a -	AMANN ve DİĞ., 1990, 1995; MANZ ve DİĞ., 1993; WALLNER ve DİĞ., 1993
Univ1390	GAC GGG CGG TGT GTA CAA		
Eub338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	<i>Eubacteria</i>	AMANN ve DİĞ., 1990, 1995
Eub338II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Bakteri	DAIMS ve DİĞ., 1999
Eub338III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Bakteri	DAIMS ve DİĞ., 1999
Ent16S	CCC CCW CTT TGG TCT TGC	<i>Enterobacteriaceae</i> ^o	KEMPF ve DİĞ., 2000
Sal3	AATCACTTCACCTACGTG	<i>Salmonella</i>	VIEIRA-PINTO ve DİĞ., 2008
Lis637	CAC TCC AGT CTT CCA GTT TCC	<i>Listeria</i>	SCHMID ve DİĞ., 2003

^a Prob NonEub338, Eub338'e komplementer (oligonükleotidlerin mikroorganizmalara spesifik olmayan bağlanmasını saptanması için kullanılmıştır)

^b *Proteus* spp. hariç

1.5. Epifloresan Mikroskop



Şekil 2. Denemelerde kullanılan epifloresan mikroskop

Görüntü alma aşamasında floresan ataçmanlı, ProgRes (Jenoptik, Germany) dijital kamera sistemi ile birleştirilmiş Olympus BX51 mikroskobu (Şekil 2) ve Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) Image Processing and Analysis Software (version 6.0) yazılımı kullanılmıştır. Mikroskopta yüksek basınçlı civa lambası (100-watt) ışık kaynağı bulunmaktadır.

2. YÖNTEM

2.1. Deneme Planı

Yapay inokulasyon uygulanan (örneklerde 10^4 ve 10^8 olacak şekilde) her bir materyal için inokulasyon yapılmamış örnekler kontrol grubunu oluşturmaktadır (Tablo 7). Analizler her bir materyal için (tavuk fileto, hindi fileto ve kıyım örneklerinin her biri için) 3 tekrar ve 2 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda bir mikroorganizmanın yapay inokulasyonu uygulanan her bir materyal için (örneğin tavuk fileto) 12 örnekte (2x3x2) yapılmıştır. 3 farklı mikroorganizmanın yapay inokulasyonu uygulanan örnek (tavuk fileto) için ise toplam 36 örnekte (3x2x3x2) standart (geleneksel kültürel) yöntem ve FISH yöntemi ile mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. (tavuk fileto+hindi fileto+kıyım örneği için: $36 \times 3 = 108$ toplam örnek sayısı).

Tablo 7. Deneylerde kullanılan mikroorganizma, gıda örnekleri, inokulum seviyesi ve sayım yöntemleri

Bakteri kültürü	Gıda Örneği	İnokulum seviyesi	Sayım yöntemi
<i>E. coli</i> ATCC 25922	tavuk fileto	10^4	Standart kültürel
<i>E. coli</i> K12	hindi fileto	10^8	FISH
<i>E. coli</i> NCTC12900	kıyım		
<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445			
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076			
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 51812			
<i>L. innocua</i> Seeliger NRRL-B 33314			
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111			
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118			

2.2. İnokülasyon Yapılmadan Önce Tavuk/hindi Fileto ve Kıyma Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analizler

Çalışmada kullanılan gıda örneklerinde gerçekleştirilen mikrobiyolojik analizler, *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* varlığının araştırılması için standart geleneksel kültürel yöntemler kullanılmıştır (Tablo 8).

Tablo 8. İnokülasyon yapılmadan önce tavuk/hindi fileto ve kıyma örneklerine uygulanan geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analizler

Et Örneği	Mikrobiyolojik Analiz				
	Toplam Canlı Sayımı	<i>Enterobacteriaceae</i> / Coliform Sayımı	<i>E. coli</i> Sayımı	<i>Salmonella</i> aranması	<i>Listeria</i> aranması
Taze tavuk fileto	✓	✓	✓	✓	✓
Taze hindi fileto	✓	✓	✓	✓	✓
Taze kıyma	✓	✓	✓	✓	✓

2.2.1. Toplam Canlı Sayımı

Toplam Canlı Sayımı Standart (ISO 4833:2003) plak sayım tekniğine göre gerçekleştirilmiştir (ANONYMOUS, 1989).

2.2.2. Koliform sayımı

Koliform sayımı standart (ISO 4832:2006) plak sayım tekniğine göre gerçekleştirilmiştir (ANONYMOUS, 2006).

2.2.3. *Enterobacteriaceae* sayımı

Enterobacteriaceae sayımı Standart (ISO 21528–2) plak sayım tekniğine göre gerçekleştirilmiştir (ANONYMOUS, 2004).

2.2.4. *E. coli* aranması/sayımı

Tavuk fileto, hindi fileto ve kıyma örneklerinde (bakteri kültürleri inoküle edilmeden önce) ISO 7251 standart çoklu tüp (MPN) yöntemine göre *E. coli* sayımı yapılmıştır. Bu yöntemde homojenize edilen örnekler uygun oranda dilüsyon sıvısı % 0,1'lik peptonlu su (Peptone water, Difco) ile seyreltikten sonra her bir dilüsyondan Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LSTB, Difco) ve Durham tüpü içeren 3 tüpe birer mL ekim yapılarak tüpler 37°C'de 24-48 h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gaz oluşumu gözlenen tüplerden EC Broth (EC Broth, Difco) ve Durham tüpü içeren test tüplerine ekim yapılarak ve 44,5°C'de 24-48 h inkübe edilmiştir. Gaz oluşumu gözlenen EC Broth tüplerinden Nutrient Agar (NA, Difco) besiyerlerine çizim yöntemiyle ekim yapılarak elde edilen kültüre biyokimyasal testler uygulanmıştır (IMViC: indol, metil red, voges proskauer ve sitrat). Kanıtlama testlerinden sonra örneğin gramındaki *E. coli* sayısı MPN tablosundan saptanmıştır (ANONYMOUS, 2005).

2.2.5. *Salmonella* türlerinin aranması

Tüm örnekler (bakteri kültürleri inoküle edilmeden önce) ISO 6579 *Salmonella* aranması standart kültürel yöntemde analiz edilmiştir. Kısaca, bu yöntemde göre 225 ml tamponlanmış peptonlu suda (BPW, Merck 1.027228.05) homojenize edilen 25 g örnek 37°C for 18 ± 2 h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra soya içeren Rappaport-Vassiliadis besiyerine (RVS broth, Merck 1.0770) ve Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth (MKTTn broth, Merck, 1.07709) seçici besiyerlerine sırasıyla 0,1 mL ve 1 mL ekim yapılmıştır. Ekim yapılan RVS broth 41,5 ± 1°C'de 24 h; MKTTn broth 37°C'de 24 h inkübasyona bırakılmıştır. Her iki seçici zenginleştirme kültüründen ayrı ayrı olmak üzere Brilliant Green Phenol Red Agar (BGA, Merck 1.10747) ve Bismuth Sulphite Agar (BSA, 273300) veya Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLDA, Oxoid CM469) seçici ayırt edici besiyerlerine çizim yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 h inkübasyondan sonra şüpheli *Salmonella* kolonilerinden alınarak biyokimyasal ve serolojik testler [(oxidase test, triple sugar iron agar (TSIA, Oxoid CM277), urea broth (Merck 1.08483), L-lysine decarboxylation medium (Difco 211363) ve serolojik agglutination testleri (Poli A-I & Vi antiserum (Difco 222641))] uygulanmıştır (ANONYMOUS, 2002).

2.2.6. *Listeria* türlerinin aranması

Tüm örnekler (bakteri kültürleri inoküle edilmeden önce) ISO 11290 *Listeria* aranması standart kültürel yöntemde göre analiz edilmiştir. Kısaca, bu yöntemde göre ½ Fraser Broth (Merck) homojenize edilen örnekler 30°C'de 24±2 h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra ön zenginleştirme

kültüründen Oxford *Listeria* Slective Supplement içeren (Merck 1.07006) Oxford Agar (Merck 1.07004) ve Palcam Antimicrobial Supplement (Difco 263710) içeren Palcam Agar (Difco 263620) seçici ayırt edici besiyerlerine çizim yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37°C'de 24-48 h inkübasyondan sonra elde edilen şüpheli kolonilere gram boyama, katalaz testi, hareketlilik testi, API-*Listeria* tanımlama kitleri (Bio-Meriéux, France) tanımlama amacıyla uygulanmıştır (ANONYMOUS, 2005).

2.3. İnokülasyon Yapıldıktan Sonra Tavuk/hindi Fileto ve Kıyma Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analizler

E. coli, *Salmonella* ve *Listeria* inokülasyonu yapılan örneklerde *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* sayımları yapılmıştır. Örneklerdeki mikroorganizmaların sayımları standart yöntemlere göre yapılmıştır.

2.4. İnokulum Hazırlanması ve Gıdalara İnokülasyon

E. coli, *Salmonella* ve *Listeria* kültürlerinin uygun yoğunlukta (10^4 ve 10^8 cfu/g) gıdalara inokülasyonu için inokulumun hazırlanması sırasında inokulum miktarının ayarlanması yoğunluk ölçer (densitometre, DEN-1) kullanılmak sureti ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre inokulum seviyeleri, hücre süspansiyonunun yoğunluğu McFarland ünitesi olarak ölçüldükten ve densitometre'de elde edilen üniteye karşılık gelen hücre yoğunluğundan (Tablo 9) hesaplanarak inokulum miktarı ayarlanmıştır. İnokulum yapılmadan önce ayrıca bakteri kültürlerinin mililitresindeki hücre sayısı plak sayım yöntemi ile de belirlenmiştir.

Tablo 9. Yoğunluk ölçerde McFarland standardına karşılık gelen hücre yoğunluğu^a

McFarland	Bakteriyel yoğunluk	Teorik optik yoğunluk (550 nm)
0,5	150×10^6	0,125
1	300×10^6	0,25
2	600×10^6	0,50
3	900×10^6	0,75
4	1200×10^6	1,00
5	1500×10^6	1,25

^a Yoğunluk ölçümleri 550 nm'de gerçekleştirilmiştir

Bakteriler 37°C'de 18 saat TSA besiyeri yüzeyine çizim yöntemiyle ekim yapılarak aktive edildikten sonra 5000 rpm/ 5 dk /4°C de santrifüjlenerek hücreler toplanmıştır. Daha sonra sıvı faz (süpernatant) atılarak hücreler (pellet) 10 ml Buffered Peptone Water ile süspansiyon edilmiş ve hücre sayısı seçici ve ayırt edici besiyerinde ekim yapılarak saptanmıştır (BHAGWAT, 2003; HEIN ve DİĞ., 2005). Her bir patojen bakteri uygun hücre yoğunluğunu elde etmek için suyla seyreltilmiştir. Elde edilen dilüsyonlar kanatlı etlerini ve kıymayı kontamine etmek için kullanılmıştır.

Her bir örnekten 25 g steril stomacher torbasına tartılmış ve yapay inokülasyon denemesi için test örneği olarak kullanılmıştır. Tavuk ve hindi filetolarına 18 saatlik bakteri kültüründen ($1,5 \times 10^8$ - $6,0 \times 10^8$ cfu/ml) 0,1 ml fileto yüzeyine (25 g) yaymak, kıyma örneklerine ise 0,1 ml (10 g) karıştırmak suretiyle örneklerde 10^4 ve 10^8 cfu/g olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Tavuk ve hindi filetolarına inokülasyon yapıldıktan sonra 20 dakika hücrelerin tutunması için beklenmiştir.

2.5. FISH Yöntemi

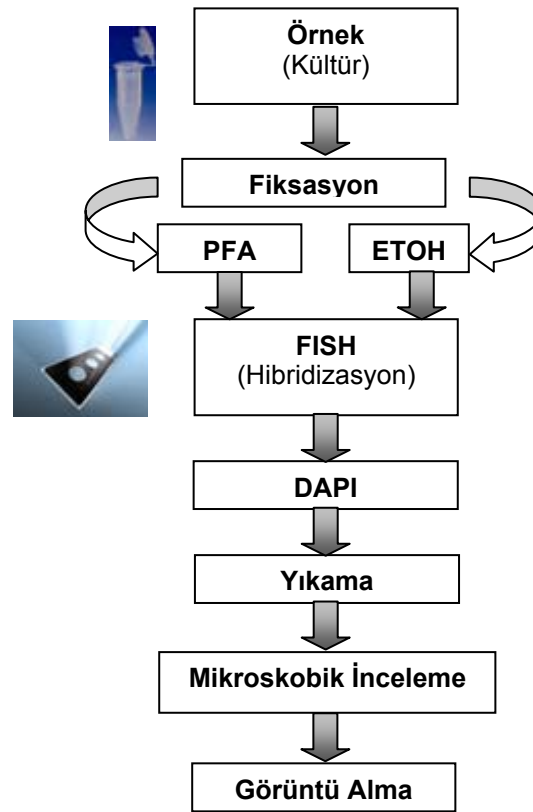
FISH yönteminde hibritleme çalışmalarında AMANN ve DİĞ. (1990), MANZ ve DİĞ. (1992) ve ERCOLINI (kişisel görüşme, 2009) tarafından tanımlanan protokoller temel alınmış, numune alınması, saklanması, fikslenmesi ve hibritlemeler INCE ve DİĞ. (2006, 2007), KOLUKIRIK ve DİĞ. (2007), EYİCE ve DİĞ. (2007) çalışmalarında ve ERCOLINI (kişisel görüşme, 2009) belirtilen şekilde yapılmıştır. Bu projede bahsi geçen patojen organizmaları tespit etmek için literatürde daha önce tanımlanmış olan hibritleme problemleri kullanılmıştır (BKZ. Gereç ve Yöntem). Bu nedenle hibritlemelerin gerçekleştirileceği sıcaklık, tuz ve formamit konsantrasyonları literatürde verilen değerlerde deneyler yapılmıştır (Tablo 2 ve 3).

Elde edilen problemlerle FISH yönteminin uygulanabilirliğini saptamak amacıyla söz konusu indikatör ve patojen bakterilerin (*E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*) kanatlı etleri (hindi/tavuk) ve kıyma örneklerine inokülasyonu yapıldıktan sonra örneklerde FISH yöntemi ile tespit edilmesine ilişkin çalışmalar farklı inokulum miktarları (10^4 - 10^8 CFU/g olmak üzere) kullanılmak suretiyle denemeler gerçekleştirilmiştir.

Floresanlı Yerinde Hibritleme (FISH) protokolü fiksasyon, hibridizasyon ve mikroskop ile tanımlama olmak üzere üç adımdan oluşmaktadır. Denemelerde kullanılan FISH yöntemi örnek hazırlama, paraformaldehit (PFA) ve etanol (ETOH) fiksasyonu, hibridizasyon, yıkama ve görüntü aşamalarını içermektedir. (Şekil 3). Bu amaçla kullanılan FISH protokolü aşağıda belirtilmektedir.

Örnekler aseptik olarak alınmış ve buzdolabı koşullarında laboratuara transfer edildikten sonra Buffered Peptone Water (BPW, Merck-1.07228) ile seyreltilmiş (1:10) stomacherda (Interscience) 90 sn homojenize edildikten sonra FISH protokolü uygulanmıştır.

Örneklere mikroorganizmaların inoküle edildiği durumlar için FISH protokolünden önce ön zenginleştirme aşaması uygulanmamıştır. Ancak piyasadan alınan örneklerde mikroorganizmaların aranması amacı ile yapılan denemelerde FISH protokolünden önce ön zenginleştirme aşaması uygulanmıştır.



Şekil 3. FISH yönteminin aşamaları

2.5.1. Örnek Alma

Örnekler % 50 etanol : % 50 örnek (v:v) olacak şekilde alınmıştır.

2.5.2. Fiksasyon

Paraformaldehit (PFA) veya etanol (ETOH) fiksasyonu uygulanmıştır. PFA çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır. Etanol-örnek karışımından 1 mL cam tüplere alınmıştır. Tüpler 5 dk vortekslelendikten sonra 1 mL mikrofüj tüpe aktarılmıştır. Örnek 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlendikten sonra örneğin üst fazı atılmıştır. Kalan çökeltinin üzerine 0,5 mL 3XPBS ilave edilmiş ve çökelti homojenize olana dek (50-100 kez) mikropipetle karıştırılmıştır. PBS ile yıkanan örnek 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlendikten sonra örneğin üst fazı atılmıştır.

2.5.2.1. PFA Fiksasyonu

Çökeltinin üzerine 0,25 mL 3XPBS ilave edilerek karıştırılmıştır (25-50 kez mikropipetle karıştırılmıştır). 0,25 mL PBS karıştırıldıktan sonra 0,75 mL PFA ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır (25-50 kez mikropipetle karıştırılmıştır). Örnek PBS-PFA karışımı içerisinde gece boyu +4°C'de bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlenmiş ve üst fazı atılmıştır.

Örneklere 0,5 mL 3XPBS ilave edilerek karıştırılmış (100 kez mikropipetle karıştırılmıştır). 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlenmiş ve üst fazı atılmıştır. 0,5 mL saf etanol + 0,5 mL 3XPBS ilave edilerek homojenize edilmiştir.

2.5.2.2. ETOH Fiksasyonu

0,5 mL saf etanol + 0,5 mL 1XPBS eklenecek homojenize edilmiştir (100 kez mikropipetle karıştırılmıştır).

2.5.3. Hibridizasyon

Hibridizasyon için etüv 46°C'ye ayarlanmıştır. 50 mL'lik tüplere % 50-% 80 ve % 96'lık etanol hazırlanmıştır. Fikse edilmiş örnekler 5 dk vortekslenmiş, 3 dk pipetaj yapılmış (100 µL pipet ucu ile) daha sonra 3 dk vortekslenmiştir. Fikse edilmiş örnek mirofüj tüpe alınarak 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen örneğin üst fazı atılmıştır (100 µL pipet ucu ile). Daha sonra örnek üzerine 3XPBS ilave edilerek çökelti homojenize edilmek için karıştırılmıştır (25-50 kez mikropipetle karıştırılmıştır). Örnek 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlendikten sonra üst fazı atılmış ve çökeltinin üzerine 1XPBS ilave edilmiştir. Çökelti homojenize olana dek mikropipetle karıştırılmış (50-100 kez), 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlenmiş ve üst fazı atılmıştır. Çökeltinin üzerine 0,5 mL deiyonize su ilave edilmiş çökelti homojenize olana karıştırılmıştır (50-100 kez mikropipetle karıştırılmıştır). 13000 rpm'de 3 dk santrifüjlendikten sonra üst fazı atılmış ve örnek yoğunluğuna bağlı olarak (1000 µL) deiyonize su ilave edilmiş, daha sonra (100-200 kez mikropipetle) karıştırılmıştır. Homojenize edilen örneklerden teflon kaplı lam yüzeyindeki kuyuların üzerine 20 µL koyularak 46°C'de kurutulmuştur. Kuruyan lam sırasıyla % 50, % 80, % 96 etanolde 3'er dakika bekletilerek % 96 etanolden alındıktan sonra 46°C'de kurutulmuştur. Her kuyuya 17 µL hibridizasyon tampon çözeltisi 3 µL prob ilave edilmiştir. Lam daha sonra hazırlanan hibridizasyon tüpüne kuyular üst tarafta kalacak şekilde yerleştirilmiştir. En az 3 saat (en fazla gece boyunca) 46°C'de hibridizasyona bırakılmıştır.

2.5.4. Yıkama

Yıkama tampon çözeltisi hazırlanmış (2 tüp) ve 46°C'de bekletilmiştir. 2 tüp 2Xbidistile su +4°C'de bekletilmiştir. Hibridizasyon süresinin sonunda kuyulara 1 µL 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) ilave edilmiş ve 46°C'de hibridizasyon tüpünde 15 dk bekletilmiştir. Lam 1. ve 2. yıkama tampon çözeltisi bulunan tüplerde sırayla 7'şer dk 46°C'de bekletilmiş ve daha sonra 10 sn süresince 4°C'deki 2Xbidistile suya daldırılmıştır.

2.5.5. Görüntü Alma

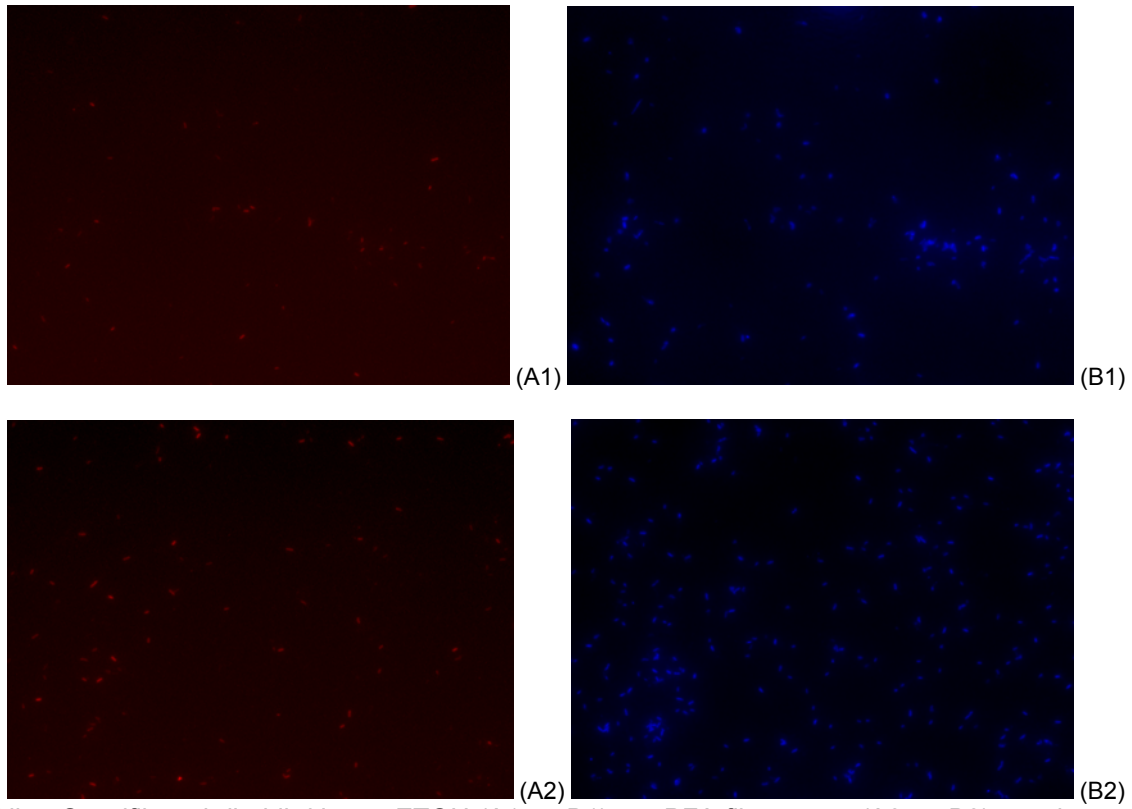
Kuyuların üzerine 5 µL anti-soldurucu ilave edilmiş lamın üzerine lamel kapatılarak/sabitlenerek floresan mikroskopta incelenmiştir. Görüntülerin elde edilmesinde B, G ve UV exitasyon filtreleri kullanılmıştır. İnceleme sırasında kullanılan probun dalga boyuna uygun filtre seti kullanılmıştır. Görüntüler özel Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) Image Processing and Analysis Software (version 6.0) programı olan ProgRes (Jenoptik, Germany) dijital kamera ile çekilmiştir. Mikroorganizma kültürlerinin inokülasyonu yapılan ve piyasadan satın alınan her bir örnek için en az 20 rastgele alan görüntüsündeki hücre sayıları belirlenmiş ve ortalama değer hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

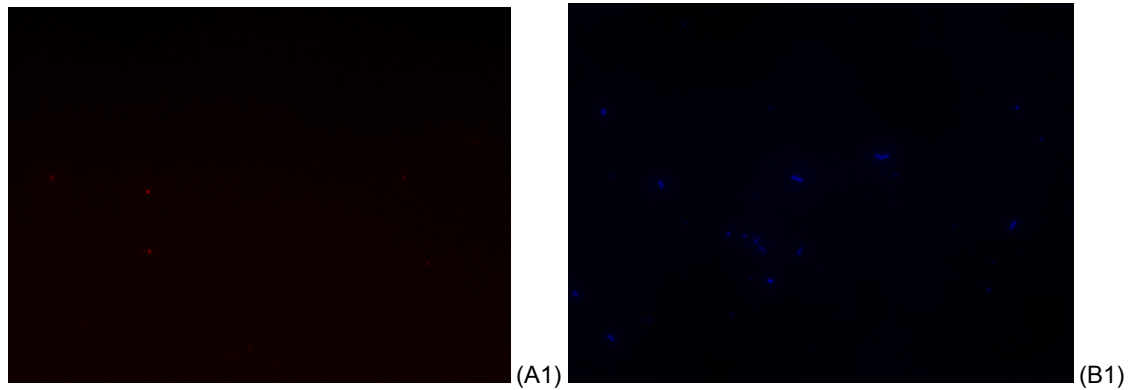
Elde edilen problemlerle Floresanlı Yerde Hibritleme (FISH) yönteminin uygulanabilirliğini saptamak amacıyla İYTE Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında mevcut kültürlerle (*Escherichia coli*, *Salmonella* ve *Listeria*) denemeler gerçekleştirilmiştir. FISH yönteminin gerçekleştirilmesi için hibritleme çalışmalarında AMANN et al. (1990), MANZ et al. (1992) ve ERCOLINI (kişisel görüşme, 2009) tarafından tanımlanan protokoller temel alınmış, numune alınması, saklanması, fikslenmesi ve hibritlemeler INCE et al. (2006, 2007), KOLUKIRIK et al. (2007), EYİCE et al. (2007)'da ve ERCOLINI (kişisel görüşme, 2009) belirtilen şekilde yapılmıştır. Kullanılan FISH protokolü örnek hazırlama, fiksasyon, paraformaldehit (PFA) ve etanol (ETOH) fiksasyonu, hibridizasyon, yıkama ve görüntü aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 1).

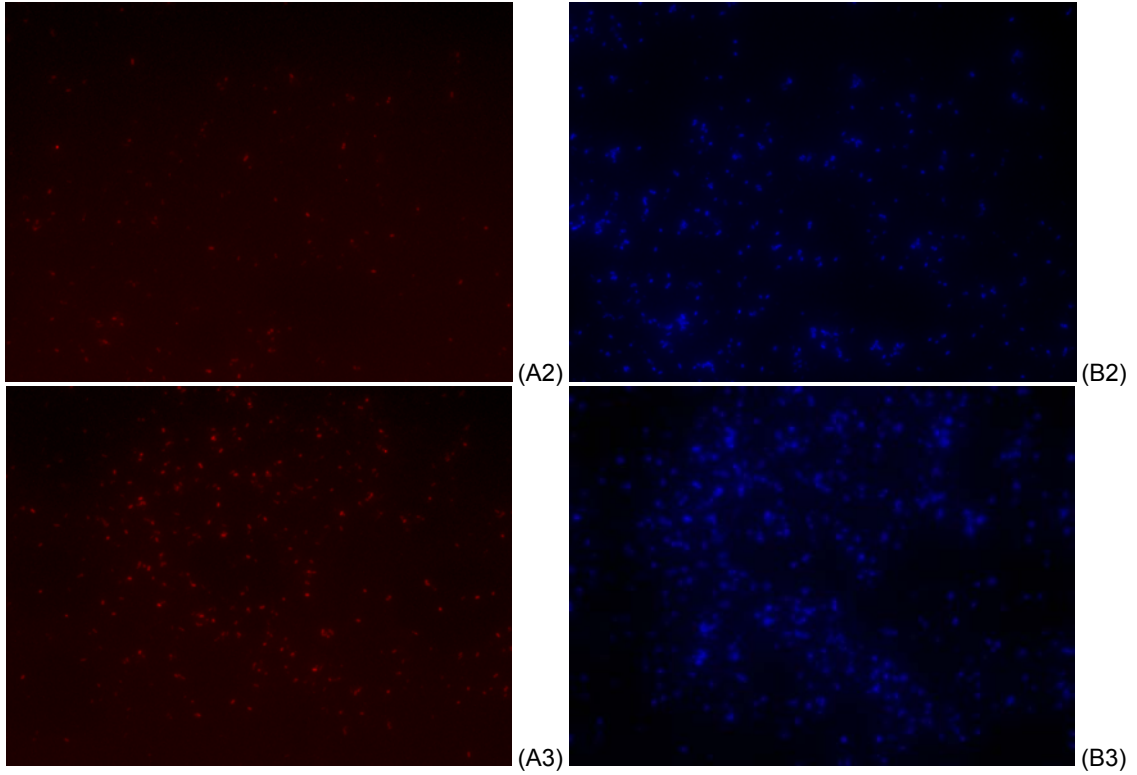
Söz konusu bakterileri FISH yöntemi ile tespit etmek için literatürde daha önce tanımlanmış olan hibritleme problemleri kullanılmıştır (BKZ. Gereç ve Yöntem). Bu nedenle hibritlemelerin gerçekleştirileceği sıcaklık, tuz ve formamit konsantrasyonları literatürde verilen değerlerde deneyler yapılmıştır (Tablo 2 ve 4). İndikatör ve patojen bakterilerin kültürlerinde FISH yöntemi ile tespit edilmesine ilişkin çalışmalar farklı seyreltme oranları kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir.

Cy3 boyası ile işaretli prob lar ile hibridize olan hücreler mikroskop görüntülerinde kırmızı ışımaya vermiş (A kodlu fotoğraflar) ve aktif/canlı hücreler olarak değerlendirilmiştir. DAPI ile elde edilen görüntülerde (B kodlu fotoğraflar) ise hücreler floresan mikroskopunda mavi ışımaya vermiştir. Buna göre, FISH yöntemi ile incelenen kültürlerin hepsi kırmızı ışımaya vermiş ve ortamda *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. innocua* varlığı saptanmıştır (Şekil 4-6). Spesifik olmayan bağlanmaların kontrolü amacı ile nonspesifik olmayan prob lar elde edilen görüntüler Şekil 7’de verilmektedir. Epifloresan mikroskopta inceleme sonucunda elde edilen floresan görüntülerin fotoğrafları dijital kamera ile çekilmiştir. Söz konusu bakteri kültürlerine ait elde edilen floresan görüntüler kullanılan protokolün uygun olduğunu göstermiştir. Gerçekleştirilen denemelerde örneklerin 5, 10, 20 kat seyreltilmelerinin ve ETOH veya PFA fiksasyonu uygulamalarının her birisinin *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. innocua* hücrelerinin görüntülerinin elde edilmesindeki ve ışımaya üzerindeki etkinliği belirlenmiştir. Buna göre gram pozitif bir bakteri olan *L. innocua* için ETOH, gram negatif bir bakteri olan *S. Typhimurium* içinse PFA fiksasyonu uygulandığında elde edilen floresan görüntülerin daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Ancak *E. coli* için her iki fiksasyon tipi uygulandığında iyi floresan görüntü elde edildiği söylenebilir (Şekil 4-6).

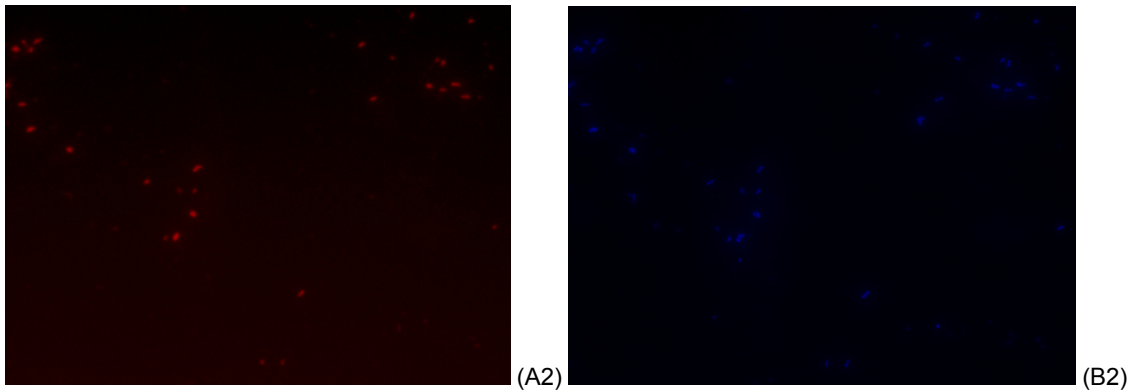
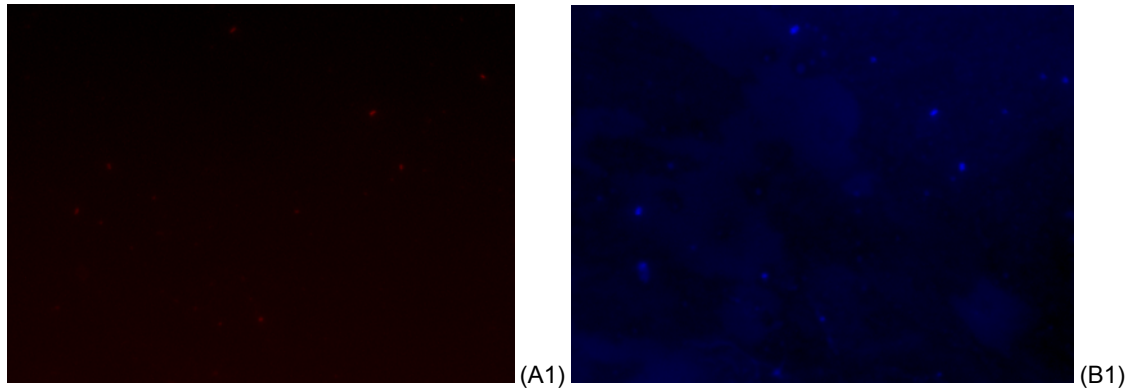


Şekil 4. Spesifik prob ile hibritlenen ETOH (A1 ve B1) ve PFA fiksasyonu (A2 ve B2) uygulanmış *E. coli* hücrelerinin FISH görüntüleri (20 kat seyreltme uygulanmıştır)

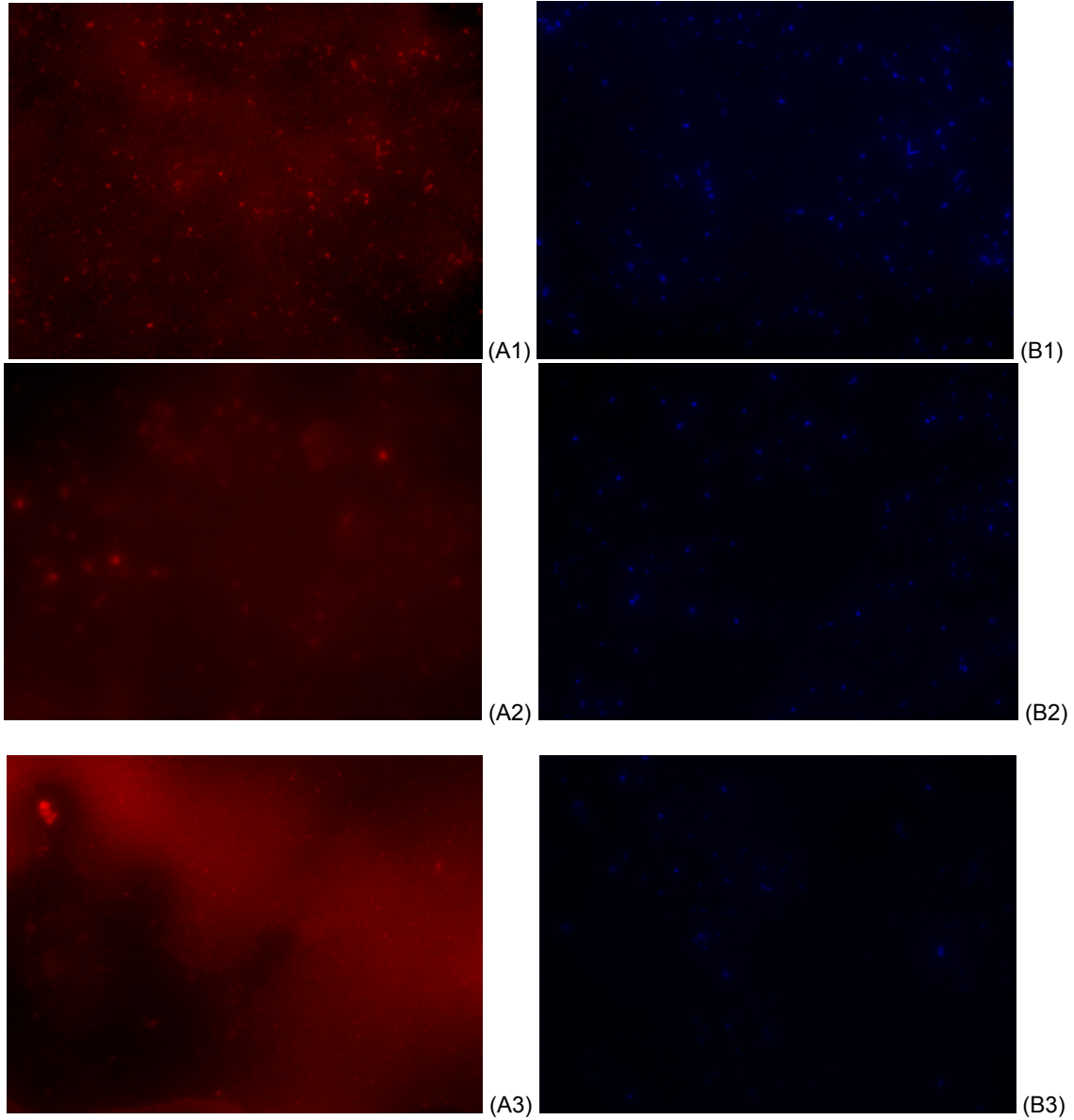




Şekil 5. Spesifik prob ile hibritlenen ETOH (A1 ve B1) ve PFA fiksasyonu (A2 ve B2, A3 ve B3) uygulanmış *Salmonella* Typhimurium hücrelerinin FISH görüntüleri



Şekil 6. Spesifik prob ile hibritlenen ETOH (A1 ve B1) ve PFA fiksasyonu (A2 ve B2) uygulanmış *Listeria innocua* hücrelerinin FISH görüntüleri (20 kat seyreltme uygulanmıştır)



Şekil 7. Nonspesifik prob ile hibritlenen ETOH fiksasyonu uygulanmış *E. coli* (A1 ve B1) ve *L. innocua* (A3 ve B3), PFA fiksasyonu uygulanmış (A2 ve B2) *Salmonella* Typhimurium hücrelerinin FISH görüntüleri (20 kat seyreltme uygulanmıştır)

İnokülasyon Yapılmadan Önce Tavuk/hindi Fileto ve Kıyma Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Çalışmada mikroorganizma inokülasyonu yapılmak üzere kullanılan gıda örneklerinde inokülasyon yapılmadan önce gerçekleştirilen standart geleneksel kültürel toplam canlı, Koliform, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* sayımı, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin aranması için yapılan analiz sonuçları Tablo 10'da verilmektedir. Analizi yapılan tavuk fileto, hindi fileto ve kıyma örneklerinin hiçbirinde *Salmonella* ve *Listeria*'ya rastlanılmamıştır.

Çiğ Kanatlı Eti ve Hazırlanmış Kanatlı Eti Karışımları Tebliği (ANONYMOUS, 2006a) ve Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliği (ANONYMOUS, 2006b)'ne göre belirlenen mikrobiyolojik kriterler Tablo 11 ve 12'de verilmiştir. Bu kriterlere göre inokülasyon yapılmadan önce analiz edilen tavuk fileto, hindi fileto ve kıyma örneklerinin mikrobiyolojik kriterlere uygun olduğu saptanmıştır.

Tablo 10. İnokülasyon Yapılmadan Önce Tavuk/hindi Fileto ve Kıyma Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Et Örneği ^a	n	Mikrobiyolojik Analiz				
		Toplam Canlı Sayısı	<i>Enterobacteriaceae</i> /Coliform Sayısı	<i>E. coli</i> Sayısı	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Taze tavuk fileto	12	1,6x10 ⁴	6,36x10 ¹ / 0,7 x10 ¹	<3	0/25 g (negatif)	0/25 g (negatif)
Taze hindi fileto	12	7,6x10 ³	3,36x10 ¹ / 0,28 x10 ¹	<3	0/25 g (negatif)	0/25 g (negatif)
Taze kıyma	12	8,96x10 ⁴	7,15x10 ² / 5,8 x10 ¹	<3	0/25 g (negatif)	0/25 g (negatif)

^a Sonuçlar ortalama olarak verilmiştir (EK-4 Tablo 1-4)

Tablo 11. Çiğ Kanatlı Etlere için Mikrobiyolojik Kriterler (ANONYMOUS, 2006a)

	N	c	M	M
Aerobik mezofilik bakteri	5	2	5,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	5	2	5,0 x 10 ²	5,0 x 10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	5,0 x 10 ²	5,0 x 10 ³
<i>Pseudomonas</i>	5	2	5,0 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁵
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	25 g'da bulunmamalı	

n : Analize alınacak numune sayısı

c : m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma ihtiva eden kabul edilebilir en fazla analize alınacak numune sayısı

m : (n-c) sayıdaki analize alınacak numunenin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

M : c sayıdaki analize alınacak numunenin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

Tablo 12. Çiğ Kırmızı Et ve Kıyma için Mikrobiyolojik Kriterler (Anonymous, 2006b)

	N	c	M	M
Aerobik mezofilik bakteri	5	2	5,0x10 ⁵	5,0x10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	5	0	25 g'da bulunmamalı	
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	5,0x10 ²	5,0x10 ³
<i>Pseudomonas</i>	5	2	5,0 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁵
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	25 g'da bulunmamalı	

n : Analize alınacak numune sayısı

n : Analize alınacak numune sayısı

c : m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma ihtiva eden kabul edilebilir en fazla analize alınacak numune sayısı

m : (n-c) sayıdaki analize alınacak numunenin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

M : c sayıdaki analize alınacak numunenin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

İnokülasyon Yapıldıktan Sonra Tavuk/hindi Fileto ve Kıyma Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analiz ve FISH Sonuçları

E. coli inokülasyonu yapılan örneklerde Koliform ve *E. coli* sayımları, *Salmonella* inokülasyonu yapılmış örneklerde ise *Enterobacteriaceae* ve *Salmonella* sayımları yapılmıştır. İnokülasyon yapıldıktan sonra tavuk fileto, hindi fileto ve kıyma örneklerinde gerçekleştirilen geleneksel (Kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçları sırasıyla Tablo 13, 14 ve 15'te verilmiştir. FISH yöntemi için kullanılan her bir prob ilgili hedef bakteri türlerine ve suşlarına yüksek oranda spesifik bulunmuş ve ilgili hedef türlere ve suşlarla hibridize olmuştur. *E. coli* ve *Salmonella* için PFA, *Listeria* türleri için ise ETOH fiksasyonu uygulanmıştır. Çalışmada FISH yönteminde kullanılan Ent, Sal3 ve Lis637 problemleri *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerine ve suşlarına yüksek oranda spesifik bulunmuş ve ilgili hedef türlere ve suşlarla hibridize olmuştur. Cy3 boyası ile işaretli problemler ile hibridize olan hücreler mikroskop görüntülerinde kırmızı ışığa vermiş (A kodlu fotoğraflar) ve aktif/canlı hücreler olarak değerlendirilmiştir. DAPI ile elde edilen görüntülerde (B kodlu fotoğraflar) ise

hücreler floresan mikroskopunda mavi ışıkla boyanmıştır. *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerine ve suşlarına ilişkin elde edilen görüntülerden bazıları EK-3'te verilmiştir.

Tablo 13. İnokülasyon Yapıldıktan Sonra Tavuk Fileto Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analiz ve FISH Sonuçları

Bakteri kültürü	İnokulum Seviyesi (cfu/g)			
	10 ⁴		10 ⁸	
	TBXA	FISH	TBXA	FISH
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^a	3,31x10 ⁴	4,2x10 ⁴	2,0x10 ⁸	1,9x10 ⁸
<i>E. coli</i> K12	1,4x10 ⁴	3,3x10 ⁴	1,1 x10 ⁸	9,0 x10 ⁷
<i>E. coli</i> NCTC12900	5,0x10 ⁴	6,9x10 ⁴	1,6 x10 ⁸	3,1 x10 ⁸
	BSA	FISH	BSA	FISH
<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445	1,6x10 ⁴	1,9x10 ⁴	5,1x10 ⁸	5,78x10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	2,1x10 ⁴	1,53x10 ⁴	1,6x10 ⁸	1,49x10 ⁸
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 51812	2,0x10 ⁴	2,6x10 ⁴	3,6x10 ⁸	4,1x10 ⁸
	OA/PA	FISH	OA/PA	FISH
<i>L. innocua</i> Seeliger NRRL-B 33314 ^a	3,2x10 ⁴	4,0x10 ⁴	1,5x10 ⁸	2,3x10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	1,7x10 ⁴	1,0x10 ⁴	0,8x10 ⁸	1,5x10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	2,6x10 ⁴	6,0x10 ⁴	2,15x10 ⁸	2,0x10 ⁸

^a Sonuçlar ortalama olarak (n=12) verilmiştir.

TBXA: Tryptone Bile X-glucuronide Agar, BSA: Bismuth Sulphite Agar, OA: Oxford Agar, PA: Palcam Agar, FISH: Fluorescent *in situ* Hybridization

Tablo 14. İnokülasyon Yapıldıktan Sonra Hindi Fileto Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analiz ve FISH Sonuçları

Bakteri kültürü	İnokulum Seviyesi (cfu/g)			
	10 ⁴		10 ⁸	
	TBXA	FISH	TBXA	FISH
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^a	9,8x10 ³	1,2x10 ⁴	1,02x10 ⁸	7,66x10 ⁸
<i>E. coli</i> K12	8,7x10 ³	1,0x10 ⁴	3,3x10 ⁸	6,0x10 ⁸
<i>E. coli</i> NCTC12900	1,75x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,54x10 ⁸	4,4x10 ⁸
	BSA	FISH	BSA	FISH
<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445	4,1x10 ⁴	9,7x10 ³	6,2x10 ⁸	9,1x10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	4,4x10 ⁴	3,8x10 ⁴	1,1x10 ⁸	9,6x10 ⁷
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 51812	1,2x10 ⁴	1,5x10 ⁴	1,6x10 ⁸	1,6x10 ⁸
	OA/PA	FISH	OA/PA	FISH
<i>L. innocua</i> Seeliger NRRL-B 33314 ^a	1,1x10 ⁴	4,6x10 ⁴	4,0x10 ⁸	7,7x10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	1,6x10 ⁴	3,0x10 ⁴	1,2x10 ⁸	1,5x10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	3,2x10 ⁴	6,45x10 ⁴	0,5x10 ⁸	2,15x10 ⁸

^a Sonuçlar ortalama olarak (n=12) verilmiştir.

TBXA: Tryptone Bile X-glucuronide Agar, BSA: Bismuth Sulphite Agar, OA: Oxford Agar, PA: Palcam Agar, FISH: Fluorescent *in situ* Hybridization

İnokülasyon yapıldıktan sonra tavuk fileto, hindi fileto ve kıyma örneklerinde gerçekleştirilen geleneksel (Kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçları sırasıyla Tablo 10, 11 ve 12'de verilmiştir. Görüntülerin elde edilmesinde B, G ve UV exitasyon filtreleri kullanılmıştır. Görüntüler özel Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA) Image Processing and Analysis Software (version 6.0) programı olan ProgRes (Jenoptik, Germany) dijital kamera ile çekilmiştir. Mikroorganizma kültürlerinin inokülasyonu yapılan her bir örnek için 20 rastgele alan görüntüsündeki hücre sayıları belirlenmiş ve ortalama değer hesaplanmıştır.

Tablo 15. İnokülasyon Yapıldıktan Sonra Kıyma Örneklerine Uygulanan Geleneksel (Kültürel) Mikrobiyolojik Analiz ve FISH Sonuçları

Bakteri kültürü	İnokulum Seviyesi (cfu/g)			
	10 ⁴		10 ⁸	
	TBXA	FISH	TBXA	FISH
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^a	5,5x10 ⁴	6,61x10 ⁴	1,1x10 ⁸	7,6x10 ⁸
<i>E. coli</i> K12	1,4x10 ⁴	9,04x10 ⁴	3,2x10 ⁸	8,54x10 ⁸
<i>E. coli</i> NCTC12900	3,6x10 ⁴	8,5x10 ⁴	4,53x10 ⁸	2,22x10 ⁸
	BSA	FISH	BSA	FISH
<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445	4,25x10 ⁴	8,49x10 ³	3,1x10 ⁸	5,6x10 ⁸
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	1,3x10 ⁴	9,77x10 ³	2,2x10 ⁸	1,0x10 ⁸
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 51812	1,02x10 ⁴	8,52x10 ³	1,55x10 ⁸	1,3x10 ⁸
	OA/PA	FISH	OA/PA	FISH
<i>L. innocua</i> Seeliger NRRL-B 33314 ^a	3,0x10 ⁴	1,45x10 ⁴	3,5x10 ⁸	2,6x10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	2,1x10 ⁴	1,04x10 ⁴	1,6x10 ⁸	1,5x10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	1,6x10 ⁴	1,5x10 ⁴	2,5x10 ⁸	2,0x10 ⁸

^a Sonuçlar ortalama olarak (n=12) verilmiştir.

TBXA: Tryptone Bile X-glucuronide Agar , BSA: Bismuth Sulphite Agar, OA: Oxford Agar, PA: Palcam Agar, FISH: Fluorescent *in situ* Hybridization

Sonuç olarak bakteri inokülasyonu yapıldıktan sonra tavuk, hindi fileto ve kıyma örneklerine FISH yönteminin uygulanmasının mümkün olduğu ve standart kültürel sayım yöntemleriyle aynı derecede sonuç alınabildiği saptanmıştır.

Denemelerin ilk setinde gen problemlerinin özgüllüğü (specificity) mikroorganizmaların saf kültürleriyle test edilmiştir. Mikroorganizma kültürleri ve problemlerle bu amaçla gerçekleştirilen hibridizasyon denemelerinin sonucunda 16S ve 23S rRNA hedefli FISH problemlerinin yüksek oranda özgül (spesifik) olduğu belirlenmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. Denemelerde Kullanılan Bakterilere Problemlerin Özgüllüğü (specificity)

Bakteri Kültürü	Univ1390	Eub338	Ent	Sal3	Lis637
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> K12 (ATCC 25253)	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> NCTC12900 (ATCC 700728)	+	+	+	-	-
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium CCM 5445	+	+	+	+	-
<i>S. enterica</i> serovar Enteritidis ATCC 13076	+	+	+	+	-
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 51812	+	+	+	+	-
<i>L. innocua</i> Seeliger NRRL-B 33314 ^a	+	+		-	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	+	+		-	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	+	+		-	+

Piyasadan Satın Alınan Örneklerde *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* Türlerinin Geleneksel Yöntemlerle ve FISH Tekniği ile Saptanması

Çalışmada piyasadan satın alınan örneklerde *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin saptanmasında kullanılan FISH tekniğinin deneysel bulgular ve literatür bilgisi ışığında optimizasyonu sonucunda elde edilen uygulama koşulları Tablo 17’de verilmektedir.

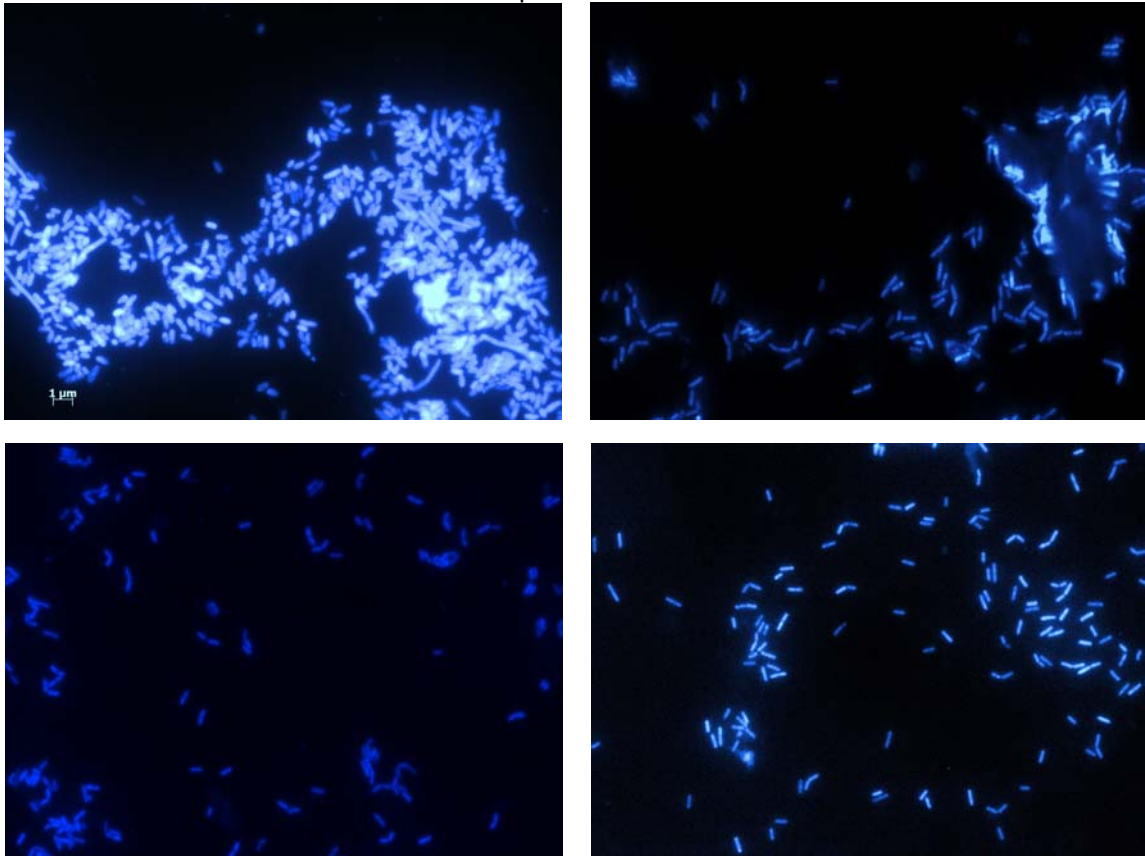
Genel olarak FISH yöntemi için kullanılan her bir prob ilgili hedef bakteri türlerine ve suşlarına yüksek oranda özgül (spesifik) bulunmuş ve ilgili hedef mikroorganizma türleri ve suşlarıyla hibridize olmuştur. Hibridizasyon sonucunda elde edilen floresan sinyaller de sayıma olanak tanıyacak ölçüde yeterince güçlü bulunmuştur. Ayrıca FISH yönteminde sayıma yönelik gerçekleştirilen deneme sonuçlarında tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 8).

Tablo 17. Denemelerde Kullanılan FISH Koşulları

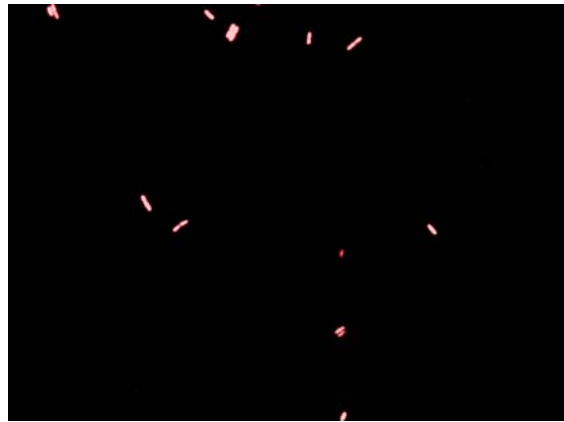
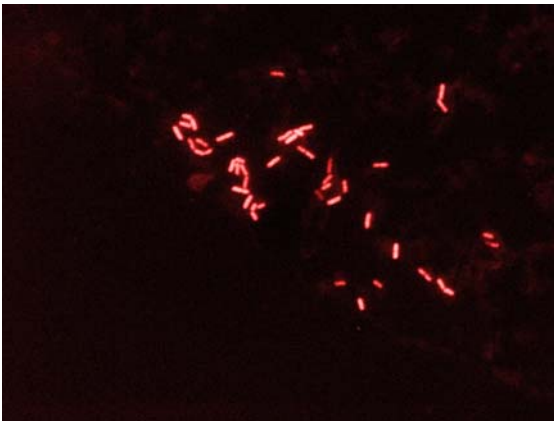
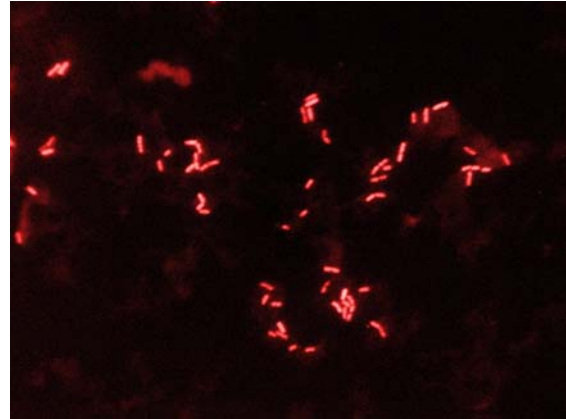
	Saptanan Mikroorganizma		
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Kullanılan Prob	Ent	Sal3	Lis637
Kullanılan boya	Cy3	Fluorescein	Cy3
Ön zenginleştirme	- / +	+	+
Seçici zenginleştirme	- / +	- / +	- / +
Fiksasyon*	PFA	PFA	ETOH
Formamide konsantrasyonu	% 39	% 10	% 35
Hibridizasyon sıcaklığı	46°C	46°C	46°C
Hibridizasyon süresi	1,5 h	1,5 h	1,5 h
Yıkama sıcaklığı	46°C	46°C	46°C
Yıkama süresi	20 dk	20 dk	20 dk

* İnokülasyon denemelerinde her bir bakteri için her iki fiksasyon uygulanmıştır.

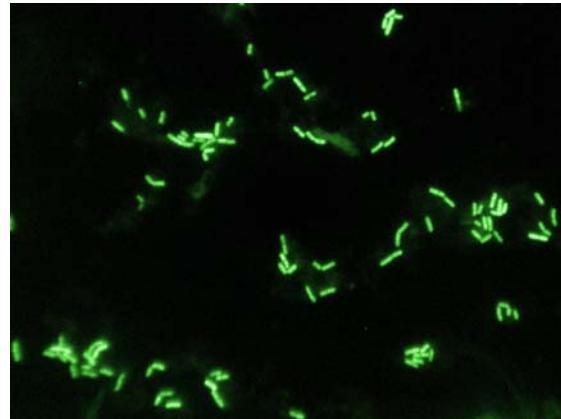
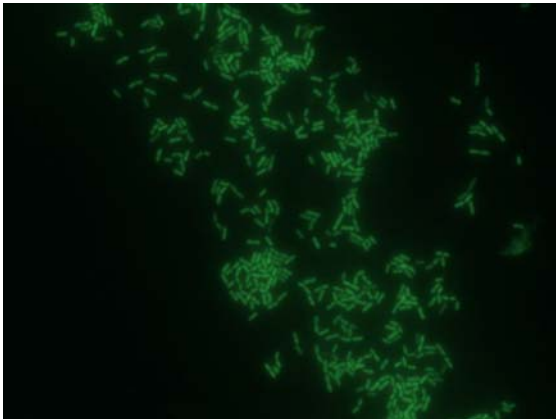
Toplam bakteri

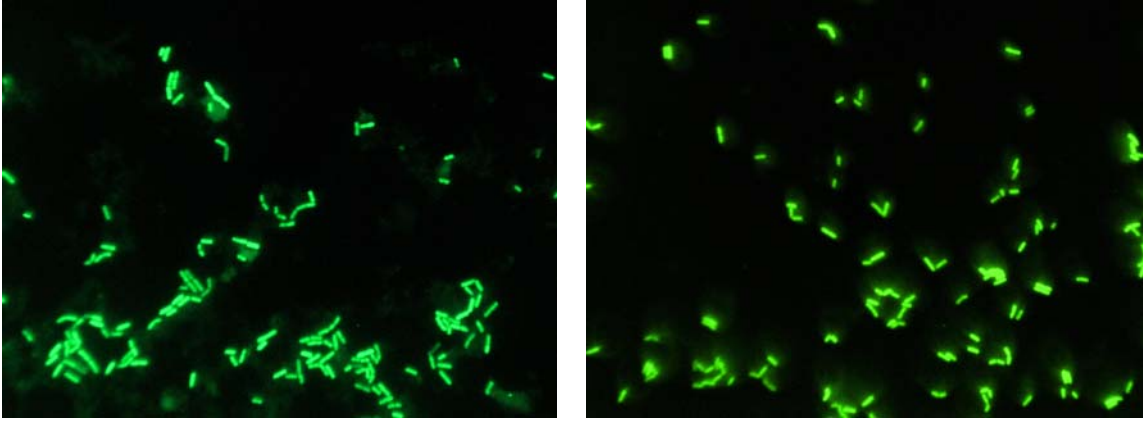


E. coli

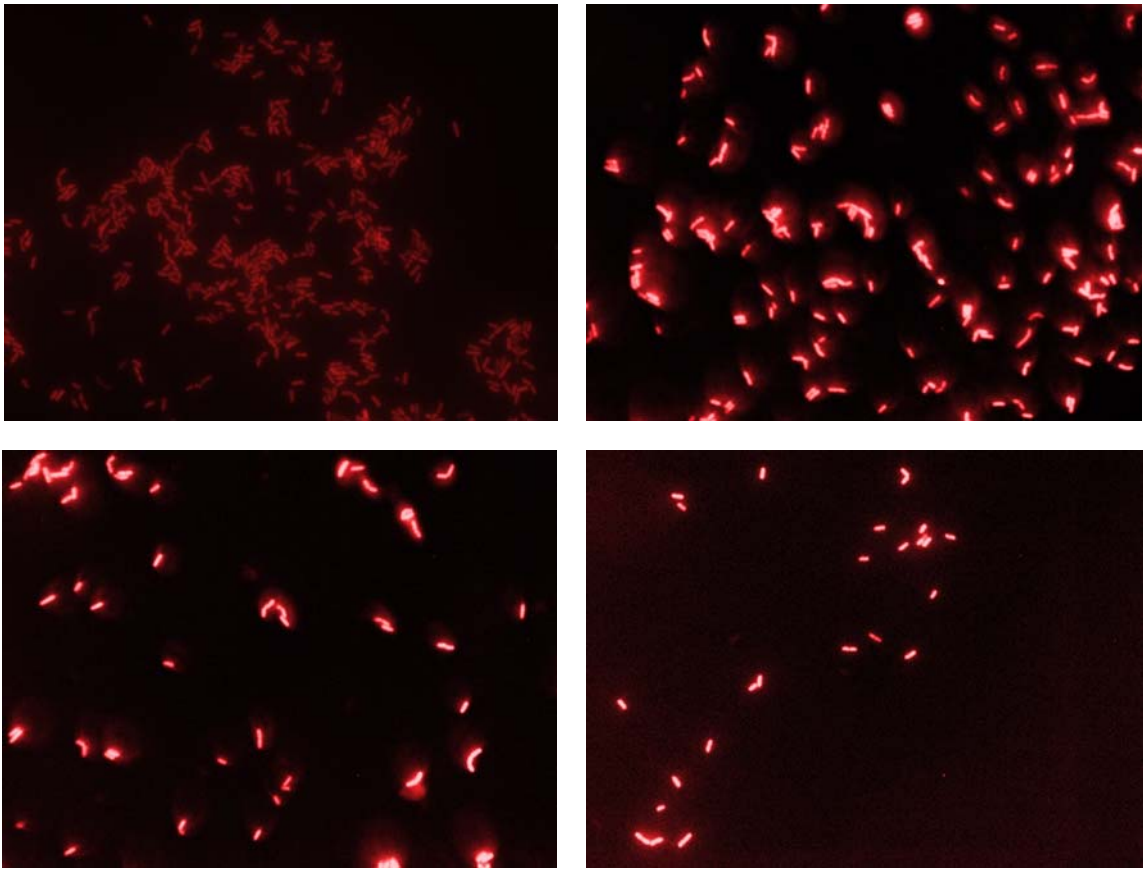


Salmonella





Listeria



Şekil 8. Özgül problarla FISH yöntemi ile saptanan *E.coli* (Cy3, kırmızı), *Salmonella* (Carboxyfluorescein, yeşil) ve *Listeria* (Cy3, kırmızı), toplam bakteri (DAPI, mavi) floresan görüntüleri

İnokülasyon yapıldıktan sonra tavuk ve hindi göğüs fileto ile kıyma örneklerinde gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçlarına (Tablo 10-12) göre FISH yöntemi *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin saptanması ve sayımı açısından % 100 duyarlılığa sahip bulunmuştur. Yine aynı şekilde İzmir'deki farklı marketlerden satın alınan toplam 216 adet kıyma ve hindi göğüs fileto örneğinde *E. coli* geleneksel (kültürel) yöntem ve FISH yöntemlerinin her ikisi ile de sırasıyla 15 (% 20,8) ve 1 (% 1,4) örnekte saptanmıştır (Şekil 9, A). 72 tavuk göğüs fileto örneğinde ise geleneksel (kültürel) yöntem ile 6 (%8,3) örnekte *E. coli* saptanırken FISH yöntemi ile örneklerin 7 (% 9,7)'sinde *E. coli* saptanmıştır.

Çalışmada İzmir'deki farklı marketlerden satın alınan 72 adet tavuk göğüs fileto örneğinde *Listeria* varlığının saptanması için gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) yöntem ve FISH yöntemleri ile sırasıyla 7 (% 9,7) ve 8 (% 11,1) örnekte *Listeria* türleri saptanmıştır (Şekil 9, D). Aynı örneklerde FISH yöntemi

ile *Enterobacteriaceae* ve *Salmonella* içeren pozitif örnek sayısı geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ile saptanan pozitif örnek sayısından daha yüksek bulunmuştur (Şekil 9, B ve C). Farklı marketlerden satın alınan 72 hindi göğüs fileto örneğinin 18 (% 25)'inde geleneksel (kültürel) yöntem ve FISH yöntemlerinin her ikisi ile *Enterobacteriaceae* saptanmıştır.

Gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) yöntem ve FISH yöntemlerinin her ikisi ile 5 hindi göğüs fileto örneği (% 6,9) *Listeria* pozitif olarak belirlenirken İzmir'deki farklı marketlerden satın alınan 72 adet hindi göğüs fileto örneğinde geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH yöntemlerinin her ikisi ile de *Salmonella* türleri saptanmamıştır (Şekil 4, C ve D).

Günümüze değin literatürde yayımlanan bilimsel çalışmaların büyük çoğunluğunda *Salmonella* taze kanatlı etlerinde saptanırken (ANDO ve DİĞ., 2003; BAILEY ve DİĞ., 1998; BELI ve DİĞ., 2001; BENNETT ve DİĞ., 2001; CAPITA ve DİĞ., 2003; CHEUNG ve DİĞ., 2004; CROCI ve DİĞ., 2004; CUI ve DİĞ., 2005; ÇARLI ve DİĞ., 2001; ÇETİNKAYA ve DİĞ., 2008; EYİGÖR ve ÇARLI, 2003; FLUIT ve DİĞ., 1993; FRATAMICO, 2003; GÜNAYDIN ve DİĞ., 2006; JERNGLINCHAN ve DİĞ., 1994; JIN ve DİĞ., 2004; KANKI ve DİĞ., 2009; LI ve MUSTAPHA, 2002; MERCANOĞLU ve AYTAÇ, 2002; PELKONEN ve DİĞ., 1994; PLUMMER ve DİĞ., 1995; RYCHLIK ve DİĞ., 1995; SCHLOSSER ve DİĞ., 2000; UYTENDAELE ve DİĞ., 1998; ZEWDE, 1999; ZHAO ve DİĞ., 2001), bazı araştırmacılar tarafından ise saptanmamıştır (GÖKALP ve DİĞ., 1987; SAĞUN ve DİĞ., 2006; TEKİNŞEN ve DİĞ., 1980; YÜCEL, 1998).

Kanatlı etlerinden, insanlarda hastalığa neden olan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serovarlarından sonra salgınlara da neden olduğu bildirilen *S. Infantis* serotipi yüksek oranda izole edilmiştir. Bu serovarların dışında çiğ kanatlı etlerinden *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, *S. enterica* serovar Hadar, *S. enterica* serovar Kentucky, *S. enterica* serovar Agona, *S. enterica* serovar Seftenberg ve *S. enterica* serovar Schwarzengrund de izole edilmiştir (CUI ve DİĞ., 2005; DIECKMANN ve DİĞ., 1999; FRATAMICO, 2003; PELKONEN ve DİĞ., 1994; SCHLOSSER ve DİĞ., 2000; WEGENER ve BAGGESEN, 1996). Yapılan çalışmalarda *Salmonella* izole edilen örneklerin çoğunluğunun yaz aylarındaki örneklemelere rastlaması, özellikle bu patojen bakterinin izolasyonunda mevsimsel etkinin önemini ortaya koymaktadır (EROL, 1999; PIETZSCH ve KAWERAU, 1984; SCHMIDT, 1989).

72 adet kıyma örneğinde gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ve FISH sonuçlarına göre sırasıyla 28 (% 38,9) ve 30 (% 41,7) örnekte *Enterobacteriaceae* ve sırasıyla 5 (% 6,9) ve 8 (% 11,1) örnekte *Salmonella* türleri geleneksel (kültürel) yöntem ve FISH yöntemleri ile saptanmıştır (Şekil 4, B ve C). Ancak, gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) mikrobiyolojik analiz ile 15 örnek (% 20,8) *Listeria* pozitif olarak belirlenirken FISH yöntemine göre 12 örnek (% 16,7) *Listeria* pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4, D).

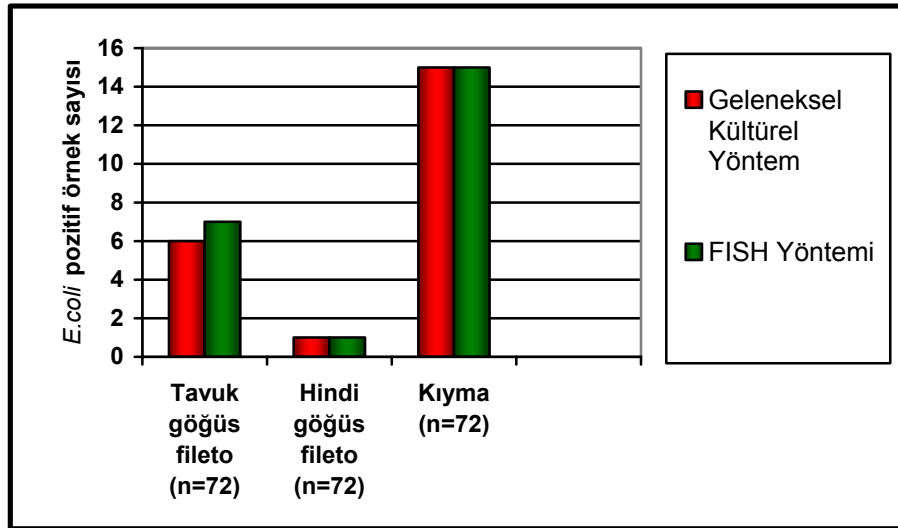
Benzer şekilde literatürde *Salmonella* birçok araştırma çalışmalarının sonucunda kıymada % 1,25-47 arasında saptanırken (AABO ve DİĞ., 1995; BACHHIL ve JAISWAL, 1988; BAŞKAYA ve DİĞ., 2004; ÇETİN ve YÜCEL, 1992; DARWISH ve DİĞ., 1986; DEPOURCQ, 1981; EL-LEITHY ve RASHAD, 1989; EMSWILLER-ROSE ve DİĞ., 1987; EROL, 1999; FRATAMICO, 2003; FRAZAK ve DİĞ., 1995; FUKUSHIMA ve DİĞ., 1987; GÖKALP ve DİĞ., 1982; GÖKMEN ve ALIŞARLI, 2003; GÖNÜLALAN ve KÖSE, 2003; GÜVEN ve DİĞ., 1997; HEREDIA ve DİĞ., 2001; HOGUE ve DİĞ., 1993; IONOVA ve DİĞ., 1981; MERCANOĞLU ve GRIFFITH, 2005; MREMA ve DİĞ., 2006; NARASHIMA ve RAMESH, 1988; PATANO, 1980; PHILLIPS ve DİĞ., 2008; PIETZCH ve KLAWEAU, 1986; POETA ve DİĞ., 1993; ROSE ve DİĞ., 2002; SAMADPOUR ve DİĞ., 2006; SARIGÖL, 1982; SCHEELHAAS ve DİĞ., 1976; SIERRA ve DİĞ., 1995; SİRİKEN, 2004; SORENSEN ve DİĞ., 2002; STOCK ve STOLLE, 2001; TEKİNŞEN ve DİĞ., 1982; YÜCEL ve DİĞ., 1991; ZHAO ve DİĞ., 2001, 2002), bazı çalışmalarda ise *Salmonella* saptanmamıştır (AKILLI, 1982-1983; AKIN ve KAYA, 1988; HINTON et al., 1998; KRAUSE ve DİĞ., 1972; SAĞUN ve DİĞ., 2006; SALTAN, 1994; SANCAK ve DİĞ., 1993; TEKİNŞEN ve DİĞ., 1980; WYATT ve GUY, 1980; YOUSSEF ve DİĞ., 1984; ZHAO ve DİĞ., 2008).

Farklı ülkelerde ve ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalarda kıyma örneklerinden izole edilen *Salmonella enterica* serotip dağılımı oldukça farklı bulunmuştur ancak araştırmaların çoğunluğunda *S. enterica* serovar Typhimurium'un sıklıkla izole edildiği görülmektedir. *S. enterica* serovar Anatum, *S. enterica* serovar Newport, *S. enterica* serovar Poona, *S. enterica* serovar Heidelberg, *S. enterica* serovar Montevideo da sıklıkla izole edilmiştir (BACHHIL ve JAISWAL, 1988; BOER ve DİĞ., 1992; DARWISH ve DİĞ., 1986; EMSWILLER-ROSE ve DİĞ., 1987; EROL, 1999; FUKUSHIMA ve DİĞ., 1987; IONOVA ve DİĞ., 1981; KÜPLÜLÜ, 1995; SCHEELHAAS ve DİĞ., 1976; SCHMIDT 1988, 1989; SİRİKEN, 2004; SORENSEN ve DİĞ., 2002; STOCK ve STOLLE, 2001; ZHAO ve DİĞ., 2002).

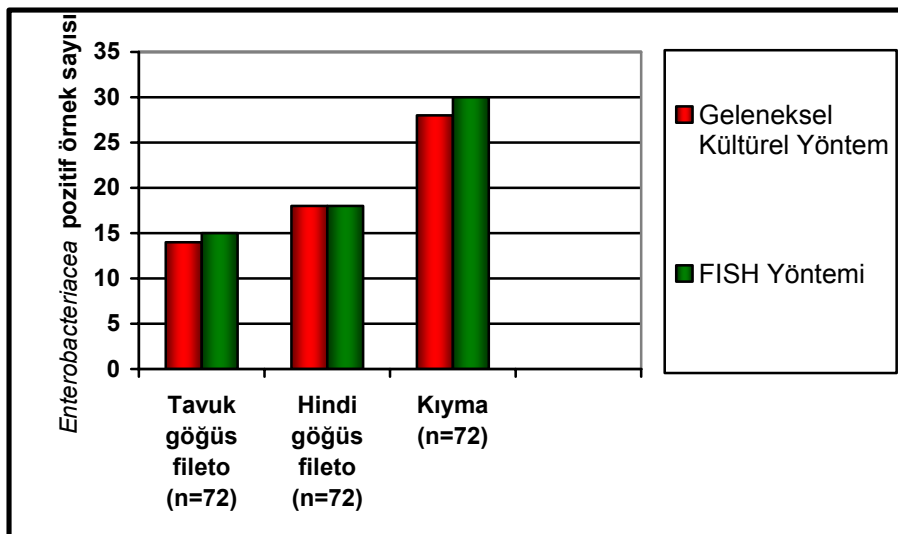
Literatürde *Listeria* kontaminasyonunun saptanması ile ilgili olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde, kıyma ve birçok et ürününün % 1-77,3 arasında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu görülmektedir.

Listeria türleri literatürde günümüze değin yapılan çalışmalarda araştırmacılar tarafından taze kanatlı etlerinde önemli oranda saptanmıştır (BİLİR ORMANCI ve DİĞ., 2008; COX ve DİĞ., 1999; ÇİFTÇİOĞLU ve UĞUR, 1992; ELISCHEROVA ve DİĞ., 1979; ESTEVES ve DİĞ., 1996; FANELLI ve STEPHAN, 2001; FARBER ve DİĞ., 1989; GÖKMEN ve ALIŞARLI, 2003; GÜVEN, 1998 a, b; GÜVEN ve PATIR, 1998; GÜVEN ve DİĞ., 1997; JOHNSON ve DİĞ., 1990; KARCHES ve TEUFEL, 1988; KAYA ve SCHMIDT, 1989; LEISTNER ve DİĞ., 1989; RORVIK ve DİĞ., 1991; SAMELIS ve METAXOPOULOS, 1999; SHÖNBERG ve DİĞ., 1989; WANG ve QIAO, 1994; WESLEY ve DİĞ., 2002; ZIVKOVIÇ ve DİĞ., 1992).

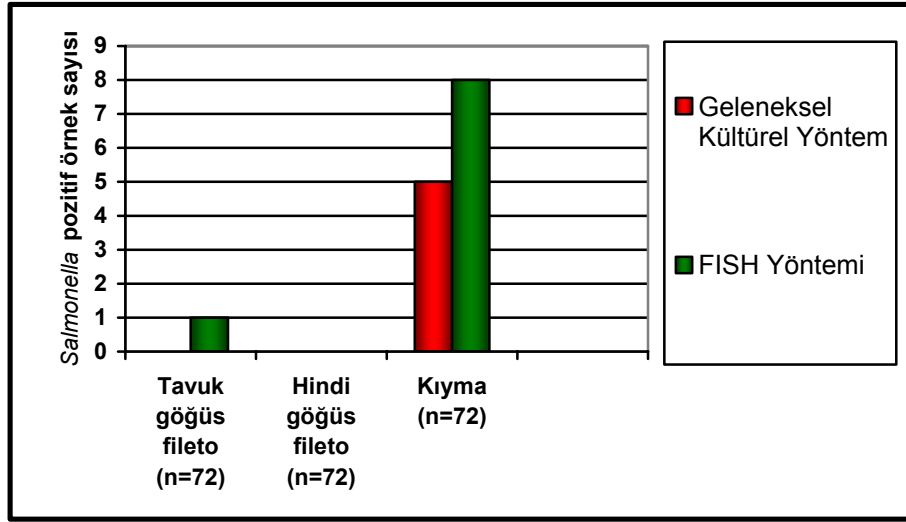
Benzer şekilde *Listeria* türleri yapılan araştırma çalışmalarının hemen hemen tamamında kıyma örneklerinde saptanırken (BAILEY ve DİĞ., 1989; BREUER ve PRANDL, 1988; BUNCIC, 1991; ÇİFTÇİOĞLU 1992; ELISCHEROVA ve DİĞ., 1979; EMSWILLER-ROSE ve DİĞ., 1987; FANELLI ve DİĞ., 2001; FARBER, 1989; GÜVEN, 1998; HEREDIA ve DİĞ., 2001; HOGUE ve DİĞ., 1993; LEISTNER ve DİĞ., 1989; POETA ve DİĞ., 1993; ROTTERUD ve NESBAKKEN, 1992; SCHEELHAAS ve DİĞ., 1976; SHARIF ve TUNAIL, 1995; SHÖNBERG ve DİĞ., 1989; SOMADPOUR ve DİĞ., 2006; WEISS, 1989; ZIVKOVIÇ ve DİĞ., 1992), yapılan literatür taramasında *Listeria* negatif sonuç elde edilen bir çalışmaya rastlanmamıştır.



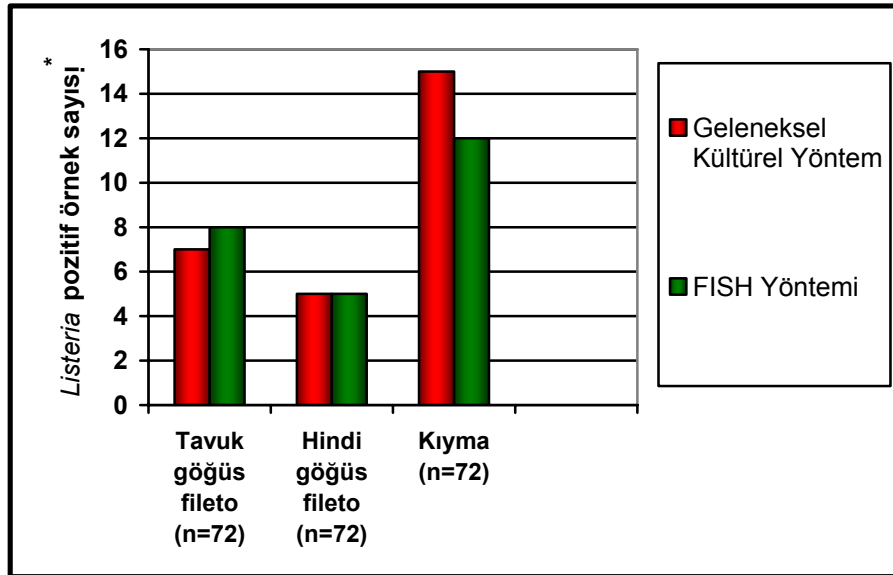
A



B



C



D

Şekil 9. İzmir'deki farklı marketlerden satın alınan toplam 216 adet tavuk ve hindi göğüs fileto ile kıyma örneğinde *E. coli* (A); *Enterobacteriaceae* (B); *Salmonella* (C) ve *Listeria* (D) türlerinin varlığının saptanması için gerçekleştirilen geleneksel (kültürel) ve FISH yöntemi sonuçları

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürde ülkemizde ve diğer birçok ülkede piyasada kasap ve marketlerde satılan kanatlı etleri ve kıymaların mikrobiyolojik yükü ile ilgili gerçekleştirilmiş çalışmalarda *Salmonella* ve *Listeria* saptanmasına ilişkin elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bilimsel literatürde konu ile ilgili daha önce yapılmış araştırma çalışmaları (survey) ile kantitatif olarak karşılaştırmak amacıyla tam bir yöntem geliştirmek bu çalışmanın kapsamı dışındadır. Ancak, genel olarak Türkiye'de farklı şehirlerde gerçekleştirilen çalışmalarda bulgularla kıyaslandığında analiz edilen kanatlı etlerinin söz konusu patojenlerle daha düşük oranlarda kontamine olduğu görülmektedir. Tavuk etlerinden düşük oranda *Salmonella* izole edilmiş olmasına karşın, çalışmamızda hindi filetolarında *Salmonella*'ya rastlanmamıştır. Benzer şekilde GÜNAYDIN ve DİĞERLERİ (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada hindi etinde *Salmonella* saptanmadığı bildirilmiştir. Literatürde az sayıda da olsa kanatlı etlerinde *Salmonella* saptanmayan çalışmalar mevcuttur (GÖKALP ve DİĞ., 1987; GÜNAYDIN ve DİĞ., 2006; SAĞUN ve DİĞ., 2006; TEKİNŞEN ve DİĞ., 1980; YÜCEL, 1998).

Elde edilen bu farklı sonuçlarda; saptamada farklı yöntem kullanımı, analiz örneği ve miktarı, örneğin kaynağı, bölge ve iklim farklılığı, örnekleminin yapıldığı işletme ve personel hijyeninin durumu, örneğin satışa sunulmuş şekli gibi faktörlerin etkili olduğu unutulmaması gereken konulardır. Bu

faktörlerin ve diğer birçok faktörün etkisi piyasadaki kanatlı etleri ve kıyma gibi et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda özellikle farklı mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak ve farklı laboratuvarlarda aynı çalışmaların eş zamanlı yürütülerek gerçekleştirilmesi ile ortaya konulmaktadır. Ülkemizde piyasada kasap ve marketlerde satılan kanatlı etleri ve kıymaların mikrobiyolojik yükü ile ilgili gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışma satışa sunulan bu ürünlerin mikrobiyolojik kalitesine ilişkin bilgi vermekle kalmayıp bu tip gıdaların halk/tüketici sağlığı açısından önemli derecede riskli bir gıda grubunu oluşturduğunu da göstermektedir.

Tablo 18-23'te Standart geleneksel (kültürel) yöntem ve FISH yöntemi ile piyasadaki satın alınan toplam 216 adet tavuk/hindi göğüs filetoları ve kıyma örneğinde gerçekleştirilen *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* ve *Listeria* saptama sonuçlarının karşılaştırmalı analizi verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre FISH yöntemi ile hindi göğüs filetolarında *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* ve *Listeria* analizi sahte pozitif sonuçların sifıra yaklaşması nedeniyle yüksek oranda spesifik (% 100'e yakın) bulunmuştur. Benzer şekilde kıyma örneklerinde de *E. coli* ve *Listeria* saptanması için FISH yöntemi yüksek oranda spesifik olarak belirlenmiştir.

Tablo 18. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Tavuk Göğüs Filetolarında *E. coli* ve *Enterobacteriaceae* Analiz Sonuçları

Kültürel yöntem sonuçları	FISH Sonuçları					
	<i>E. coli</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam
+ sonuç sayısı	6	0 ^{FN}	6	14	0 ^{FN}	14
- sonuç sayısı	1 ^{FP}	65	66	1 ^{FP}	57	58
Toplam	7	65	72	15	57	72

FP Sahte negatif FP Sahte pozitif

Tablo 19. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Hindi Göğüs Filetolarında *E. coli* ve *Enterobacteriaceae* Analiz Sonuçları

Kültürel yöntem sonuçları	FISH Sonuçları					
	<i>E. coli</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam
+ sonuç sayısı	1	0 ^{FN}	1	18	0 ^{FN}	18
- sonuç sayısı	0 ^{FP}	71	71	0 ^{FP}	54	54
Toplam	1	71	72	18	54	72

FP Sahte negatif FP Sahte pozitif

Elde edilen sonuçlara göre tavuk ve hindi göğüs filetolarının her ikisinde *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* ve *Listeria* ve kıymada *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ve *Salmonella* saptanmasında FISH yönteminin hassasiyeti % 100 oranında bulunmuştur (0 sahte negatif sonuç) (Tablo 18-23). Ancak FISH yöntemi ile kıymada *Listeria* saptanmasının (% 4,2) diğer örneklerdekine göre daha düşük hassasiyete sahip olduğu görülmüştür (3 sahte negatif sonuç) (Tablo 23).

Tablo 20. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Kıymada *E. coli* ve *Enterobacteriaceae* Analiz Sonuçları

Kültürel yöntem sonuçları	FISH Sonuçları					
	<i>E. coli</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam
+ sonuç sayısı	15	0 ^{FN}	15	28	0 ^{FN}	28
- sonuç sayısı	0 ^{FP}	57	57	2 ^{FP}	42	44
Toplam	15	57	72	30	42	72

FP Sahte negatif FP Sahte pozitif

Yine de FISH yöntemi ile elde edilen sahte pozitif ve sahte negatif sonuçların çok düşük seviyelerde olması (% 0-5) bu örneklerde FISH yönteminin söz konusu mikroorganizmaların saptanmasında uygun, hassas ve spesifik olduğunu göstermektedir.

Tablo 21. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Tavuk Göğüs Filetolarında *Salmonella* ve *Listeria* Analiz Sonuçları

Kültürel yöntem sonuçları	FISH Sonuçları					
	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>		
	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam
+ sonuç sayısı	0	0 ^{FN}	0	7	0 ^{FN}	7
- sonuç sayısı	1 ^{FP}	71	72	1 ^{FP}	64	65
Toplam	1	71	72	8	64	72

FP Sahte negatif FP Sahte pozitif

Tablo 22. Standart Kültürel Yöntem ve FISH Yöntemi ile Hindi Göğüs Filetolarında *Salmonella* ve *Listeria* Analiz Sonuçları

Kültürel yöntem sonuçları	FISH Sonuçları					
	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>		
	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam
+ sonuç sayısı	0	0 ^{FN}	0	5	0 ^{FN}	5
- sonuç sayısı	0 ^{FP}	72	72	0 ^{FP}	67	67
Toplam	0	72	72	5	67	72

FP Sahte negatif FP Sahte pozitif

Tablo 23. Standart Kültürel ve FISH Yöntemi ile Kıymada *Salmonella* ve *Listeria* Analiz Sonuçları

Kültürel yöntem sonuçları	FISH Sonuçları					
	<i>Salmonella</i>			<i>Listeria</i>		
	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam	+ sonuç sayısı	- sonuç sayısı	Toplam
+ sonuç sayısı	5	0 ^{FN}	5	12	3 ^{FN}	15
- sonuç sayısı	3 ^{FP}	64	67	0 ^{FP}	57	57
Toplam	8	64	72	12	60	72

FP Sahte negatif FP Sahte pozitif

Çalışmada 3000'den fazla baz içeren 23S rRNA sekansları, alt tür seviyesinde yaklaşık olarak 1500 baz içeren 16S rRNA sekanslarına göre daha iyi ayırımına (discrimination) izin verdiği için *Salmonella* türlerinin aranmasında 23S rRNA hedefli prob kullanılmıştır. Birçok araştırmacı da 23S rRNA hedefli problemlerin türler ve alt türler seviyeleri üzerinde 16S rRNA hedefli problemlerden daha fazla ayırım gücüne sahip olduğunu ileri sürmektedir (LICHT ve DİĞ., 1996; LIN ve TSEN, 1995; NORDENTOFT ve DİĞ., 1997; RONNER ve STACKEBRANDT, 1994).

FISH yöntemiyle tavuk ve hindi göğüs fileto örneklerinde sırasıyla geleneksel (kültürel) yöntem ile olduğundan daha fazla *Salmonella* ve *Listeria* pozitif sonuç elde edilmiştir.

FISH yöntemiyle *Salmonella* türlerinin aranması analizinde ön zenginleştirme gerekmektedir. Yapılan çalışmada FISH yöntemiyle *Salmonella* türlerinin saptanabildiği ön zenginleştirme süresinin en az 16 saat olması gerektiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar hasar görmüş bakterilerin bulunması veya "hücrelerin canlılığını sürdürebilmesine fakat kültüre edilememesine" (viable but non-cultivable) yol açan koruyucular, antibiyotikler, düşük sıcaklıkta muhafaza ve görünür ışığa maruz kalma gibi inhibe edici faktörlerin varlığı ile açıklanabilmektedir. Geleneksel (kültürel) yöntemler bu bakterileri saptamada başarısız olabilirken FISH yöntemi pozitif sonuçlar verebilmektedir (SPRING ve DİĞ., 1992). Bu durumun nedeni hücrelerdeki metabolik aktivitenin düşük seviyelerde olmasına karşın, floresan problemlerin bağlanması ile görünür olabilen RNA'nın hala yeterince bol miktarda bulunmasıdır.

Hibridizasyon problemlerinin gıda örneklerindeki ökaryotik hücrelerin parçacıkları veya nükleik asitleri ile özgül (spesifik) olmayan bağlanması bazen gerçekleşebilmektedir fakat bu çeşit bağlanma sinyallerin şekilleri ve parlaklık seviyelerindeki farklılıklarına dayanarak özgül (spesifik) bağlanmadan ayırt edilebilmektedir.

Hücrelerin rRNA içeriği FISH tekniğinin hassasiyetini belirlemede önemli bir rol almaktadır (WAGNER ve DİĞ., 1993). Çoğu bakteri hücreleri 10^3 - 10^5 seviyesinde ribozoma ve 5S, 16S ve 23S rRNA'ların birçok kopyasına sahiptir. Bu doğal amplifikasyon ise FISH yönteminin birçok uygulamada kullanıldığında ön zenginleştirme aşaması gerektirmeyecek mükemmel bir hassasiyete sahip olmasına neden olmaktadır (AMANN ve DİĞ., 1995). Ancak, *Salmonella* türleri ve diğer patojen bakteriler gıdalarda başlangıçta sadece çok düşük seviyelerde/sayılarında bulunabilmekte ve hatta hasar görmüş ve ya düşük metabolik aktiviteye sahip bir durumda olabilmektedir. Bu hücreler doğal olarak çok düşük miktarlarda rRNA içermektedir. Ön zenginleştirme işlemi bu hücrelerin metabolik aktivitelerini yeniden sağlamakta ve böylece hatalı negatif sonuçların sayısını azaltmaktadır. Bu nedenle çalışmada 16-18 saat arasında bir ön zenginleştirme süresi önerilmektedir. Ön zenginleştirme sıvı besiyerindeki daha uzun inkübasyon süresinin de 18 saat sonra bakteri hücrelerinin ölmeye başlayacağı ve dolayısıyla rRNA hızla degrade olacağı için hatalı negatif sonuçlara neden olabileceği de göz ardı edilmemelidir. FISH yönteminde geleneksel (kültürel) yöntemde olduğu gibi ön zenginleştirme aşamasından sonra seçici zenginleştirme aşamasının yapılması yöntemin hassasiyetini artırabilir ancak bu ilave aşama geleneksel (kültürel) yöntemde göre en önemli avantajı olan kısa analiz süresine ilave süre gerektirmektedir. *Salmonella* türlerinin saptanması için analiz edilen piyasadan satın alınan 8 tavuk göğüs fileto ve 1 kıyma örneğinde *Salmonella* saptanırken, hindi göğüs fileto örneklerinde *Salmonella*'ya rastlanmamıştır. Genel olarak FISH yöntemi ile pozitif veya negatif sonuç elde etmek için gerekli olan toplam analiz süresi 1 günden daha az (yaklaşık olarak 20 saat) sürmektedir.

Çalışmada *Listeria* türlerinin aranmasında *Listeria* türlerine spesifik Lis637 probu kullanılmıştır. Lis637 probun *L. grayi* hariç tüm *Listeria* türleri için uygun olduğu bilinmektedir. Çalışmada ayrıca *L. grayi* probun spesifikliğini test etmek için kullanılmamıştır. Fakat *Listeria* türlerinin saptanması için analiz edilen piyasadan satın alınan tavuk göğüs fileto, hindi göğüs fileto ve kıyma örneklerinde standart kültürel yöntemle yapılan analizler sonucunda örneklerin hiçbirinden *L. grayi* izole edilmemiştir. Piyasadan satın alınan ve *Listeria* analizi yapılan toplam 216 örnekten en fazla kıyma örneklerinden (27 *Listeria* pozitif örnek/ 72 kıyma örneği) *Listeria* izole edilmekle birlikte, bu örneklerden *Listeria* cinsine ait en fazla izole edilen tür *L. innocua* (17 örnek, % 63) olmuştur. Bundan başka 6 örnekte (% 22) *L. welshimeri* ve 4 örnekte de (% 14,8) *L. seeligeri* belirlenmiştir. FISH yöntemi ile *Listeria* hücrelerini saptamak 1 ve/veya 2 gün zenginleştirmeden sonra saptayabilmek mümkün olmuştur.

rRNA hedefli nükleik asit problemlerinin fiksasyon uygulanmış hücrelerinin içine girişinde başlıca engel hücre duvarıdır. *Listeria* gibi gram pozitif özellikteki hücrelerin duvarı gram negatif hücre duvarından daha kalındır ve daha fazla miktarda teichoic asit (hücre duvarının %50'si kadar) içerebilmektedir (GOTTSCALK, 1979). Bu özellik nedeniyle DNA problemleri gibi negatif yüklü polimerlerin hücre duvarından geçişini geciktirmektedir. Bu amaçla alternatif (aldehit içermeyen) veya ısıtma ve alkol bazlı yöntemleri içeren fiksasyon protokollerinin kullanımı önerilmektedir (alcohol-based methods (MOTER ve GOBEL, 2000; ROLLER ve DİĞ., 1994; WAGNER ve DİĞ., 1998).

WAGNER ve DİĞERLERİ (1998) Lis-1255 DNA-FISH probu kullandığı çalışmada da fiksasyon için ethanol kullanmıştır. Bununla birlikte araştırmacılar, brain heart infusion broth da 9 saat geliştirilen *L. monocytogenes*'in sadece ethanol bazlı fiksasyonla saptanamadığını, probun geçişine izin vermek ve tam olarak hücreyi geçirgen hale getirmek için hücrelere lizozim ve proteinase K uygulamanın gerektiğini belirtmiştir. Bu bulgunun aksine Lis637 probu kullandığımız bu çalışmada ve durağan (stationary) fazdaki (18-24 h) hücrelere ethanol fiksasyonu uygulamakla ilave bir geçirgen hale getirme (permeabilization) aşaması gerektirmeden etkili bir hibridizasyon sağlanmıştır.

Gıda ürünlerinin mikrobiyal kalitesi ve güvenilirliğinden emin olmak için sadece canlı mikroorganizmaların sayılması önemlidir. FISH yöntemi çevresel ve klinik örneklerdeki spesifik mikroorganizmaların sayılmasında ve tanımlanmasında geniş çapta kullanılmaktadır. FISH yöntemi genellikle rRNA'nın bir hedef bölgesine oligonükleotid probun spesifik bağlanmasına dayanmaktadır. Çünkü hücrelerdeki önemli miktarlarda rRNA kopyalarının bulunduğu bu bölgeler çok iyi korunmuştur. Bu yöntemde kullanılan problemler nadir olarak gıda örneklerindeki ölü hücrelerle hibridize olmaktadır. Ancak, FISH yöntemiyle hedef hücreler gıda partikülleri tarafından gizlenmesi/saklanması bağlı olarak sahte-negatif (false-negative) sonuçlar alınabildiği görülmüştür. Bu çalışmada da kıymada *Listeria* saptanmasında çok düşük de olsa sahte-negatif sonuç alınmıştır. Sahte-negatif sonuçların

artışı uygulanan yöntemin hassasiyetinin düşük olduğunun bir göstergesidir. Benzer şekilde, SCHMID ve DİĞERLERİ (2003) FISH yöntemini kullanarak çiğ sütte *Listeria* türlerinin saptanması için bakteri hücrelerini hasat etmenin gerekli olduğunu ileri sürmektedir. Bu, FISH yönteminin gıda endüstrisinde pratik kullanımına engel olan kısıtlamalardan bir tanesidir. Bu kısıtlamayı ortadan kaldırmak için OOTSUBO ve DİĞERLERİ (2003) FISH Filter Cultivation (FISHFC) olarak adlandırılan hücrelerin bir membran filtre yüzeyinde kültüre edilmesini ve sonra filtre yüzeyinde gelişen canlı mikrokolonilerin bir oligonükleotid proba hibridizasyonunu içeren bir yöntemin kullanımını önermiştir. WAGNER ve DİĞERLERİ (1998) ve SCHMID ve DİĞERLERİ (2003) tüm *Listeria* türlerinin 16S rRNA sekanslarına spesifik hibridizasyon için sırasıyla Lis-1225 ve Lis-637 problemlerinin kullanımını önermiştir. Lis-1225 yüksek oranda spesifik olmasına karşılık *Listeria* cinsine çok yakın bir cins olan ve 16S rRNA moleküllerinin bağlanma bölgeleri tamamen benzer olan bazı *Brochothrix* türlerine (*B. thermosphacta* ve *B. campestris*) bağlanabilmektedir. Diğer taraftan, Lis-637 *L. grayi* hariç tüm *Listeria* türleri ile spesifik olarak bağlanabilmekte ve *Brochothrix* türleri ile reaksiyona girmemektedir (SCHMID ve DİĞ., 2003). Son olarak, BREHM-STECHER ve DİĞERLERİ (2005) tüm *Listeria* türlerinin 16S rRNA sekansları için peptid nükleik asit probu LisUn-11'in tasarımını yapmıştır, fakat bu günlük rutin analizlerde kullanılmak için çok pahalıdır. FUCHIZAWA ve DİĞERLERİ (2008) tarafından yapılan çalışmada ise *Listeria* cinsinin 23S rRNA bölgesinden tasarımı yapılan Lis-1400 probu *Listeria* türlerinin tamamı ile spesifik olarak bağlanmıştır. Sonuç elde etmek için 5-7 gün gerektiren Kültürel sayım yöntemleriyle (ISO-11290-1 ve US-FDA yöntemleri) kıyaslandığında FISH yöntemi kullanıldığında *Listeria* hücreleri 2 saatte sayılabilmektedir.

Gıda kaynaklı patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması için konvansiyonel (kültürel) yöntemler, geleneksel olarak "gold standard" (altın standart) olarak değerlendirilmektedir. Gıdalarda *Salmonella* gibi bakteriyel patojenlerin saptanması için kültürel standart yöntemler ön ve seçici zenginleştirme aşamalarından sonra teorik olarak, gıda örneğinde 1 adet canlı hücre kadar düşük seviyede hücreyi saptama yeteneğine sahiptir. Kültürel yöntemler, daha hızlı ve daha ucuz olabilen moleküler yöntemlerin aksine *Salmonella*'nın serotipinin, antibiyotik direnç profili kadar diğer özelliklerinin de belirlenebilmesine ayrıca olanak tanımaktadır.

Bununla birlikte *Salmonella*'nın saptanmasında kültürel yöntemle kıyasla PCR yöntemlerinin daha fazla hassasiyete sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (BENNETT ve DİĞ., 1998; RYCHLIK ve DİĞ., 1999; AMAVISIT ve DİĞ., 2001; WHYTE ve DİĞ., 2002). Bu durum genel olarak PCR yönteminin hedef hücrelerin gelişme potansiyelini hesaba katmaksızın hedef sekansları saptayabilmesine atfedilmiştir. Buna ek olarak, kültürel yöntemin hassasiyeti DNA bazlı saptama yöntemlerinin hassasiyetinden daha düşük olabilmektedir ve kısmen, kültürel yöntemlerin gıdalardaki sublethal hasar görmüş veya canlı kültür edilemeyen hücreleri saptayamamasına bağlı olabilmektedir.

Benzer şekilde standart kültürel yöntemle kıyasla hibridizasyonla daha yüksek sayıda pozitif sonuç elde edilmesi de, daha önce FLOWERS ve KLATT (1987), BOTTARI ve DİĞERLERİ (1995) ve FANG ve DİĞERLERİ (2003) tarafından belirtilmiştir. Bu araştırmacılar bu sonuçların ölü veya canlı fakat kültür edilemeyen hücrelerin saptanmasıyla, daha yüksek rekabetçi flora, veya *Salmonella* türlerinden başka diğer bakterilerin saptanmasıyla (düşük spesifiklik) ilişkili olabileceğini ileri sürmüştür.

Salmonella'nın gıdada bulunduğu durumda dahi *Salmonella*'nın varlığının güvencesini veren tek bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle bir saptama yöntemi *Salmonella* negatif sonuç veriyorsa, bu sonuç bu bakterinin kesinlikle gıdada bulunmadığı anlamına da gelmemektedir. Geleneksel (kültürel) yöntemler kullanıldığında "yanlış negatif" sonuçların gıda örneklerindeki patojenlerin başlangıçtaki sayısı düşük olduğunda gerçekleşebileceği belirlenmiştir (FRICKER, 1987). Özellikle analitik ünitenin büyüklüğü önemli bir faktördür. Küçük analitik ünitelerinin kullanılması, daha düşük bulunma (prevalence) oranlarına neden olabilir, çünkü *Salmonella* konsantrasyonları düşük olduğu durumlarda küçük miktardaki örneklerin *Salmonella* içermesi daha az olasıdır. Örneğin Japonya'da taze tavuk etlerinde (n=286) yapılan bir çalışmada 25, 10 ve 1 g örnek ünitelerinin *Salmonella* analiz sonuçları sırasıyla % 19,9; 15,7 ve 12,2 bulunma oranları ile sonuçlanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarını bilimsel literatürde yayınlanmış daha önceki çalışmalarla kıyaslarken örnekleme süresi, orijini, örneklerin göreceli olarak raf ömrü, örnekleme planı, örnekleme tekniği ve uygulanan saptama yöntemi gibi çeşitli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

FISH yöntemiyle tavuk ve hindi göğüs fileto örneklerinde sırasıyla geleneksel (kültürel) yöntem ile olduğundan daha fazla *Salmonella* ve *Listeria* pozitif sonuç elde edilmiş olmasının olası nedenleri;

-FISH düşük sayıdaki hücreleri/mikroorganizmaları saptamada daha hassastır

-“background microflora” kültürel yöntemde ortamda *Salmonella*'nın varlığını maskeleyebilir

-ortamda mevcut *Salmonella* suşları kültür edilememektedir
-FISH ölü hücreleri/mikroorganizmaları saptamaktadır
olarak sıralanabilir.

FISH yönteminin ölü hücreleri saptamasına ilişkin olasılık seçici (ikincil) zenginleştirme aşaması/ortamı kullanılarak elimine edilebilir. Yanlış pozitif sonuçlar FISH yöntemiyle matris-spesifik olabilir ancak bu olasılığın da bu çalışmada sadece hayvansal gıdaların (tavuk, hindi ve kıyım) kullanılması nedeniyle ve her iki yöntemle elde edilen sonuçların açıkça yorumlanması mümkün olamamaktadır.

Sonuç olarak standart kültürel ve FISH yönteminin birlikte uygulanması sonuçların çok daha doğru değerlendirilmesine olanak tanıyacaktır. Kısa sürede sonuç alınabilen FISH yöntemi kanatlı işleyen ya da üretimi yapan şirketlerin özellikle gıda güvenliği yönetim sistemlerinin bir bileşeni olarak kullanım alanı bulabilecek potansiyele sahiptir. Bundan başka, sonuçlar kültürel yöntemden daha kısa sürede elde edilebildiğinden gıda endüstrisi için kritik bir önem taşımaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada gıda güvenliği ve sanitasyon indeksi olarak kullanılan indikatör mikroorganizma (*Escherichia coli*) ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan patojenlerin (*Salmonella* ve *Listeria*) İzmir'de satışa sunulan tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti ve kıymada saptanması için floresanlı yerinde hibritleme yönteminin (FISH) kullanım olanağı araştırılmıştır. Sonuç olarak, söz konusu indikatör ve patojen mikroorganizmaların tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti ve kıyma örneklerine inokülasyonu yapıldıktan sonra ve piyasadan satın alınan tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti ve kıyma örneklerinde FISH tekniği ile saptanabildiği, yöntemin yüksek oranda spesifik ve hassas olduğu belirlenmiştir. Standart kültürel yöntemle kıyasla FISH yöntemi ile daha yüksek sayıda pozitif sonuç elde edilmiştir. FISH yöntemiyle *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin saptanmasında ön zenginleştirme gerektiği ve bu bakterilerin saptanabildiği ön zenginleştirme süresinin en az 16 saat olması gerektiği gözlemlenmiştir. Genel olarak FISH yöntemi ile pozitif veya negatif sonuç elde etmek için gerekli olan toplam analiz süresi 1 günden daha az (yaklaşık olarak 20 saat) sürmektedir. FISH yöntemiyle hedef hücreler gıda partikülleri tarafından gizlenmesi/saklanmasıyla ilgili olarak sahte-negatif (false-negative) sonuçlar alınabildiği görülmüştür. Bu çalışmada da kıymada *Listeria* saptanmasında çok düşük de olsa sahte-negatif sonuç alınmıştır.

Gıdalarda *E. coli*, *Salmonella* ve *Listeria* türleri için bazı hızlı saptama yöntemleri geliştirilmiş olmasına karşılık her bir yöntemin kendine özgü dezavantajı bulunmaktadır. Bakteri hücrelerinin DNA'sını hedef alan PCR ve kantitatif PCR canlı ve ölü hücrelerin her ikisini de saptayabilmektedir. Ayrıca reverse transcription PCR ve ELISA yöntemleri kantitatif değildir. Ancak FISH yöntemi kantitatif olmakla birlikte sadece canlı hücreleri saptamaktadır. Bakterilerin ya da incelenen mikroorganizmanın kültürünü gerektirmeyen FISH yönteminde hedef zarar görmemiş, eksiksiz bir bakteri hücresinde tespit edilirken bakteri cins ve türlerinin yerinde saptanması ve miktarının belirlenmesi mümkündür. Moleküler analiz yöntemlerinin bazılarında yer alan PCR analizini gerektirmeyen bu yöntem ile hücrelerin saptanması, morfolojik tanımlaması, hücrelerin dağılımının ve hatta dokunun histolojik bölümlerinin incelenmesi yapılabilmektedir. Sayıca baskın bakteri türlerinin saptanabildiği ve sayılabildiği bu yöntemde gram pozitif bakteriler gibi bazı bakteriler için gereken ön işlemler, fazla sayıda örnek analiz edilmesi durumunda ve daha doğru sayım sonuçları elde edilebilmesi için otomasyon gerektirmesi ve prob spesifitesinin sadece bilinen bakteriler için geçerli olması bu yöntemin dezavantajlarıdır.

Mikroskopik bir yöntem olan FISH tekniğinde cm^2 'de 10^3 hücreden daha az sayıda hücrenin hızlı ve güvenilir olarak saptanması manuel mikroskop kullanımı ile pratik değildir. Ancak bu kısıtlama mikroskop otomasyonu veya scanning laser cytometry deki gelişmelerle birlikte hedef hücrelerin daha düşük seviyelerinin güvenilir olarak saptanmasında etkili bir araç olabilecektir. Rasyonel örnekleme yaklaşımlarının kullanımı gıdalardaki *Salmonella* ve *Listeria* gibi patojen bakterilerin saptanmasını artıracaktır. Bu nedenle küçük bir hacimdeki birkaç hücrenin bile zenginleştirme aşamasına tabi tutulması hedef hücrelerin daha kolaylıkla ve daha erken saptanmasını sağlayacak ayrıca filtrasyon, santrifügasyon gibi ilave bir konsantre etme aşamasına gerek kalmayacaktır.

Genel olarak gıdalarda patojen bakterilerin saptanmasına ilişkin deneysel çalışmalar düşük, orta ve yüksek inokulum yapıldığı homojen koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Ancak gerçekçi bir senaryoda muhtemelen çok düşük sayıda kontamine bakteri besin yetersizliği, ısı hasarı, ozmotik şok gibi çeşitli fizyolojik streslere maruz kalmıştır. Hasar görmüş hücreler gecikme (lag) fazı süreleri açısından geniş çapta değişkenlik göstermektedir ve bu özelliğin mikrobiyolojik olarak heterojen örneklerdeki düşük sayıdaki patojen bakterinin geleneksel kültürel yöntemlerle saptanmasında önemli etkilere sahip olabilmektedir. Bu düşük seviyelerdeki kontaminasyonlarda tek bir hücre bir popülasyonun oluşmasına olanak tanıyabilecek ve hatta bozulma ya da hastalığa neden olabilecektir. Bu nedenle her bir mikrobiyal hücrenin geri kazanımı ve gelişimine ilişkin faktörlerin anlaşılması gıdanın güvenliği ve raf ömrü için riskleri en doğru şekilde tanımlamada önemli olmaktadır.

Çalışmada düşük seviyede inokulum yapılmamış (1-10 hücre/örnek) olması, denemelerde kullanılan söz konusu bakterilerin serotiplerinin, türlerinin ve suşlarının sınırlı sayıda olması, bir eksikliklerdir. Yöntemlerin kıyaslanması açısından daha geniş kapsamlı gıda matrisi kullanılması uygun olacaktır. Daha sonra gerçekleştirilmesi düşünülen çalışmalarda bu noktaların göz ardı edilmemesi gerekmektedir.

REFERANSLAR

- AABO, S., Andersen, J.K., Olsen, J.E., Antemortem Condemnation, *Journal of Food Protection*, 56, 110-3, (1995).
- AKILLI, A., Ankara'da Süpermarketlerde Satılan Hazır Kıymaların Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kaliteleri ile Tek Tırnaklı Hayvan Etleri Yönünden İncelenmesi Üzerine Araştırmalar, *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 125-58, (1982-1983).
- AKIN, A., Kaya, B., Ankara'da Satılan Etlerin Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü, Bölüm 1. kıymaların mikrobiyolojik kalite kontrolü, *Doğa Dergisi*, 12, 183-9, (1988).
- AMANN, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic and Environmental Studies in Microbiology, *Journal of Bacteriology*, 172, 762-70, (1990).
- AMANN, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Phylogenetic Identification and *in situ* Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation, *Microbiological Reviews*, 59, 143-69, (1995).
- AMAVISIT, P., Browning, G.F., Lightfoot, D., Church, S., Anderson, G.A., Whithear, K.G., Markham, P.F., Rapid PCR Detection of *Salmonella* in Horse Faecal Samples, *Veterinary Microbiology*, 79, 63-74, (2001).
- ANONYMOUS, Çiğ Kanatlı Eti ve Hazırlanmış Kanatlı Eti Karışımları Tebliği. Yetki Kanunu: Tük Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Yayımlandığı R.Gazete:07.07.2006/26221. Tebliğ No: 2006/29, (2006a).
- ANONYMOUS, Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliği. Yetki Kanunu: Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Yayımlandığı R.Gazete: 07.07.2006/26221. Tebliğ No: 2006/31, (2006b).
- ANONYMOUS, Microbiology – General Guidance for Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* – Most Probable Number Technique (ISO 7251). International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland, (revised in 2005) (1993).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – General Guidance for the Enumeration of Microorganisms-Colony Count Technique at 30°C (ISO 4833). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, (1989).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002), International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, (2002).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* - Most Probable Number Technique (ISO 7251:2005), International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, (2005).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony Count Method (ISO 21528–2). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, (2004).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of β -glucuronidase – Positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count Technique at 44°C Using 5-bromo–4–chloro–3–indolyl–beta–D–glucuronide (ISO 16649–2). International Organisation for Standardisation. Geneva, Switzerland, (2001).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs – Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination – Part 3: Specific Rules for the Preparation of Fish and Fishery Products (ISO 6887–3), International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, (2003).
- ANONYMOUS, Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of Coliforms – Colony Count Technique (ISO 4832). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, (2006).
- ARBEIT, R.D., *Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganisms*, pp: 190-208. Manual of clinical microbiology, eds: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R. H., American Society of Microbiology-Washington, D.C., USA, (1995).
- ARROYO, G., Arroyo, J.A., Detection of *Salmonella* Serotypes in Edible Organ Meats from Markets in Madrid, Spain, *Food Microbiology*, 12, 13-20, (1995).
- BACHHIL, V.N., Jaiswal, T.N., Occurrence of *Salmonella* in Meats, *Journal of the Food Science and Technology*, 25, 310-12, (1988).

- BAILEY, J.S., Detection of *Salmonella* Cells within 24-26 h in Poultry Samples with the Polymerase Chain Reaction BAX System, *Journal of Food Protection*, 61, 792-5 (1998).
- BAILEY, J.S., Cosby, D.E., Detection of *Salmonella* from Chicken Rinses and Chicken Hot Dogs with the Automated BAX PCR System, *Journal of Food Protection*, 66, 2138-40, (2003).
- BAILEY, J.S., Fletcher, D.L., Cox, N.A., Recovery and Serotype Distribution of *L. monocytogenes* from Broiler Chicken in the Southeastern United States, *Journal of Food Protection*, 52, 148-50, (1989).
- BAYSAL, A.H., Gıda Endüstrisinde Alternatif ve Hızlı Mikrobiyolojik Kontrol Yöntemleri, Gıda Kongresi 2005, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir-Türkiye, (2005) pp: 305-8.
- BEIMFOHR, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., *In situ* Identification of *Lactococci*, *Enterococci* and *Streptococci*, *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 450-6, (1993).
- BELI, E., Telo, A., Duraku, E., *Salmonella* Serotypes Isolated from Turkey Meat in Albania, *International Journal of Food Microbiology*, 63, 165-7, (2001).
- BENNETT, A.R., Greenwood, D., Tennant, C., Banks, J.G., Betts, R.P., Rapid and Definitive Detection of *Salmonella* in Foods by PCR, *Letters in Applied Microbiology*, 26, 437-41, (1998).
- BERKTAŞ, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alişarlı, M., Güdücüoğlu H., Et ve Et Ürünlerinden *Listeria monocytogenes*'in İzolasyonu, *Van Tıp Dergisi*, 13, 36-41, (2006).
- BİLİR ORMANCI, F.S., Erol, I., Ayaz, N.D., Iseri, O., Sariguzel, D., (2008) Immunomagnetic Separation and PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Turkey Meat and Antibiotic Resistance of the Isolates, *British Poultry Science*, 49, 5, 560-5.
- BLASCO, L., Ferrer, S., Pardo, I., Development of Specific Fluorescent Oligonucleotide Probes for *in situ* Identification of Wine Lactic Acid Bacteria, *FEMS Microbiology Letter*, 225, 115-23, 2003..
- BOER, E., Zee, H., Netten, P., Occurrence of *Salmonella* in Meat and Meat Products, *Voedingsmiddelentech*, 25, 17-9, (1992).
- BOTTARI, D.A., Emmett, C.D., Nichols, C.E., Whippie, K.D., Rodriguez, D., Durbin, G.W., Keough, K.M., Groody, E.P., Mozola, M.A., Reynolds, G.N., Comparative Study of a Colorimetric DNA Hybridization Method and Conventional Culture Procedures for the Detection of *Listeria* spp. in foods, *Journal of Food Protection*, 58, 10, 1083-90, (1995).
- BRACKET, R.E., Presence and Persistence of *L. monocytogenes* in Food and Water, *Food Technology*, 42, 162-4, (1988).
- BREHM-STECHER, B.F., Johnson, E.A., *Rapid Detection of Listeria*, *Listeria*, pp: 257-81, Listeriosis, and Food Safety, eds: Ryser, E.T., Marth, E.H., CRC Pres-Boca Raton, FL, (2007) Pp: 873.
- BREUER, V.J., Prandl, O., Nachweis von Listerien und Deren Vorkommen in Hackfleisch und Mettwürsten in Österreich, *Archiv. Lebensmittelhygiene*, 39, 28-30, (1988).
- BUNCIC, S., The Incidence of *L. monocytogenes* in Slaughtered Animals in Meat and in Meat Products in Yugoslavia, *International Journal of Food Microbiology*, 12, 173-80, (1991).
- CAPITA, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., Garcia-Fernandez, M.C., Occurrence of *Listeria* Species in Retail Poultry Meat and Comparison of a Cultural Immunoassay for Their Detection, *International Journal of Food Microbiology*, 65, 75-82, (2001).
- CAPITA, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., Garcia-Fernandez, M.C., Occurrence of *Salmonellae* in Retail Chicken Carcasses and Their Products in Spain, *International Journal of Food Microbiology*, 81, 169-73, (2003).
- CARLI, K.T., Eyigor, A., Caner, V., Prevalence of *Salmonella* Serovars in Chickens in Turkey, *Journal of Food Protection*, 64, 1832-5, (2001).
- CARPENTER, S.L., Harrison, M.A., Survival of *L. monocytogenes* on Processed Poultry, *Journal of Food Science*, 54, 556-7, (1989).
- CHEN, S., Yee, A., Griffiths, M., Larkin, C., Yamashiro, C.T., Behari, R., Paszko-Kolva, C., Rahn, K., De Grandis, S.A., The Evaluation of a Fluorogenic Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Salmonella* Species in Food Commodities, *International Journal of Food Microbiology*, 15, 5(3), 239-50, (1997).

- COX, N.A., Bailey, J.S., Ryser, E.T., *Incidence and Behavior of Listeria monocytogenes in Poultry and Egg Products*, *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, eds: Ryser E.T., Marth E.H., Marcel Dekker Inc.-New York, (1999) Pp: 565-600.
- CROCI, L., Delibato, E., Volpe, G., De Medici, D., Palleschi, G., Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-linked Immunosorbent Assays, and the Standard Culture Method for Detecting *Salmonella* in Meat Products, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1393-6, (2004).
- CUI, S., Ge, B., Zheng, J., Meng, J., Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4108-11, (2005).
- ÇETİN, K., Yücel, K., Bursa'da Kasap Dükkanlarında Üretilen Kasap Köftesinin Üretimi, Mikrobiyolojik ve Kimyasal Nitelikleri Üzerine Araştırma, *Gıda*, 17, 4, 247-53, (1992).
- ÇETİNKAYA F., Cibik R., Soyutemiz G.E., Ozakin C., Kayali R., Levent B., *Shigella* and *Salmonella* Contamination in Various Foodstuffs in Turkey, *Food Control*, 19, 1059-63, (2008).
- ÇİFTÇİOĞLU, G., İstanbul Piyasasındaki Kıyma, Sucuk ve Tavuk Eti Örneklerinde *Listeria* Türlerinin Mevcudiyetinin Araştırılması, (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (1992).
- ÇİFTÇİOĞLU, G., Uğur, M., Kıyma, Sucuk ve Tavuk Etlerinde *Listeria monocytogenes* Kontaminasyonu, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, 33-44, (1992).
- DAIMS, H., Bruhl, A., Amann, R.I., Schleifer, K.-H., Wagner, M., The Domain-Specific Probe EUB-338 is insufficient for the Detection of All Bacteria: Development and Evaluation of a More Comprehensive Probe Set, *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 434-44, (1999).
- DAIMS, H., Stoecker, K., Wagner, M., *Fluorescence Hybridization for the Detection of Prokaryotes*, Molecular Microbial Ecology, pp: 213-39, eds: Osborn, A.M., Smith, C.J., Taylor and Francis Group-UK, (2005) Pp: 381.
- DARWISH, A., Hamdy, M., Nouman, T.M., Quality Evaluation of Market Meat Pastes, *Veterinary Medical Journal*, 34, 37-48, (1986).
- DEPOURCQ, G., Poucke, L.V., Evaluation of the Microbiological Quality of Minced Meat, Food Policy Trends in Europe, Nutr. Technol. Anal. Safety, Food Policy Symposium, (1981), pp: 200.
- DOYLE, M.P., Effect of Environmental and Processing Conditions on *Listeria monocytogenes*, *Listeria monocytogenes* a Foodborne Pathogen. Overview Outstanding Symposia in Food Science & Technology. *Food Technology*, 42, 169-71, (1988).
- DOYLE, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers.*, ASM Press, Washington, DC., (2001). Pp: 872.
- DUFFY, G., Cloak, M.O., O'Sullivan, M.G., Guillet, A., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A., The Incidence and Antibiotic Resistance Profiles of *Salmonella* spp. on Irish Retail Meat Products, *Food Microbiology*, 16, 623-31, (1999).
- EFSA, The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 223, 1-217, (2009).
- ELISCHEROVA, K., Stupalova, S., Stepanek, J., Some Ecological Aspects of *L. monocytogenes* in Meat Industry, ed: Ivanov I., 7th Int. Symposium on the Problems of Listeriosis, Varna-Bulgaria, 148-55, (1979).
- EL-LEITHY, M.A., Rashad, F.M., Bacteriological Studies on Ground Meat and Its Products, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 40, 58-61. (1989).
- EMSWILLER-ROSE, B., Bennett, B., Okrend, A., Comparison of Cultural Methods and DNA Hybridization Test for Detection of *Salmonella* in Ground Beef, *Journal of Food Science*, 52, 1726-7, (1987).
- ERCOLINI, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R., Development of a Fluorescence *in situ* Hybridization Method for Cheese Using a 16S rRNA Probe, *Journal of Microbiological Methods*, 52, 267-71, (2003).
- EROL, İ., Ankara'da Tüketime Sunulan Kıymalarda *Salmonella*'ların Varlığı ve Serotip Dağılımı, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 321-5, (1999).
- ESTEVEZ, A., Saraiva, C., Ribeiro, P., Patarata, L., Martins, C., *L. monocytogenes* and Hygienic Quality of Raw Meat, Meat for the Consumer, ed: Hildrum K.I., Lillehammer, Norway, (1996).
- EYİCE, O., Ince, B.K., Coskuner, G., Sozen, S., Ince, O., Identification of Nitrifiers in a Full-scale Biological Treatment System Using Fluorescent *in situ* Hybridization, *Journal of Environmental*

- Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 42, 4, 517-23, (2007).
- EYİGÖR, A., Carli, K.T., Unal, C.B., Implementation of Real-time PCR to Tetrathionate Broth Enrichment Step of *Salmonella* Detection in Poultry, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 37-41, (2003).
- FAKHR, M.K., McEvoy, J.M., Sherwood, J.S., Logue, J.M., Adding a Selective Enrichment Step to the IQCheckReal time PCR Improves the Detection of *Salmonella* in Naturally Contaminated Retail Turkey Meat Products, *Letters in Applied Microbiology*, 43, 78-83, (2006).
- FANG, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K., Wiedenmann, A., Improved Detection of *Salmonella* spp. in Foods by Fluorescent *in situ* Hybridization with 23S rRNA Probes: A Comparison with Conventional Culture Methods, *Journal of Food Protection*, 66, 723-31, (2003).
- FANTELLI, K., Stephan, R., Prevalence and Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Minced Meat in Switzerland, *International Journal of Food Microbiology*, 70, 63-9, (2001).
- FARBER, J.M., Sanders, G.W., Johnston, M.A., A Survey of Various Foods for the Presence of *Listeria* Species, *Journal of Food Protection*, 52, 456-8, (1989).
- FARCHMIN, V.G., Das Verhalten der Listerien bei den Verschiedenen Zubereitungsmethoden der Fleisch und Wurstwaren, *Zeitschrift Hygiene*, 8, 616-8, (1963).
- FENLON, D.R., Wild Birds and Silage as Reservoirs of *Listeria* in the Agricultural Environment, *Journal of Applied Bacteriology*, 59, 537-43, (1985).
- FLEMING, D.W., Cochi, S.L., Kristine, L., McDonald, M.D., Brandom, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.L., Reingold, A.L., Pasturized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis, *The New England Journal of Medicine*, 312, 404-7, (1985).
- FLOWERS, R.S., Klatt, M.J., Evaluation of a Visual Immunoassay for Detection of *Salmonella* in Foods, Annual Meeting of IFT, USA, (1987) pp: 122.
- FLUIT, A.C., Widjojatmodjo, M.N., Box, A.T., Torensma, R., Verhoef, J., Rapid Detection of *Salmonellae* in Poultry with the Magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1342-6, (1993).
- FRATAMICO, P.M., Comparison of Culture, Polymerase Chain Reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* Assays for Detection of *Salmonella* spp. in Naturally-Contaminated Ground Chicken, Ground turkey, and Ground Beef, *Molecular and Cellular Probes*, 17, 215-21, (2003).
- FRAZAK, P.A., Outbreak of *Salmonella* Serotype Typhimurium Infection Associated with Eating Raw Ground Beef -Wisconsin, 1994, *MMWR*, 44, 905-9, (1995).
- FRICKER, C.R., The Isolation of *Salmonella* and *Campylobacters*, *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 99-116, (1987).
- FUCHIZAWA, I., Shimizu, S., Kawai Y., Yamazaki, K., Specific Detection and Quantitative Enumeration of *Listeria* spp. Using Fluorescent *in situ* Hybridization in Combination with Filter Cultivation (FISHFC), *Journal of Applied Bacteriology*, 105, 502-9, (2008).
- FUCHS, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann, R., Flow Cytometric Analysis of the *in situ* Accessibility of *E. coli* 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4973-82, (1998).
- FUKUSHIMA, H., Hoshina, K., Nakamura, R., Ito, Y., Raw Beef, Pork and Chicken in Japan Contaminated with *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Clostridium perfringens*-A Comparative Study, *Zentralblatt für Bakteriologie, Microbiologie und Hygiene [B]*, 184, 60-70, (1987).
- GALL, J.G., Pardue, M.L., Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 63, 378-83, (1969).
- GIOVANNONI, S.J., DeLong, D.F., Olsen, G.J., Pace, N.R., Phylogenetic Group Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells, *Journal of Bacteriology*, 170, 720-26, (1988).
- GLASS, K.A., Doyle, M.P., Fate of *L. monocytogenes* in Processed Meat Products During Refrigerated Storage, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1565-69, (1989).

- GONCAGÜL G., Günaydın E., Carlı K.T., Prevalence of *Salmonella* Serogroups in Chicken Meat, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 29, 103-6, (2005).
- GOTTSCHALK, G. Metabolic Diversity of Aerobic Heterotrophs: Biosynthesis of Monomers and Polymers, *Bacterial Metabolism*, Springer-Verlag, New York, (1979). Pp: 110-1.
- GÖKALP, H.Y., Yetim, H., Kaya, M., Ticari Kuruluşlarda Dondurularak Muhafaza Edilen Tavuk Etlerinin Kokuşma Düzeyleri ve Bakteriyolojik Durumları Üzerine Bir Araştırma, *Et ve Balık Endüstrisi Dergisi*, 8, 51, 13-22, (1987).
- GÖKMEN, M., Alişarlı, M., Investigation of Some Pathogenic Microorganisms in Minced Meat Consumed in Van, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14, 27-34, (2003).
- GÖNÜLALAN, Z., Köse, A., Microbiological Quality of Ground Beef Retailed in Kayseri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 17, 49-53, (2003).
- GRACIAS, K.S., McKillip J.L., A Review of Conventional Detection and Enumeration Methods for Pathogenic Bacteria in Food, *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 883-90, (2004).
- GUNASEKARA, T.S., Dorsch, M.R., Slade, M.B., Veal, D.A., Specific Detection of *Pseudomonas* spp. in Milk by Fluorescence *in situ* Hybridization Using Ribosomal RNA Directed Probes, *Journal of Applied Microbiology*, 94, 936-45, (2003).
- GUPTA, A.R., de Rezende, C.L.E., Joseph, S.W., Induction and Resuscitation of Viable But Nonculturable *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6669-75, (2003).
- GÜNAYDIN, E., Eyigör, A., Carlı, K.T., A Capillary Polymerase Chain Reaction for *Salmonella* Detection from Moultry Meat, *Letters in Applied Microbiology*, 44, 24-9, (2007).
- GÜVEN, A., Gülmez, M., Kamber, U., Kars İlinde Tüketime Sunulan Kıymalarda Bazı Patojen Mikroorganizmaların Araştırılması ve Kıymaların Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3, 1, 57-65, (1997).
- GÜVEN, A., Patır, B., Elaziğ İlinde Tüketime Sunulan Et ve Bazı Et Ürünlerinde *Listeria* Türlerinin Araştırılması, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 22, 205-12, (1998).
- HAGENS, S., Loessner, M.J., Application of Bacteriophages for Detection and Control of Foodborne Pathogens, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 513-9, (2007).
- HARRISON, M.A., Carpenter, S.L., Survival of Large Population of *L. monocytogenes* on Chicken Breasts Processed Using Moist Heat, *Journal of Food Protection*, 52, 376-8, 1989.
- HEREDIA, N., Garcia, S., Rojas, G., Salazar, L., Microbiological Condition of Ground Meat Retailed in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Protection*, 64, 1249-51, (2001).
- HINTON, M., Coombs, E., Tucker, V., Jones, S., Allen, V., Hudson, W.R., Corry, J.E.L., The Bacteriological Quality of British Beef 2. Frozen Minced Beef, *Meat Science*, 50, 395-402, (1998).
- HIRSCHHAUSER, S., Fröhlich, J., Gneipel, A., Schönig I., König. H., Fast Protocols for the 5S rDNA and ITS-2 Based Identification of *Oenococcus oeni*, *FEMS Microbiology Letters*, 244, 165-71, (2005).
- HOGUE, A.T., Dreesen, D.W., Green, S.S., Ragland, R.D., James, W.O., Bergeron, E.A., Cook, L.V., Pratt, M.D., Martin, D.R., Bacteria on Beef Briskets and Ground Beef: Correlation with Slaughter Volume and Antemortem Condemnation, *Journal of Food Protection*, 56, 110-13, (1993).
- HPACI. LACORS/HPA Coordinated Local Authority Sentinel Surveillance of Pathogens, Twelve Month Surveillance Report, Nov 2004-October 2005, (2006).
- HUDSON, V.R., Mead, G.L., *Listeria* Contamination of a Poultry Processing Plant, *Letters in Applied Microbiology*, 9, 211-14, (1989).
- HURST, A., Bacterial Injury: A Review, *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 936-44, (1977).
- IONOVA, I., Monov, G., Kholodenko, V., Tanev, M., Raulova, I., Presence of *Salmonellae* and Coliform Bacteria in Ground Meat and the Sources of Its Contamination, *Veterinarno-Meditsinski Nauki*, 18, 69-75, (1981).
- İNCE, B. K., Usenti, I., Eyigor, A., Ayman Oz, N., Kolukirik, M., Ince, O., Analysis of Methanogenic Archaeal and Sulphate Reducing Bacterial Populations in Deep Sediments of the Black Sea, *Geomicrobiology Journal*, 23, 285-92, (2006).

- İNCE, O., Kolukirik, M., Çetecioglu, Z., Eyice, O., Tamerler, C., Ince, B., Methanogenic and Sulfate Reducing Bacterial Population Levels in a full-scale Anaerobic Reactor Treating Pulp and Paper Industry Wastewater Using Fluorescence *in situ* Hybridization, *Water Science and Technology*, 55, 10, 183-91, (2007).
- İŞERİ, Ö., Erol, İ., Hindi Etinden Kaynaklanan Başlıca Bakteriyel İnfeksiyon ve İntoksikasyonlar, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 56, 47-54, (2009).
- JAY, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., *Modern Food Microbiology*, 7th ed. Pp. 790. Springer Science and Business Media, Inc., USA, (2005). Pp: 790.
- JERNGKLINCHAN, J., Koowatananukul, C., Daengprom, K., Saitanu, K., Occurrence of *Salmonellae* in Raw Broilers and Their Products in Thailand, *Journal of Food Protection*, 57, 808-10, (1994).
- JOHNSON, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G., *L. monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Meat and Meat Products, *Journal of Food Protection*, 53, 81-91, (1990).
- KAHRAMAN, T., Aydin A., Prevalence of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Meat and Meat Products in Turkey, *Archive für Lebensmittelhygiene*, 60, 6-11, (2009).
- KANKI, M., Sakata, J., Taguchi, M., Kumeda, Y., Ishibashi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Yamasaki, W., Inoue, K., Miyahara, M., Effect of Sample Preparation and Bacterial Concentration on *Salmonella enterica* Detection in Poultry Meat Using Culture Methods and PCR Assaying of Preenrichment Broths, *Food Microbiology*, 26, 1-3, (2009).
- KARCHES, H., Teufel, P., *Listeria monocytogenes* Vorkommen in Hackfleisch und Verhalten in frischer Zwiebelmettwurst, *Fleischwirt*, 68, 1388-91, (1988).
- KAYA, M., Schmidt, U., Verhalten von *L. monocytogenes* im Hackfleisch bei Kühl- und Gefrierlagerung, *Fleischwirt*, 69, 617, (1989).
- KELL, D.B., Kaprelyants A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., Barer M.R., Viability and Activity in Readily Culturable Bacteria: A Review and Discussion of the Practical Issues, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 169-87, (1998).
- KEMPF, V.A.J., Trebesius, K., Autenrieth, I.B., Fluorescent *in situ* Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2, 830-8, (2000).
- KOLLOFFEL, B., Meile, L., Teuber, M., Analysis of *Brevibacteria* on the Surface of Gruyère Cheese Detected by *in situ* Hybridization and by Colony Hybridization, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 317-22, (1999).
- KOLUKIRIK, M., Ince, O., Ince, B.K., Methanogenic Community Change in a Full-Scale UASB Reactor Operated at a Low F/M Ratio, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42, 7, 903-10, (2007).
- KRAUSE, P., Selimoldt, R., Tolgay, Z., Yurtyeri, A., Mikrobiologiscfte und Serologiscch Untersuchungen an Lebensmitteln in der Türkei, *Fleischwirtsch.*, 52, 83-6, (1972).
- KRETZER, J.W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K.-P., Korn, C., Loessner, M.J., Use of High-Affinity Cell Wall-Binding Domains of Bacteriophage Endolysins for Immobilization and Separation of Bacterial Cells, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1992-2000, (2007).
- KÜPLÜLÜ, Ö., *Sığır Karkaslarında Salmonella Kontaminasyonu ve Serotip Dağılımı*, (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (1995).
- KWIATEK, K., Wojton, B., Rola, J., The Occurrence of *L. monocytogenes* in Meat of Slaughter Animals, Poultry and Raw Milk in Poland, 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin-Germany, (1992) pp: 1084-8.
- LANGENDIJK, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H.F., Welling, G.W., Quantitative Fluorescence *in situ* Hybridization of *Bifidobacterium* spp. with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes and Its Application in Faecal Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3069-75, (1995).
- LEISTNER, L., Schmidt, U., Kaya, M., Listerien bei Fleisch und Fleischerzeugnissen, Mitteilungsblatt der Bundessanstalt für. *Fleischforschung Kulmbach*, 28, 193-9, (1989).
- LI, Y., Mustapha, A., Evaluation of Four Template Preparation Methods for Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Salmonella* in Ground Beef and Chicken, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 508-12, (2002).

- LICHT, T.R., Krogfelt, K.A., Cohen, P.S., Poulsen, L.K., Urbance, J., Molin, S., Role of Lipopolysaccharide in Colonization of the Mouse Intestine by *Salmonella typhimurium* Studied by *in situ* Hybridization, *Infection and Immunity*, 64, 9, 3811-7, (1996).
- LIN, C.-K., Tsen, H.-Y., Development and Evaluation of Two Novel Oligonucleotide Probes Based on 16S rRNA Sequence for the Identification of *Salmonella* in Foods, *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 507-20, (1995).
- LINNAN, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hýrd, D.W., Yonekura, M.Y., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytýs, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. and Broome, C.V., Epidemic Listeriosis Associated with Mexican-Style Cheese, *The New England Journal of Medicine*, 319, 823-8, (1988).
- LOVETT, J., Hitchins, A.D., *Listeria* Isolation. FDA Bacteriological Analytical Manual. *Federal Register*, 53, 44148-53, (1988).
- MANAFI, M., New Developments in Chromogenic and Fluorogenic Culture Media, *International Journal of Food Microbiology*, 60, 205-18 (2000).
- MANZ, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H., Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions, *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 593-600, (1992).
- MARTH, E.H., Disease Characteristics of *L. monocytogenes*, *Food Technology*, 42, 165-8, (1988).
- MERCANOĞLU, B., Aytac, S.A., Immunomagnetic Separation and a Cultural Reference Method for Detection of *Salmonella* spp. in Foods, *Archiv Lebensmittelhygiene*, 53, 43-5, (2002).
- MERCANOĞLU, B., Griffiths, M.W., Combination of Immunomagnetic Separation with Real-Time PCR for Rapid Detection of *Salmonella* in Milk, Ground Beef, and Alfalfa Sprouts, *Journal of Food Protection*, 68, 557-61, (2005).
- MOTER, A., Göbel, U.B., Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) for Direct Visualization of Microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 41, 85-112, (2000).
- MREMA, N., Mpuchane, S., Gashe, B.A., Prevalence of *Salmonella* in Raw Minced Meat, Raw Fresh Sausages and Raw Burger Patties from Retail Outlets in Gaborone, Botswana, *Food Control*, 17, 207-12, (2006).
- MÜLLER, H.E., Listeriosis in Animals, *Turkish Journal of Infection*, 2, 505-19, (1988).
- NARASHIMA RAO, D., Ramesh, B.S., Microbial Profiles of Minced Meat, *Meat Science*, 23, 279-91, (1988).
- NICALAS, J.A., Espaze, E.P., Camitel, B., Vidaud, N., Rocourt, J., Courtieu, A.L., Isolation of *Listeria* from French Meat Products, *Zentralblatt für Bakteriologie*, 272, 242-7, (1989).
- NITCHEVA, L., Yonkova, V., Popov, V., Manev, C., *Listeria* Isolation from Foods of Animal Origin, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 37, 223-5, (1990).
- NORDENTOFT, S., Christensen, H., Wegener, H.C., Evaluation of a Fluorescence-Labelled Oligonucleotide Probe Targeting 23S rRNA for *in situ* Detection of *Salmonella* Serovars in Paraffin-Embedded Tissue Sections and their Rapid Identification in Bacterial Smears, *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2642-8, (1997).
- OLIVER, J.D., The Viable but Nonculturable State in Bacteria, *Journal of Microbiology*, 43, special issue (No. S), 93-100, (2005).
- OOTSUBO, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Ezura, Y., Seven-hours Fluorescence *in situ* Hybridization Technique for Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Food and Environmental Water Sample, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1182-90, (2003).
- PATANO, C., Caserio, G., Bacteriological and Chemical Studies on Minced Meat, *Industria Alimentare*, 19, 829-32, (1980).
- PELKONEN, S., Romppanen, E.L., Siitonen, A., Pelkonen, J., Differentiation of *Salmonella* Serovar Infantis Isolates from Human and Animal Sources by Fingerprinting IS 200 and 16S RNA Loci, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2128-33, (1994).
- PIETZSCH O., KAWERAU H.: Salmonellen in Schweineschlachtund-Zerlegebetrieben sowie Schweinehackfleisch, Bundesgesundheitsamt, Berlin, 4, *Veterinary Medicine Hefte*, (1984).
- PLUMMER, R.S., Blissett, S.J., Dodd, C.E.R., *Salmonella* Contamination of Retail Chicken Products Sold in the UK, *Journal of Food Protection*, 58, 843-6, (1995).

- POETA, A., Possidente, R., Giaccone, V., Microbial Quality of Fresh Meat and Meat Products in butchers' shops, *Industrie Alimentaire*, 32, 1200-5, (1993).
- RAY, B., Impact of Bacterial Injury and Repair in Food Microbiology: Its Past, Present and Future, *Journal of Food Protection*, 49, 651-55, (1986).
- ROLLER, C., Wagner, M. Amann, R. Ludwig, W., Schleifer. K.-H., *In situ* Probing of Gram-Positive Bacteria with High DNA G+C Content Using 23S rRNA-Targeted Oligonucleotides, *Microbiology*, 140, 2849-58 (1994)..
- RORVIK, M.L., Yndestad, M., *Listeria monocytogenes* in Foods in Norway, *International Journal of Food Microbiology*, 13, 97-104, (1991).
- ROSE, B.E., Hill, W.E., Umholtz, R., Ransom, G.M., James, W.O., Testing for *Salmonella* in Raw Meat and Poultry Products Collected at Federally Inspected Establishments in the United States of America, 1998 through 2000, *Journal of Food Protection*, 65, 937-47, (2002).
- ROTTERUD, O.J., Nesbakken, T., *Listeria monocytogenes* in the Meat Industry, Occurrence and Preventive Measures, 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin-Germany, (1992) pp: 1089.
- RÖNNER, S.G.E., Stackebrandt, E., Development of 23S rRNA-Oligonucleotide Probes for the Identification of *Salmonella* Species, *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 2, 257-64, (1994).
- RYCHLIK, I., Van Kesteren, L., Cardová, L., Švestková, A., Martínková, R., Šišák, F., Rapid Detection of *Salmonella* in Field Samples by Nested Polymerase Chain Reaction, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 269-72, (1999).
- SAĞUN, E., Durmaz, H., Tarakci, Z., Sagdic, O., Antibacterial Activities of the Extracts of some Herbs Used in Turkish Herby Cheese Against *Listeria monocytogenes* Serovars, *International Journal of Food Properties*, 9, 255-60, (2006).
- SAĞUN, E., Sancak, Y.C., Durmaz, H., Akkaya, L., Van'da Tüketime Sunulan Çiğ Köftelerin Hijyenik Kaliteleri Üzerine bir Araştırma, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 64-7, (1997).
- SAĞUN, E., Sancak, Y.C., Ekici, K., Durmaz, H., Van'da Tüketime Sunulan Piliç But ve Göğüs Etlerinin Hijyenik Kalitesi Üzerine Bir Araştırma, *Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7, 1-2, 62-6, (1996).
- SALTAN, S., Kasaplık Hayvanlarda Önemli Bazı *Enterobacteriaceae* Grubu Mikroorganizmaların Araştırılması, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 18, 189-94, (1994).
- SAMADPOUR, M., Barbour, M.W., Nguyen, T., Cao, T.-M., Buck, F., Depavia, G.A., Incidence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Retail Fresh Ground Beef, Sprouts, and Mushrooms, *Journal of Food Protection*, 69, 441-43, (2006).
- SAMELIS, J, Metaxopoulos, J., (1999): Incidence and Principal Sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* Contamination in Processed Meats and a Meat Processing Plant, *Food Microbiology*, 16, 465-77.
- SANCAK, Y.C., Boynukara, B., Aġaoġlu, S., The Microbiological Quality of Ground Meat Marketed in Van, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4, 73-86, (1993).
- SARDESSAI, Y.N., Viable but Non-Culturable Bacteria: Their Impact on Public Health, *Current Science*, 89, 10, 1650, (2005).
- SARIGÖL, C., Elazığ'da Tüketilen Kıymalarda *Clostridium* ve *Enterobacteriaceae* Grubu Mikroorganizmaların Varlığı Üzerinde Araştırmalar, *Firat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7, 179-86, (1982).
- SCHEELHAAS, G., Klein, D., Kleickmann, A., Zum Vorkommen von Salmonellen in Hackfleisch und anderen Erzeugnissen aus rohem, zerkleinertem Fleisch. *Fleischwirtsch*, 56, 1100-2, (1976).
- SCHLOSSER, W., Hogue, A., Ebela, E., Rosea, B., Umholtza, R., Ferris, K., James, W., Analysis of *Salmonella* Serotypes from Selected Carcasses and Raw Ground Products Sampled Prior to Implementation of the Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point Final Rule in the US, *International Journal of Food Microbiology*, 58, 107-11, (2000).

- SCHMID, M., Walcher, M., Bubert, A., Wagner, M., Wagner, M., Schleifer, K.-H., Nucleic Acid-Based, Cultivation-Independent Detection of *Listeria* spp. and Genotypes of *L. monocytogenes*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 215-25, (2003).
- SCHMIDT, U., Seeliger, H.P.R., Gleen, E., Langer, B., Leistner, L., Listerienfunde in rohen Fleischerzeugnissen, *Fleischwirtsch*, 68, 1313-6, (1988).
- SCHMIDT, U., Seeliger, H.P.R., Glenn, E., Langer, B., Leistner, L., Listerienfunde in Rohen Fleischerzeugnissen. Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, *Kumblach*, 101, 8080-7, (1988).
- SEELIGER, H.P.R., Jones, D., Genus *Listeria*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, (1986). Pp: 1235-45.
- SEELIGER, H.P.R., Why Listeriosis, *Journal of Infection*, 2, 455-60, (1988).
- SHARIF, A., Tunail, N., Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods of Animal Origin, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 19, 329-34, (1995).
- SHÖNBERG, A., Teufel, P., Weise, E., Serovars of *L. monocytogenes* and *L. innocua* from Food, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 36, 249-53, (1989).
- SIERRA, M.L., Gonzalez-Fandos, E., Garcia-Lopez, M.L., Fernandez, M.C.G., Prieto, M. Prevalence of *Salmonella*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Campylobacter* and Cold Growing *E. coli* on Freshly Dressed Lamb Carcasses, *Journal of Food Protection*, 58, 1183-5, (1995).
- SIRIKEN, B., The Microbiological Quality of Ground Beef in Aydin and Afyon Provinces, Turkey, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 155, 632-6, (2004).
- SORENSEN, O., Van Donkersgoed, J., Mcfall, M., Manninen, K., Gensler, G., Ollis, G., *Salmonella* spp. Shedding by Alberta Beef Cattle and the Detection of *Salmonella* spp. in Ground Beef, *Journal of Food Protection*, 65, 484-91, (2002).
- SPRING, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Petersen, N., Phylogenetic Diversity and Identification of Nonculturable Magnetotactic Bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 116-22, (1992).
- STOCK, K., Stolle, A., Incidence of *Salmonella* in Minced Meat Produced in a European Union-Approved Cutting Plant, *Journal of Food Protection*, 64, 1435-38, (2001).
- ŞİRELİ, U.T., Erol, İ., Hazır Kıymalarda *Listeria* Türlerinin Araştırılması, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 23, 373-80, (1999).
- TEKİNŞEN, O.C., Yurtyeri, A., Mutluer, B., Ankara'da Satılan Hazır Kıymaların Bakteriyolojik Kalitesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27, 45-63, (1980).
- TERNSTRÖM, A., Molin, G., Incidence of Potential Pathogenes on Raw Pork, Beef and Chicken in Sweden with Special Reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Journal of Food Protection*, 50, 141-6, (1987).
- TERPLAN, G., *Listeria*, Gıda Maddelerinde Bulunuşu ve Sağlık Yönünden Önemi, Mikroorganizmalar ile Gıda Teknolojisi ve Gıda Hijyeni Arasındaki İlişkiye Bir Örnek, Seminer, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İstanbul, (1989).
- TOWNER, K.J., Cockayne A., *Molecular Methods for Microbial Identification and Typing*, Chapman & Hall, London, UK (1993). Pp: 202.
- UYTTENDAELE M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D., Prevalence of *Salmonella* in Poultry Carcasses and their Products in Belgium, *International Journal of Food Microbiology*, 40, 1-8, (1998).
- UYTTENDAELE, M., De Troy, P., Debevere, J., Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in Poultry Carcasses and Different Types of Poultry Products for Sale on the Belgian Retail Market, *Journal of Food Protection*, 62, 735-40, (1999).
- ÜNLÜTÜRK, A., Turantaş F., *Gıda Mikrobiyolojisi*, Düzeltilmiş 3.baskı, İzmir, (2003). Pp: 606.
- VANDAMME, P., Pot, B. Gillis, M. de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics, *Microbiological Reviews*, 60, 407-38, (1996).
- VIEIRA-PINTO, M., Oliveira, M., Aranha, J., Martins, C., Bernardo, F., Influence of an Enrichment Step on *Salmonella* spp. Detection by Fluorescent *in situ* Hybridization on Pork Samples, *Food Control*, 19, 3, 286-90, (2008).

- WAGNER, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.-H., Probing Activated Sludge with Oligonucleotides Specific for Proteobacteria: Inadequacy of Culture-Dependent Methods for Describing Microbial Community Structure, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1520-5, (1993).
- WAGNER, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.-H., Bubert, A., Goebel, W., Schleifer, K.-H. *in situ* Detection of a Virulence Factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 160, 159-68, (1998).
- WALLNER, G., Amann, R., Beisker, W., Optimizing Fluorescent *in situ* Hybridization with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms, *Cytometry*, 14, 136-43, (1993).
- WANG, G.H., Qiao, X.L., The incidence of *Cl. perfringens*, *S. aureus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* in Retail Meat and Meat Products in Beijing, *Fleischwirt*, 73, 288-90, (1994).
- WANG, R.-F., Cao, W.-W. Cerniglia, C.E., A Universal Protocol for PCR Detection of 13 Species of Foodborne Pathogens in Foods, *Journal of Applied Microbiology*, 83, 727-36, (1997).
- WEGENER, H.C., Baggesen, D.L., Investigation of an Outbreak of Human Salmonellosis Caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Infantis by Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis, *International Journal of Food Microbiology*, 32, 125-31, (1996).
- WEIS, J., Seeliger, H.P.R., Incidence of *L. monocytogenes* in Nature, *Journal of Applied Microbiology*, 30, 29-32, (1975).
- WEISE, E., Zum Vorkommen von Listerien in Geschlachtetem Geflügel des Einzelhandels. Institute für Veterinärmed. Des Bundesgesundheitsamtes, Berlin-Germany, (1987).
- WEISS, J., Vorkommen von Listerien in Hackfleisch, *Tierarztl Umschau*, 44, 370-5, (1989).
- WESLEY, I.V., Harmon, K.M., Dickson, J.S., Schwartz, A.R., Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Confirmation of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Turkey Sample Surveillance, *Journal of Food Protection*, 65, 780-5, (2002).
- WHITE, D.G., Zhao, S.D.V.M., Sudler, R.M.S., Ayers, S., Friedman, S.B.A., Chen, S.D.V.M., McDermott, P.F., McDermott, S.B.S., Wagner, D.D., Meng, J., The Isolation of Antibiotic-Resistant *Salmonella* From Retail Ground Meats, *The New England Journal of Medicine*, 345, 1147-54, (2001).
- WHO (World Health Organization) Foodborne Listeriosis, Report of a WHO Informal Working Group, Genova-Italy, (1988) pp: 15-9.
- WHYTE, P., Mc Gill, K., Collins, J.D., Gormley, E., The Prevalence and PCR Detection of *Salmonella* Contamination in Raw Poultry, *Veterinary Microbiology*, 89, 53-60, (2002).
- WONG, H.C., Chao, W.L., Lee, S.J., Incidence and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Foods Available in Taiwan, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3101-4, (1990).
- WYATT, C.J., Guy, V., Relationships of Microbial Quality of Retail Meat Samples and Sanitary Conditions, *Journal of Food Protection*, 43, 385-9, (1980).
- YOUSSEF, H., Hefnawy, Y., Ahmed, S.H., Abdel Rhaman, H., Bacteriological Evaluation of Raw Minced Meat in Assiut City, *Fleishwirtsch*, 64, 590-2, (1984).
- YÜCEL, 1998 Yücel A: Piyasada Satılan Piliç Karkaslarının Mikrobiyel Kontaminasyonu Üzerine Araştırmalar, *Uludağ Üniversitesi Yayınları*, 7-018-0179, 1-8, (1988).
- YÜCEL, A., Çetin, K., Gürbüz, O., Bursa İlinde Satılan Hazır Kıymalarda, Gıda Zehirlenmelerine Neden Olan Bazı Mikroorganizmaların Varlığı Üzerine Bir Çalışma, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, 8, 93-100, (1991).
- ZEWDE, G., Productivity of Three Brands of Modified Semi Solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium and Isolation of *Salmonella* from Chicken Carcasses and Chicken Pieces, *Fleischwirtsch*, 79, 71-3, (1999).
- ZHAO, C., Ge, B., Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., Meng, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C. Area, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5431-6, (2001).
- ZHAO, T., Doyle, M.P., Evaluation of Universal Pre-enrichment Broth for Growth of Heat-Injured Pathogens, *Journal of Food Protection*, 64, 1751-5, (2001).

- ZHAO, T., Doyle, M.P., Fedorka-Cray, P.J, Zhao, P., Ladelys, S.R., Occurrence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104A in Retail Ground Beef, *Journal of Food Protection*, 65, 403-7, (2002).
- ZHAO, Z.-M., Shortridge, K.F., Garcia, M., Guan, Y., Wan, X.-F., Genotypic Diversity of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses, *Journal of General Virology*, 89, 2182-93, (2008).
- ZIVKOVIĆ, J., Uhić, S., Hadziomanović, M., The Occurrence of *Listeria* spp. in Meat in the Republic of Croatia, 3rd World Congress Foodborne Infection and Intoxications, Berlin-Germany, (1992): pp: 501-5.

EK-1 Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%4 PFA Çözeltisi 0,8 g PFA üzerine 5-10 mL 1XPBS eklenir ve karışımın üstüne alüminyum folyo kaplanır. PFA ısıtıcıda 70-80°C'de karıştırılarak çözülür. PFA çözüldükten sonra buz kabında soğutulur. Soğutulan çözelti HCl ve NaCl kullanılarak pH 7,2'ye getirilir. pH ayarından sonra PBS ile 20 ml'ye tamamlanır. 0,2 µm'lik steril filtreden geçirilerek sterilize edilir.

50X TAE Çözeltisi 242 g 2 M Tris base, 57,1 mL 1 M glacial asetik asit ve 100 mL 0,5 M EDTA karıştırılarak dH₂O ile 1 litreye, tamamlanır.

EDTA Çözeltisi 186,1 g disodyum EDTA.2H₂O, 800 mL dH₂O'de çözülür. pH 8'e ayarlanır, 1 litreye tamamlanır.

200 mM Tris HCl (pH 7,2) 12,114 g Tris 350 mL dH₂O'da çözülür. pH 7,2'ye ayarlanır. dH₂O ile 500 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edilir ve filtreden geçirilir.

0,5 M EDTA Çözeltisi 93,05 g EDTA 350 ml dH₂O'da çözülür. pH 8,0'a ayarlanır. dH₂O ile 500 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edilir ve filtreden geçirilir.

TE (Tris EDTA Buffer, pH 8) Çözeltisi 10 mM Tris HCl (1M stoktan 1 mL, pH 8) ve 1 mM EDTA (0,5 M çözeltiden 200 µL, pH 8) karıştırılarak dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanır. Otoklavlanarak sterilize edilir ve filtreden geçirilir.

%10 SDS (pH 8) Çözeltisi 100 g SDS 900 mL distile suda çözülür. 68°C'ye ısıtılır. pH 7,2'ye ayarlanır. dH₂O ile 1 litreye tamamlanır.

4,5 M NaCl Çözeltisi 26,325 g NaCl 80 mL dH₂O'da çözülür. Distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Çözelti otoklavlanarak sterilize edilir.

10X Phosphate Buffer Saline (PBS) 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ 800 mL dH₂O'da çözülür. pH 7,2'ye ayarlanır. dH₂O ile 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır.

250 mM NaH₂PO₄ 33,51 g NaH₂PO₄, 350 mL dH₂O içerisinde çözülür. pH 7,2'ye ayarlanır. Distile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

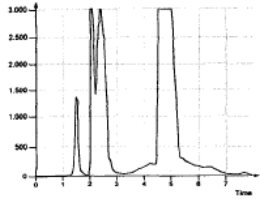
50X Denhart's Reagent 5 g Ficoll (Type 400, Pharmacia), 5 g Polyvinylprolidone, 5 g Bovine Serum Albumine (Fraction V, Sigma) karıştırılır, dH₂O ile 500 mL'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek - 20°C'de saklanır.

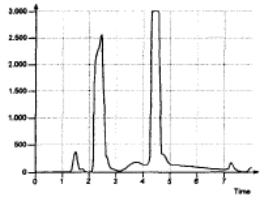
DABCO (1,4 diazobicyclo [2.2.2] oktan) [D-2522] Çözeltisi 0,233 g DABCO 800 µL ddH₂O'da çözülür, 200 µL Tris HCl (pH 7,2) ilave edilir. DABCO çözeltisi bire on seyreltilerek kullanılır. FISH lamındaki her kuyucuğa 10 µL olarak eklenir.

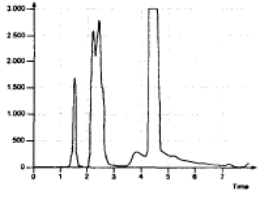
Hibridizasyon Tamponu 200 µL NaCl (4.5 M), 100 µL Tris HCl (200 µM), 200 µL Denhart's (10X), 10 µL EDTA (0.5 M), 10 µL SDS (%10), 50 µL NaH₂PO₄ (250 µM), X µL Formamide (1X) ve 450 µL MQ toplam hacim 1 mL olacak şekilde karıştırılarak kullanılır.

Yıkama Tamponu 10 mL NaCl (4.5 M), 5 mL Tris HCl (200 µM), 2.5 mL NaH₂PO₄ (250 µM), 100 µL SDS (% 10), %20'lik FA'dan 500 µL (0,5 M) ve 32,5 mL MQ toplam hacim 50 mL olacak şekilde karıştırılarak kullanılır. Çözeltide FA yoksa EDTA da eklenmez.

EK-2 Bakteri Probları

EUB 338				HPLC, 260 nm	
Amount	4,3 OD	Length 18	ID# OR250780-49		Time
	23,6 nmol	GC content 66,7 %	Scale 0,04		
	141,8 µg				
Tm	51,5 °C	A G C T	Purification / Quality Control		
Volume for 100 pmol/µl	236,3 µl	2,0 6,0 6,0 4,0	HPLC		
Molecular weight	6001,2 g/mol		Date 17.06.2008		
5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'					
5'-Cy3					

EUB 338 II				HPLC, 260 nm	
Amount	3,2 OD	Length 18	ID# OR250780-50		Time
	17,0 nmol	GC content 66,7 %	Scale 0,04		
	102,4 µg				
Tm	53,0 °C	A G C T	Purification / Quality Control		
Volume for 100 pmol/µl	170,4 µl	3,0 6,0 6,0 3,0	HPLC		
Molecular weight	6010,2 g/mol		Date 17.06.2008		
5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'					
5'-Cy3					

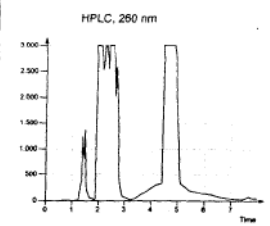
EUB 338 III				HPLC, 260 nm	
Amount	4,3 OD	Length 18	ID# OR250780-51		Time
	23,3 nmol	GC content 66,7 %	Scale 0,04		
	139,9 µg				
Tm	53,0 °C	A G C T	Purification / Quality Control		
Volume for 100 pmol/µl	233,0 µl	2,0 6,0 6,0 4,0	HPLC		
Molecular weight	6001,2 g/mol		Date 17.06.2008		
5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT-3'					
5'-Cy3					

This product certificate was generated electronically and is valid without signature.

Page 17/18

Thermo Fisher Scientific
 Sedanstraße 18 D - 65077 Ulm, Germany
 Tel.: +49 731 935 79-290 Fax: +49 731 935 79-291
 E-Mail: sales.biopolymers@thermo.com
<http://www.thermo.com/biopolymers>

UNIV1390			
Amount	5,5 OD	Length 18	ID# OR250780-48
	26,9 nmol	GC content 61,1 %	Scale Scale 0,04
	164,4 µg		
Tm	52,2 °C	A G C T	Purification / Quality Control
Volume for 100 pmol/µl	268,9 µl	4,0 8,0 3,0 3,0	HPLC
Molecular weight	6114,3 g/mol		Date 17.06.2008
			State Dried
5'-GAC GGG CCG TGT GTA CAA-3'			
5': Cy3			

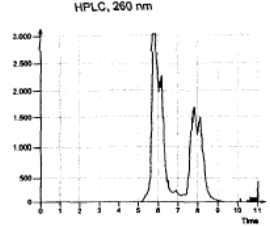


This product certificate was generated electronically and is valid without signature.

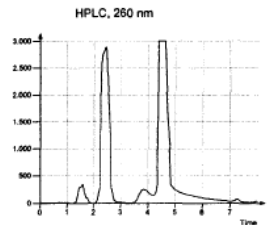
Page 16/18

Thermo Fisher Scientific
Sedanstraße 18 D - 89077 Ulm, Germany
Tel.: +49 731 935 79-290 Fax: +49 731 935 79-291
E-Mail: sales.biopolymers@thermo.com
http://www.thermo.com/biopolymers

Ent 16S			
Amount	3,3 OD	Length 18	ID# CR250780-52
	20,5 nmol	GC content 61,1 %	Scale Scale 0,04
	120,8 µg		
Tm	- °C	A G C T	Purification / Quality Control
Volume for 100 pmol/µl	205,4 µl	0,5 3,0 8,0 6,5	HPLC
Molecular weight	5882,6 g/mol		Date 17.06.2008
			State Dried
5'-CCC CCW CTT TGG TCT TGC-3'			
5': Cy3			



Lis-637			
Amount	3,6 OD	Length 21	ID# OR250780-53
	17,7 nmol	GC content 52,4 %	Scale Scale 0,04
	119,7 µg		
Tm	50,3 °C	A G C T	Purification / Quality Control
Volume for 100 pmol/µl	176,7 µl	3,0 2,0 9,0 7,0	HPLC
Molecular weight	6777,7 g/mol		Date 17.06.2008
			State Dried
5'-CAC TCC AGT CTT CCA GTT TCC-3'			
5': Cy3			

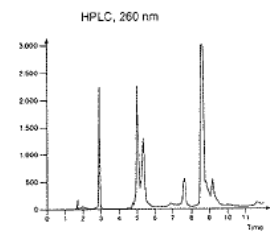


This product certificate was generated electronically and is valid without signature.

Page 18/18

Thermo Fisher Scientific
Sedanstraße 18 D - 89077 Ulm, Germany
Tel.: +49 731 935 79-290 Fax: +49 731 935 79-291
E-Mail: sales.biopolymers@thermo.com
http://www.thermo.com/biopolymers

23S rRNA			
Amount	2.2 OD	Length 18	ID# OR267458-24
	11.5 nmol	GC content 44,4 %	Scale Scale 0,04
	68.6 µg		
Tm	39.0 °C	A G C T	Purification / Quality Control
Volume for 100 pmol/µl	116.2 µl	5,0 2,0 6,0 5,0	HPLC
Molecular weight	5658,1 g/mol		Date 17.08.2009
5'-AAT CAC TTC ACC TAC GTG-3'			State Dried
5'-6-FAM			



This product certificate was generated electronically and is valid without signature.

Page 8/14

Thermo Fisher Scientific
 Sedansstraße 16 D - 85077 Ulm, Germany
 Tel: +49 731 935 70-290 Fax: +49 731 935 79-291
 E-Mail: sales.biopolymers@thermo.com
 http://www.thermo.com/biopolymers

EK-3 Standart Kültürel Yöntemlerin Sonuçları

Tablo 1. Plak sayım tekniği-ISO 4833:2003'e göre bulunan Toplam Canlı Sayısı

Örnek Kodu	Toplam Canlı Sayısı (log ₁₀ cfu/g)	Örnek Kodu	Toplam Canlı Sayısı (log ₁₀ cfu/g)	Örnek Kodu	Toplam Canlı Sayısı (log ₁₀ cfu/g)
T1	8,0x10 ⁴ (4,90)	H1	2,44x10 ⁴ (4,39)	K1	1,25x10 ⁵ (5,097)
T2	1,3x10 ⁴ (4,10)	H2	4,2x10 ³ (3,62)	K2	3,36x10 ⁴ (4,526)
T3	1,0x10 ³ (3,00)	H3	3,11x10 ⁴ (4,49)	K3	5,0x10 ⁴ (4,699)
T4	7,1x10 ³ (3,85)	H4	1,6x10 ⁴ (4,20)	K4	2,16x10 ⁴ (5,335)
T5	3,1x10 ⁴ (4,49)	H5	1,5x10 ⁴ (4,18)	K5	6,92x10 ⁴ (4,840)
T6	3,3x10 ⁴ (4,52)	H6	6,5x10 ³ (3,81)	K6	1,1x10 ⁵ (5,041)
T7	1,6x10 ⁴ (4,20)	H7	2,8x10 ³ (3,45)	K7	0,4x10 ⁶ (5,602)
T8	1,0x10 ⁴ (4,00)	H8	3,52x10 ³ (3,55)	K8	2,65x10 ⁴ (4,423)
T9	3,3x10 ³ (3,52)	H9	1,3x10 ³ (3,11)	K9	5,6x10 ⁴ (4,748)
T10	7,8x10 ³ (3,89)	H10	4,3x10 ³ (3,63)	K10	1,8x10 ⁵ (5,255)
T11	1,5x10 ⁵ (5,18)	H11	3,3x10 ⁴ (4,51)	K11	2,45x10 ⁴ (4,389)
T12	6,31x10 ⁴ (4,80)	H12	4,4x10 ³ (3,64)	K12	3,0x10 ⁵ (5,477)
Ort.	1,6x10 ⁴ (4,20)	Ort.	7,6x10 ³ (3,88)	Ort.	8,96x10 ⁴ (4,952)

Tablo 2. Plak sayım tekniği- ISO 4832'ye göre bulunan Coliform Sayısı

Örnek Kodu	Coliform Sayısı (log ₁₀ cfu/g)	Örnek Kodu	Coliform Sayısı (log ₁₀ cfu/g)	Örnek Kodu	Coliform Sayısı (log ₁₀ cfu/g)
T1	1,0x10 ¹ (1)	H1	1,5x10 ¹ (1,18)	K1	4,0x10 ² (2,60)
T2	<10 (0)	H2	<10 (0)	K2	3,5x10 ¹ (1,54)
T3	<10 (0)	H3	<10 (0)	K3	2,5x10 ¹ (1,40)
T4	<10 (0)	H4	<10 (0)	K4	5,0x10 ¹ (1,70)
T5	2,0x10 ¹ (1,3)	H5	<10 (0)	K5	1,5x10 ¹ (1,18)
T6	1,0x10 ¹ (1)	H6	<10 (0)	K6	2,0x10 ¹ (1,3)
T7	4,5x10 ¹ (1,65)	H7	<10 (0)	K7	2,5x10 ² (2,40)
T8	2,0x10 ¹ (1,3)	H8	1,0x10 ¹ (1)	K8	7,5x10 ¹ (1,87)
T9	<10 (0)	H9	<10 (0)	K9	6,5x10 ¹ (1,81)
T10	2,5x10 ¹ (1,40)	H10	2,0x10 ¹ (1,3)	K10	8,0x10 ² (2,9)
T11	3,2x10 ² (2,51)	H11	2,5x10 ¹ (1,40)	K11	1,0x10 ¹ (1)
T12	1,0x10 ¹ (1)	H12	3x10 ¹ (1,48)	K12	3,0x10 ¹ (1,48)
Ort.	0,7x10 ¹ (0,85)	Ort.	0,28x10 ¹ (0,45)	Ort.	5,8x10 ¹ (1,765)

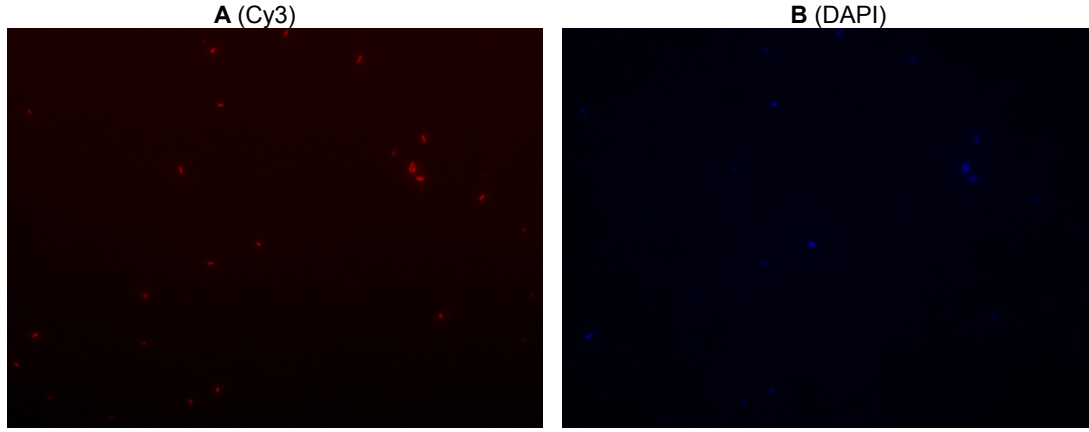
Tablo 3. Plak sayım tekniği- ISO 21528–2'e göre bulunan *Enterobacteriaceae* Sayısı

Örnek Kodu	<i>Enterobacteriaceae</i> Sayısı	Örnek Kodu	<i>Enterobacteriaceae</i> Sayısı	Örnek Kodu	<i>Enterobacteriaceae</i> Sayısı
T1	5,01x10 ² (2,7)	H1	1,0x10 ² (2,0)	K1	1,0x10 ³ (3,0)
T2	7,9x10 ¹ (1,9)	H2	7,9x10 ¹ (1,9)	K2	1,99x10 ² (2,3)
T3	<3 (0)	H3	1,26x10 ² (2,1)	K3	1,99x10 ² (2,3)
T4	1,41x10 ¹ (1,15)	H4	6,3x10 ¹ (1,8)	K4	3,16x10 ³ (3,5)
T5	1,59x10 ² (2,2)	H5	3,16x10 ² (2,5)	K5	3,16x10 ² (2,5)
T6	7,94x10 ¹ (1,9)	H6	5,1x10 ¹ (1,71)	K6	2,5x10 ³ (3,4)
T7	1,59x10 ² (2,2)	H7	<3 (0)	K7	6,3x10 ³ (3,8)
T8	1,0x10 ² (2,0)	H8	<3 (0)	K8	1,0x10 ² (2,0)
T9	<3 (0)	H9	1,0x10 ² (2,0)	K9	6,3x10 ¹ (1,8)
T10	3,9x10 ¹ (1,59)	H10	<3 (0)	K10	7,9x10 ³ (3,9)
T11	3,16x10 ³ (3,5)	H11	5,6x10 ² (2,75)	K11	1,26x10 ² (2,1)
T12	3,16x10 ² (2,5)	H12	3,5x10 ¹ (1,55)	K12	4,5x10 ³ (3,65)
Ort.	6,36x10 ¹ (1,803)	Ort.	3,36x10 ¹ (1,526)	Ort.	7,15x10 ² (2,854)

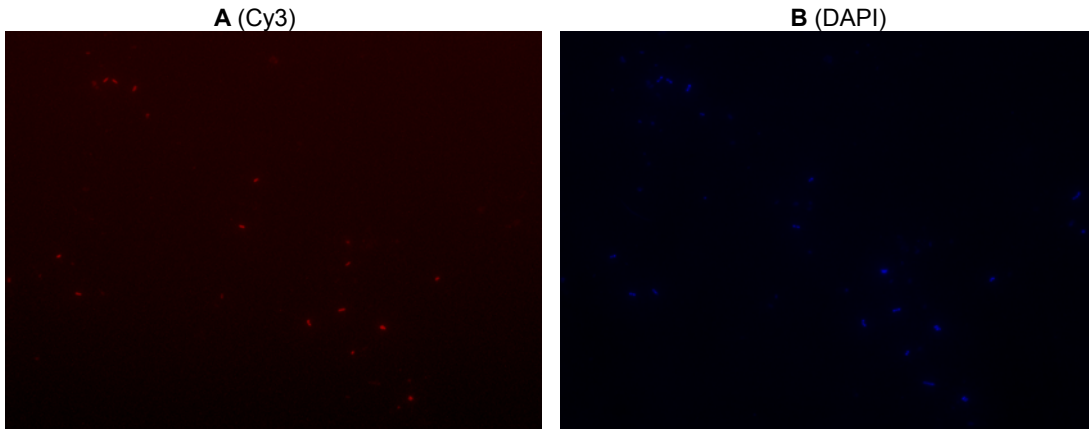
Tablo 4. MPN Yöntemi-ISO 7251 ile bulunan *E. coli* sonuçları

Örnek Kodu	<i>E.coli</i> Sayısı	Örnek Kodu	<i>E.coli</i> Sayısı	Örnek Kodu	<i>E.coli</i> Sayısı
T1	<3 (negatif)	H1	<3 (negatif)	K1	3
T2	<3 (negatif)	H2	<3 (negatif)	K2	<3 (negatif)
T3	<3 (negatif)	H3	<3 (negatif)	K3	<3 (negatif)
T4	<3 (negatif)	H4	<3 (negatif)	K4	<3 (negatif)
T5	<3 (negatif)	H5	<3 (negatif)	K5	<3 (negatif)
T6	<3 (negatif)	H6	<3 (negatif)	K6	<3 (negatif)
T7	<3 (negatif)	H7	<3 (negatif)	K7	3
T8	<3 (negatif)	H8	<3 (negatif)	K8	<3 (negatif)
T9	<3 (negatif)	H9	<3 (negatif)	K9	<3 (negatif)
T10	<3 (negatif)	H10	<3 (negatif)	K10	3
T11	3	H11	<3 (negatif)	K11	<3 (negatif)
T12	<3 (negatif)	H12	<3 (negatif)	K12	3
Ort.	<3 (negatif)	Ort.	<3 (negatif)	Ort.	<3 (negatif)

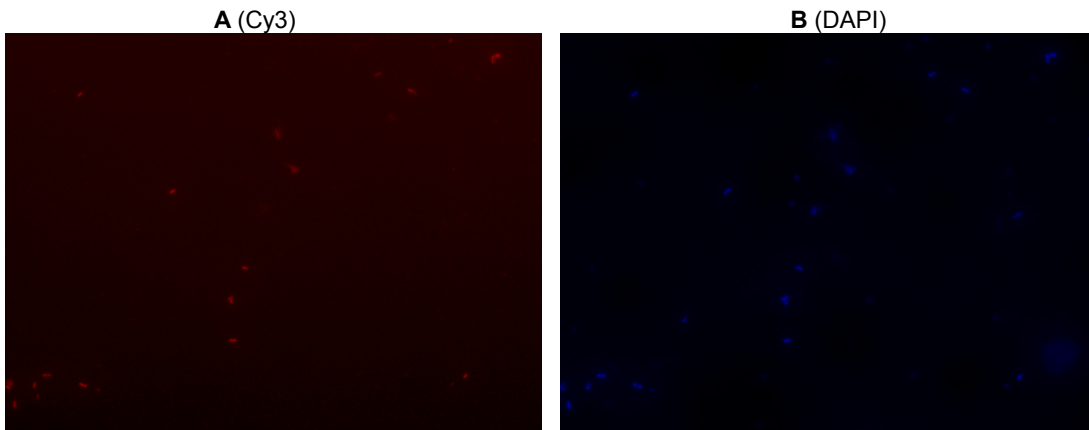
EK-4 FISH Yöntemi ile Elde Edilen Bazı Görüntüler



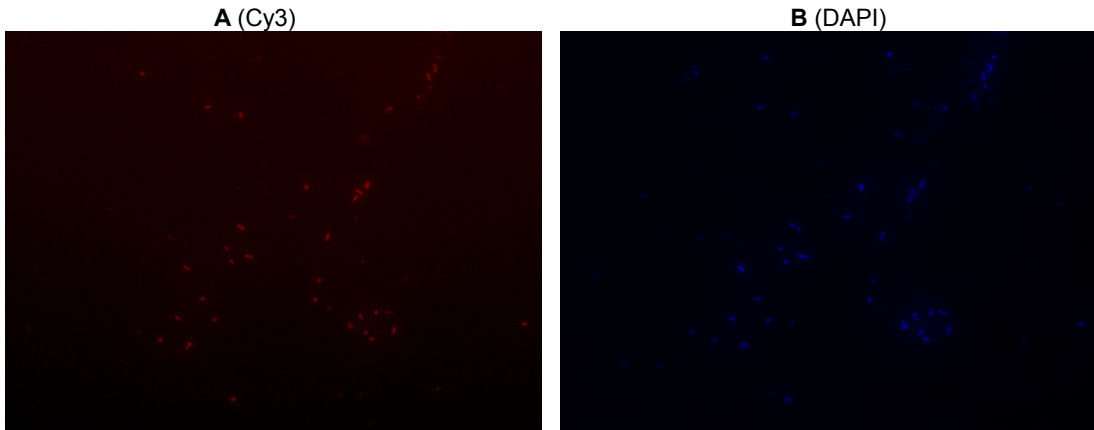
Şekil 2.1. *L. innocua* – ETOH – 10^4



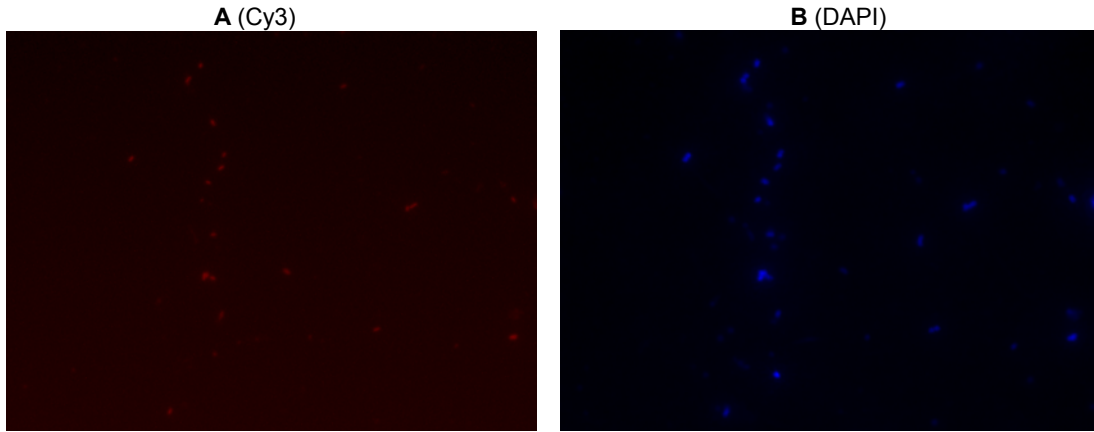
Şekil 2.2. *L. monocytogenes* – ETOH – 10^4



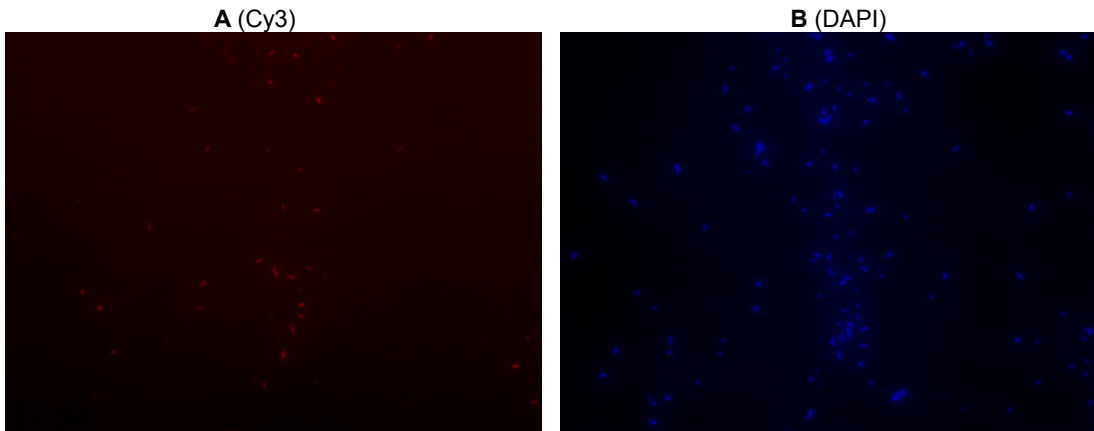
Şekil 2.3. *L. monocytogenes* – ETOH – 10^4



Şekil 2.4. *L. innocua* – ETOH – 10^8



Şekil 2.5. *L. monocytogenes* – PFA – 10^8



Şekil 2.6. *L. monocytogenes* – PFA – 10^8

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 107 O 690																				
Proje Başlığı: Floresanlı Yerde Hibritleme (FISH) Yöntemi ile Bazı İndikatör ve Patojen Bakterilerin Çiğ Kanatlı Etlerinde ve Kıymada Saptanması																				
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Dr. Ayşe Handan Baysal (Yürütücü) Araştırmacı yoktur.																				
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü. İYTE, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gülbahçe köyü, 35437, Urla, İzmir																				
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Destekleyen kuruluş yoktur.																				
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.03.2008–01.03.2010																				
Öz (en çok 70 kelime) Projede indikatör/patojen mikroorganizmaların tavuk/hindi göğüs eti ve kıyma örneklerinde FISH tekniği ile saptanabildiği, yöntemin yüksek oranda spesifik ve hassas olduğu ve Standart kültürel yöntemle kıyasla FISH yöntemi ile daha yüksek sayıda pozitif sonuç elde edildiği belirlenmiştir. FISH ile <i>Salmonella</i> ve <i>Listeria</i> türlerinin saptanmasında en az 16 saat ön zenginleştirme gerektiği gözlenmiştir. FISH yöntemi ile sonuç elde etmek için gereken toplam analiz süresi 1 günden daha az (~ 20 saat) sürmektedir.																				
Anahtar Kelimeler: Floresanlı yerinde hibritleme (FISH), kültürel yöntem, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , tavuk eti, hindi eti, kıyma																				
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.																				
Projeden Yapılan Yayınlar: Uluslararası Dergilerde Yapılan Yayınlar: <table border="1"><thead><tr><th>No</th><th>İndeks</th><th>Yayın Bilgileri</th></tr></thead><tbody><tr><td>Y1</td><td>SCI</td><td>Baysal, A.H., Detection of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> spp. in ground beef by cultural and FISH technique sold in retail market of Turkey. değerlendirme aşamasında (2010).</td></tr><tr><td>Y2</td><td>SCI</td><td>Baysal, A.H., Prevalence of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> spp. in retail turkey and chicken breast fillets—a comparison of standard cultural method and FISH technique for detection. değerlendirme aşamasında (2010).</td></tr></tbody></table> Sunulan Bildiriler: ulusal (U) ve uluslararası (UA) <table border="1"><thead><tr><th>No</th><th>Sunum Tipi</th><th>Yayın Bilgileri</th></tr></thead><tbody><tr><td>S1</td><td>U</td><td>(Poster Sunumu) Baysal, A.H. Floresanlı yerinde hibritleme (FISH) yöntemi ile İzmir'de <i>Escherichia coli</i> ve <i>Salmonella</i> varlığının kıymada saptanması. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya, 6-9 Kasım (2009) (Tam metin basıldı)</td></tr><tr><td>S2</td><td>U</td><td>(Poster Sunumu) Baysal, A.H. Floresanlı yerinde hibritleme (FISH) yöntemi ile gıdalarda mikroorganizmaların saptanması. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya,</td></tr></tbody></table>			No	İndeks	Yayın Bilgileri	Y1	SCI	Baysal, A.H., Detection of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> spp. in ground beef by cultural and FISH technique sold in retail market of Turkey. değerlendirme aşamasında (2010).	Y2	SCI	Baysal, A.H., Prevalence of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> spp. in retail turkey and chicken breast fillets—a comparison of standard cultural method and FISH technique for detection. değerlendirme aşamasında (2010).	No	Sunum Tipi	Yayın Bilgileri	S1	U	(Poster Sunumu) Baysal, A.H. Floresanlı yerinde hibritleme (FISH) yöntemi ile İzmir'de <i>Escherichia coli</i> ve <i>Salmonella</i> varlığının kıymada saptanması. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya, 6-9 Kasım (2009) (Tam metin basıldı)	S2	U	(Poster Sunumu) Baysal, A.H. Floresanlı yerinde hibritleme (FISH) yöntemi ile gıdalarda mikroorganizmaların saptanması. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya,
No	İndeks	Yayın Bilgileri																		
Y1	SCI	Baysal, A.H., Detection of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> spp. in ground beef by cultural and FISH technique sold in retail market of Turkey. değerlendirme aşamasında (2010).																		
Y2	SCI	Baysal, A.H., Prevalence of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> spp. in retail turkey and chicken breast fillets—a comparison of standard cultural method and FISH technique for detection. değerlendirme aşamasında (2010).																		
No	Sunum Tipi	Yayın Bilgileri																		
S1	U	(Poster Sunumu) Baysal, A.H. Floresanlı yerinde hibritleme (FISH) yöntemi ile İzmir'de <i>Escherichia coli</i> ve <i>Salmonella</i> varlığının kıymada saptanması. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya, 6-9 Kasım (2009) (Tam metin basıldı)																		
S2	U	(Poster Sunumu) Baysal, A.H. Floresanlı yerinde hibritleme (FISH) yöntemi ile gıdalarda mikroorganizmaların saptanması. 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, Antalya,																		