

GIDA KAYNAKLI PATOJEN BAKTERİLERİN HIZLI TANI YÖNTEMLERİ

Yunus KILIÇOĞLU
Veteriner Hekim

NELER VAR ?

HIZLI YÖNTEMLER...

- ✓ Neden ihtiyaç duyulmuş...
- ✓ Tarihsel gelişimi...
- ✓ Şimdiki durum...
- ✓ **BİYOKİMYASAL:**
- ✓ Kromojenik-Florojenik Besiyerleri...
- ✓ Bunların Minyatürizasyonu...
- ✓ Minyatürize edilenlerin otomasyonu...
- ✓ **İMMUNOLOJİK:**
- ✓ Lateks aglütinasyon...

NELER VAR ?

- ✓ Lateks Migrasyon...
- ✓ Elisa-Elfa ve otomasyonları...
- ✓ İmmuno Manyetik Ayırma...
- ✓ **NÜKLEİK ASİT TABANLI:**
- ✓ DNA hibridizasyon...
- ✓ PCR ve modifikasyonları...
- ✓ Gen-Çip teknolojisi...
- ✓ **ELEKTRİKSEL ÖLÇÜM:**
- ✓ Biyosensörler...
- ✓ **ATP ÖLÇÜMLERİ:**
- ✓ ATP biyoluminesans...
- ✓ Adenilat kinaz...

Hızlı Yöntemler Gerçekten Gerekli mi?

Klinik mikrobiyoloji:

- ✓ Hızlı identifikasyon,
- ✓ Erken teşhis, başarılı tedavi,
- ✓ Hastanelerde fazla sayıda örnek,

Gıda mikrobiyolojisi:

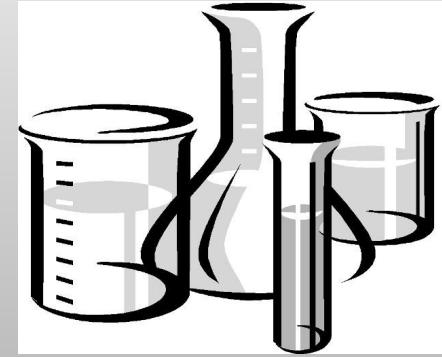
- ✓ Laboratuvarlara yoğun numune akışı,
- ✓ Gıda endüstrisi, üretim hatları talepleri,
- ✓ HACCP uygulamaları, Hijyen kontrolleri,
- ✓ Son ürün, çiğ materyal, anında sonuç alınması gerekliliği.



Hızlı Yöntemler Gerçekten Gerekli mi?

Geleneksel yöntemler:

- ✓ Çok güvenilir,
- ✓ İzolasyon ve identifikasyon,
- ✓ Klasik yöntemler gold standart,
- ✓ FAKAT!
- ✓ Çok uzun sürmesi,
- ✓ Yoğun iş gücü,
- ✓ Manüplasyon hataları,
- ✓ Fazla sayıda personel,
- ✓ Fazla miktarda sarf malzemesi, yüksek maliyet.



Hızlı Yöntemler Gerçekten Gerekli mi?

Klasik bir yöntemin:

- ✓ Spesifite ve sentitivite,
- ✓ Tekrarlanabilirlik,
- ✓ Daha az zaman
- ✓ Daha az işgücü
- ✓ Daha az sarf malzemesi
- ✓ Daha az maliyet
- ✓ Daha az manüplasyon
- ✓ Daha az hata



Hızlı Yöntemlerin Tarihsel Gelişimi

1960'larda biyokimyasal yöntemlerin minyatürizasyonu:

- ✓ Önce *Enterobacteriaceae*,
- ✓ Ardından diğer patojenler ve antibiyogramlar,



Hartman, 1968:
Artık birçok mikrobiyolog test volümlerini düşürmek için küçük kuyucuklar ve tüpçükler...



Hızlı Yöntemlerin Tarihsel Gelişimi

1970'lerde immunolojik yöntemler:

- ✓ Antijen-antikor uzun yıllardan beri kullanılıyor,
- ✓ Spesifite ve sensitivitesinin yükseltilmesi,
- ✓ Kullanım sahası genişliyor,
- ✓ 1975-1985 arası kit gelişiminin altın çağı,

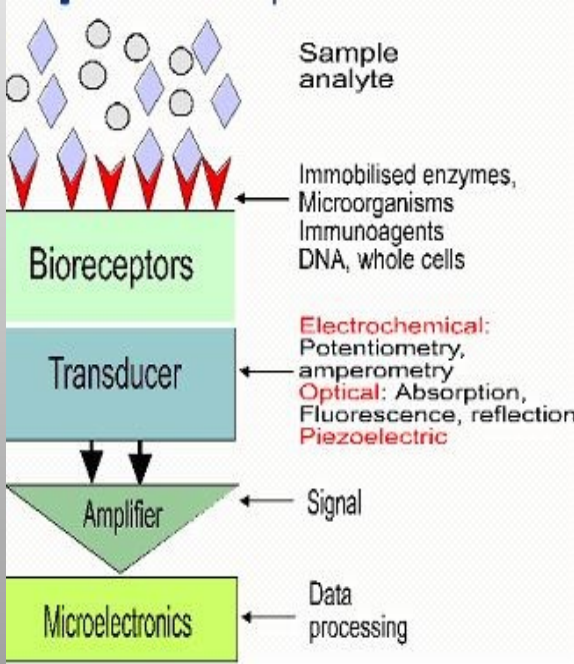


1980'ler Moleküler çalışmaların hızlanması:

- ✓ 1983 ilk hibridizasyon,
- ✓ 1989 Taq polimeraz ilk kullanımı,
- ✓ 1993 Karry Mullis nobel ödülü,
- ✓ 1985-1995 PCR altın çağı
- ✓ 1995 gen-çip (microarray) teknolojisinin ilk uygulamaları



Hızlı Yöntemlerin Tarihsel Gelişimi



1990'lardan itibaren Biyosensörler:

- ✓ 1953 ilk biyosensör (Clarck, kan oksijenini elektrotla...)
- ✓ 1974'te seri üretim,
- ✓ 1990'lardan itibaren mikrobiyolojide, gıda sektöründe,

ATP Biyoluminesans:

- ✓ İlk yayınlar 1980'lerde,
- ✓ 1990'ların başından itibaren gıda sektöründe hijyen kontrollerinde yaygın kullanılmaya başlanması



Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Kromojenik Besiyerleri:

- ✓ Prensip: Gelişmesi istenen bakterilerin enzimatik faaliyetleri sonunda belirli bir/birkaç substrattan renkli maddelerin oluşarak kolonilerin bu renkte görünmesi.
- ✓ Genelde selektivitesi artırılır, gelişmesi istenen bakteriler için teşvik edici maddeler,
- ✓ 6-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (Salmon beta D-GAL)
- ✓ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X- β -D-glucuronide)
- ✓ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside (X-GLU)
- ✓ 5-bromo-6-chloro-3-indolyl caprylate (Magenta-caprylate)
- ✓ L- α -phosphatidylinositol

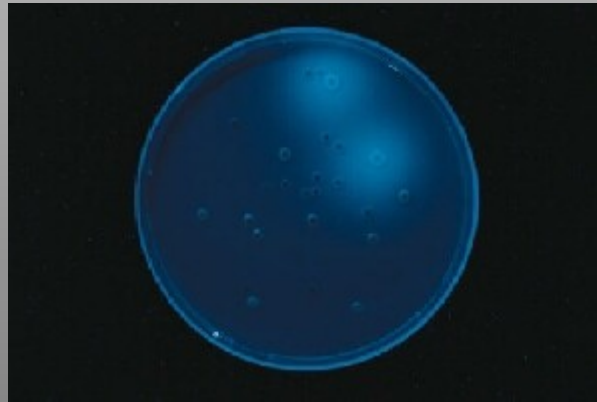
Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Florojenik Besiyerleri:

- ✓ Prensip: Gelişmesi istenen bakterilerin enzimatik faaliyetleri sonunda belirli bir/birkaç substrattan kolonilerde floresan ışımaya oluşması.
- ✓ Florojenik substrat: methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (**MUG**)



Florojenik LST broth



Florojenik *E. coli* O157:H7 agar



Readycult Coliforms

ALOA Chromogenic Agar (Microgen)

Lityum klorid ve antimikrobiyal karışım ile selektivite, kromojenik substratlar ile beta-glukosidaz ve fosfolipaz C aktivitesini belirleme,

Ön zenginleştirme: (1:10 dilüsyon, ör: 25 gr örnek 225 ml 1/2 Fraser broth) 30°C'de 24 saat inkübasyon



Zenginleştirme: ön zenginleştirme besiyerinden 0.1 ml alınıp 10 ml 1/2 Fraser broth'a inoküle edilir, 35°C / 37°C'de 24 saat inkübasyon



Zenginleştirme besiyerinden **ALOA Chromogenic Agara**'a, 24 saat 37°C'de inkübasyon,



Çevresinde opak halka oluşan bütün mavi-yeşil renkli koloniler *L. monocytogenes* şüpheli koloni,

Şüpheli koloniler *L. ivanovii* ve diğer bakteriler yönünden mutlaka doğrulanmalıdır.

(Üretici firma konfirmasyon: *Listeria* spp. için **Microgen Listeria Latex₊** veya *L. monocytogenes* **Sinlepath L'mono** ile 30 dk. içinde)

ALOA Chromogenic Agar (Microgen)

- ✓ Willis C. ve ark. (2006) bu yöntemin spesifitesini %91.3, sensitivitesini %86.7 olarak bildirmiştir.

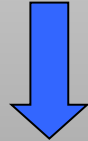


Readycult Coliforms (Merck)

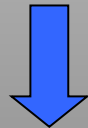
Su analizinde, Koliform ve *E. coli* var / yok



Hijyen kurallarına uyularak paket analiz edilecek suya ilave edilir, karıştırılır, 35-37 °C'da 18-24 saat inkübasyon



Süre sonunda besiyeri: mavi-yeşil: koliform (+)



UV lamba floresan testi



Floresan ışımaya *E. coli* (+)



Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

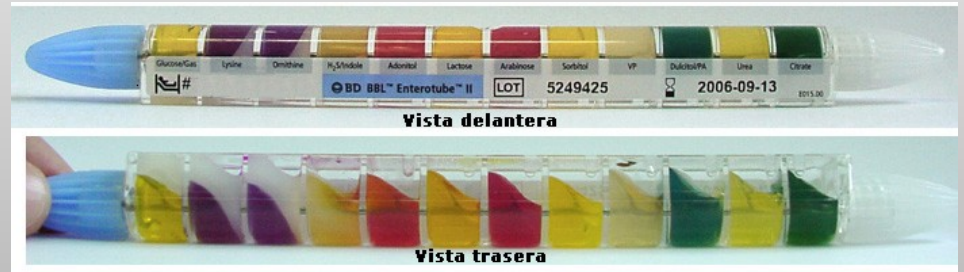
API:

- ✓ 20E, Rapid20E, 20NE, 20NH, Staph, RAPIDEC, 20Strep, Coryne, Campy, *Listeria*, 20A, RapidID32A, 20CAUX, 50CH
- ✓ 20 minyatür biyokimyasal test,
- ✓ 2 saatten 72 saate kadar inkübasyon süresi,
- ✓ Sonuçlar Database ile kodlanıp okunuyor.
- ✓ 600'ü aşkın tür identifiye edilebiliyor.



Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

- ✓ ENTEROTUBE (BD-BBL):



- ✓ RapID (REMEL):



- ✓ CRYSTAL ID (BD-BBL):



Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Ön zenginleştirme: Analiz edilecek örneklerden 25 gram 225 ml LEB (*Listeria* selective Enrichment Broth Base, Oxoid) 24 saat 30°C'de inkübasyon,



Asıl zenginleştirme: Ön zenginleştirme besiyerinden 0.1 ml Fraser Broth'a 24 saat 35°C'de inkübasyon,



Katı besiyerine ekim: Asıl zenginleştirme besiyerinden Oxford *Listeria* Selective Agar Base, Palcam Agar'a 35°C'de 24-48 saat inkübasyon,

Oxford'da üreyen kahverengimsi-yeşil ve siyah, etrafı haleli koloniler ile Palcam'da üreyen yeşil-gri koloniler *Listeria* spp.



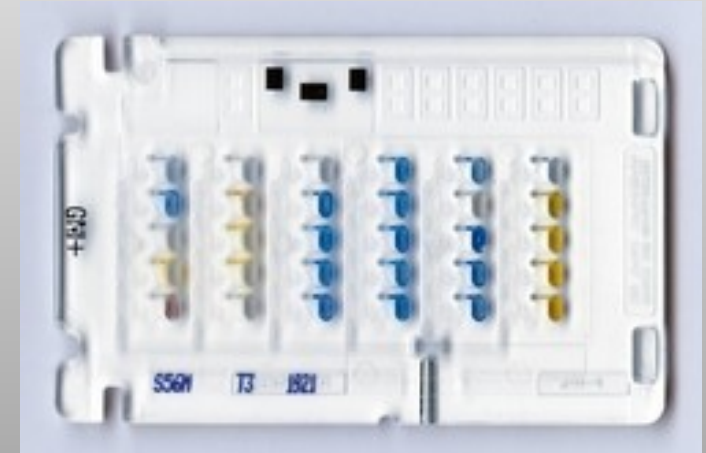
Listeria rapid test: Şüpheli koloniler *Listeria* flagellar antijen arama; *Listeria* rapid test (Oxoid) pozitif suşlar *Listeria* spp.

İdentifikasyon için: API *Listeria* (BioMerieux) kitine, 8 saat 35°C'de

Otomatize-Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

VITEK :

- ✓ Vitek 2, Vitek 2 Compact ve Vitek 2 XL
- ✓ Gram pozitif (GP), Gram negatif (GN), Bacillus (BCL) ve Maya (Yst) kolorimetrik test kartları
- ✓ Şüpheli koloni 3 ml steril plastik tüplerde izotonik NaCl içinde süspansiyon,
- ✓ Süspansiyonun test kartlarına aktarılması, inkübasyon, 15 dk.da bir renk değişimi okuma, Database ile analitik karşılaştırma, antibiyogram, sonucun yazıcıdan çıktı olarak verilmesi **OTOMATİK**.



Otomatize-Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

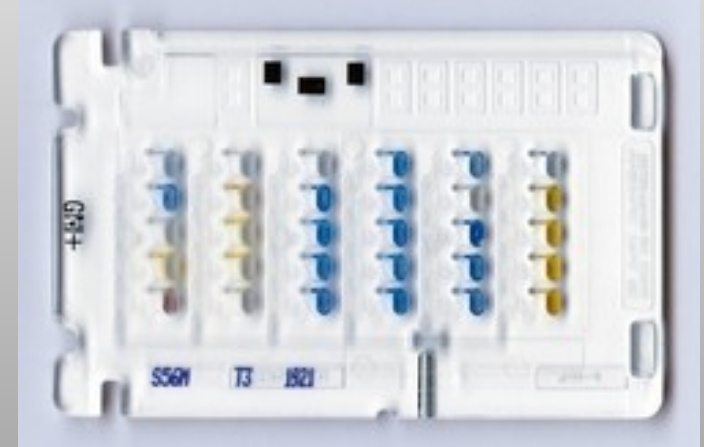
VITEK :

- ✓ 1- Şüpheli koloniden Gram boyama
- ↓
- ✓ 2- Sonuca göre test kartı seçme
- ↓
- ✓ 3- İzotonik NaCl içinde gerekli McFarland değerinin ayarlanması
- ↓
- ✓ 4- Cihaza yerleştirme ve 8 ila 24 saat arasında sonucun alınması



Otomatize-Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

- ✓ Crowley ve ark. (2012)
- ✓ Gram negatif basilleri (*Brucella*, *Francisella*, *Burkholderia*, *Yersinia*)
- ✓ Vitek 2 GN test kartı,
- ✓ 720 izolatin 707 tanesini doğru (%98)
- ✓ 13 izolati tanımlayamadığı (%2)
- ✓ Yanlış identifikasyon olmadığını,



Otomatize-Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

BD PHONEIX :

- ✓ Minyatür biyokimyasal testleri otomatik olarak yapıp şüpheli koloniyi identifiye etme,
- ✓ Kısa sürede (ort. 4 saat) antibiyogram yapabilme,
- ✓ McFarland ayarını otomatik olarak yapabilme,
- ✓ Önceden Gram boyama gerekmez,
- ✓ Aynı anda 100 adet örnek çalışabilme,
- ✓ Panellere şüpheli koloni süspansiyonu eklendikten sonra diğer tüm işlemler **OTOMATİK.**



Otomatize-Minyatürize Biyokimyasal Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

BD PHONEIX :

- ✓ Karoll ve ark. (2006),
- ✓ 38 ayrı türden toplam 251 adet izolat,
- ✓ İdentifikasyonlarını ve antibiyogramları, klasik biyokimyasal metotlar ve “referans mikrodilüsyon antibiyogram yöntemi” ile karşılaştırma,
- ✓ 237 doğru, 14 yanlış identifikasyon (%94)
- ✓ Antibiyotik duyarlılık test sonuçları %97.9 uyumlu



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Lateks Aglütinasyon Testleri:

- ✓ Uygulanması kolay ve hızlı
- ✓ Bir slayt üzerinde şüpheli bakteri kolonisi su ile emülsifiye edilir,
- ✓ Plazma sıvısı eklenir ve saniyeler içinde kümeleşme,
- ✓ Yüksek spesifite,



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

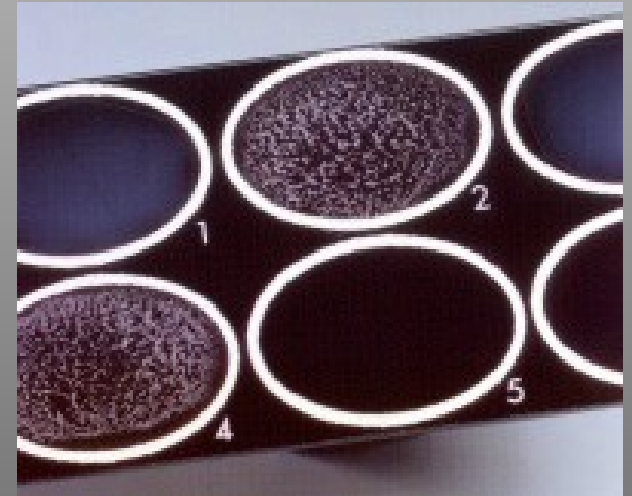
Slidex Staph Kit (BioMerieux)

- ✓ Koagülazın belirlenmesi için fibrinojenle duyarlılaştırılmış hemoglobin,
- ✓ protein A'nın belirlenmesi için spesifik monoklonal antikorlarla kaplanmış lateks partikülleri,



Staphyloslide Kit (BD)

- ✓ Bakteri hücre duvarındaki kümeleşme faktörü polipeptidi belirlemek için, insan fibrinojeni ve IgG ile kaplanmış mavi lateks partikülleri



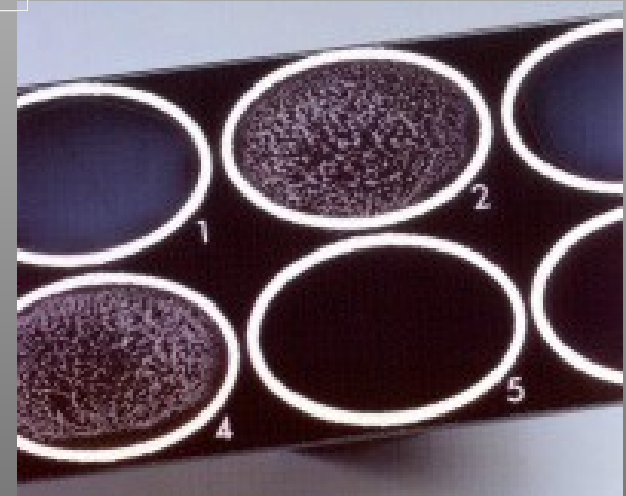
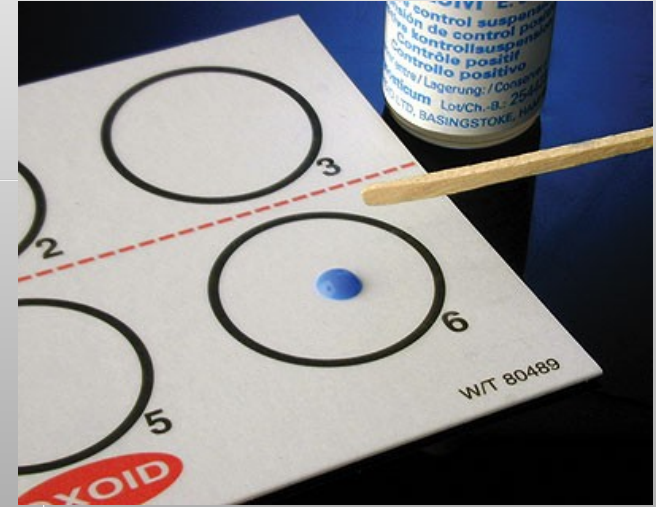
İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Salmonella Latex Kit (Oxoid)

- ✓ Flagellar H antijenine karşı üretilen poliklonal antikorlarla kaplanmış lateks partikülleri

Dryspot *E.coli* O157 test kiti (Oxoid)

- ✓ Test kitinden en iyi sonucu alabilmek için, önce sorbitol McConkey agar,
- ✓ *E. coli* O157:H7 suşlarının tamamına yakını sorbitol fermentasyonu (-) koloniler renksiz,
- ✓ O 157 olmayan *Escherichia* suşlarının da tamamına yakını sorbitol fermentasyonu (+) koloniler pembe
- ✓ Sorbitol fermentasyon (-) koloniler, direk %0.9 NaCl ile süspansiyon edilip kit içindeki kart bölümüne
- ✓ Birkaç saniye içinde sonuç



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Lateks Aglütinasyon Testleri:

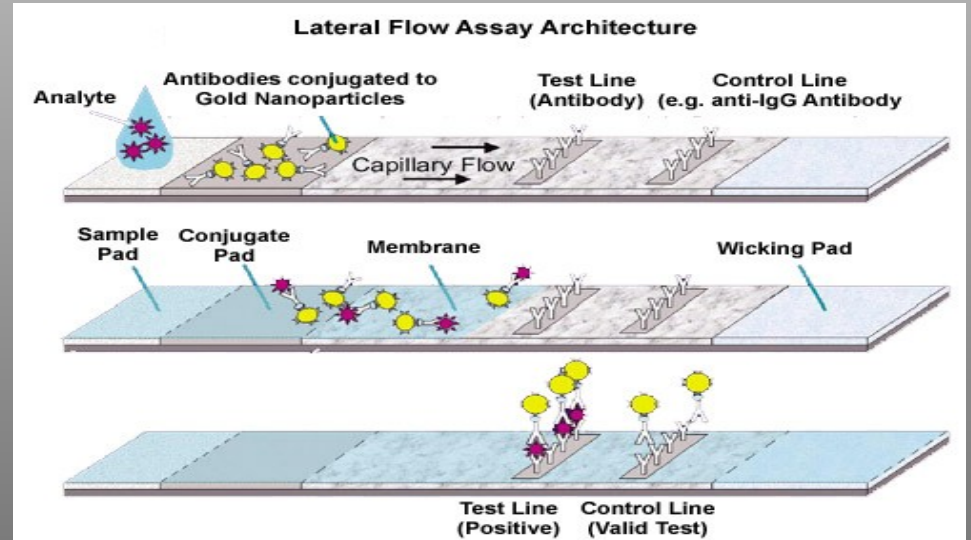
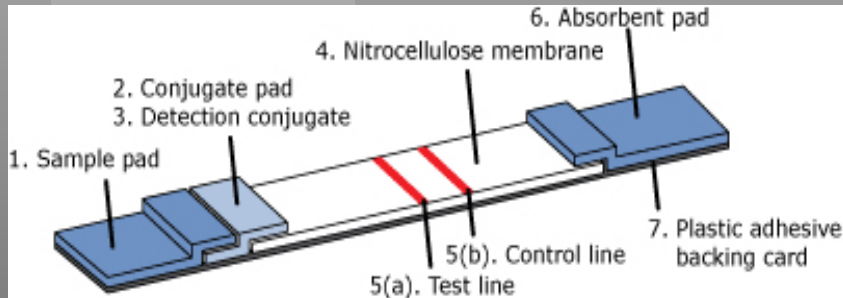
Weist ve ark. (2006)

- ✓ 150 *S. aureus* suşu ile deneme çalışması,
- ✓ Dry-Spot Staphylect Plus, Pastorex Staph-Plus, Slidex Staph-Kit, Slidex Staph Plus, Staphaurex Plus, Staphylase Test kitlerini
- ✓ Sensivitelemi *S.aureus* için sırasıyla: %98.3, %97.8, %98.4, %95.6, %95.6, ve %88.9
- ✓ Staphylococcus spp. için testlerin spesifitelemi: %91.3, %98, %91.3, %99.1, %98 ve %98.7

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Lateral Flow Testler:

- ✓ Analiz edilecek antijene spesifik, gözenekli genelde nitroselüloz bir membran içinde hareket edebilen antikör,
- ✓ Konjugat pedi; analiz edilecek analite spesifik antijen veya etkene spesifik antikörlerin tutturulduğu partikülleri (renkli lateks partikülleri veya altın) içeren kurutulmuş bir konjugat,



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Lateral Flow Testler:

- ✓ Numuneden bir miktar örnek penceresinden örnek pedine aktarılır,
- ✓ Kapillar difüzyon hareketi ile konjugat pedine ulaşır ve konjugat ıslanır,
- ✓ Bir immunkompleks formasyonu,
- ✓ Bu kompleks membran içinde yakalayıcı proteinlerin bulunduğu alana doğru göç
- ✓ Burada yakalayıcı proteinler tarafından tutularak sabitlenir,
- ✓ Toplam 5-15 dakika içinde test penceresinde, sonucun pozitif olduğunu gösteren bir çizgi veya bant,
- ✓ Konjugatın arta kalan kısmı, membranın devamındaki diğer bir noktaya doğru hareket,
- ✓ Bu noktada testin tamamlandığını ve düzgün çalıştığını gösteren kontrol çizgisi

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Singlepath *E. coli* O157 (Oxoid) Rapid Test :

- ✓ Zenginleştirme: 25 gr. et-et ürünleri örneği, 225 ml. mEC+Novobiocin selektif zenginleştirme broth içinde 35-37°C'de 18-24 saat



- ✓ 1-2 ml. zenginleştirme sıvısı 15 dk. kaynayan su banyosunda



- ✓ Oda ısısına getirilir, 150 µl. kitinin örnek penceresine damlatılır



- ✓ Oda ısısında 20 dk. inkübasyon



- ✓ Sonuç penceresindeki çift çizgi pozitif, tek çizgi negatif sonuç



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Lateral Flow Testler :

- ✓ Zhao ve ark. (2010),
- ✓ Test aygıtı için nanogold partikülleri, *E.coli* O157'ye spesifik biotin-streptavidin ile işaretlenmiş poliklonal antikolar
- ✓ 36 adet *E.coli* O157 , 29 adet O157 olmayan *E.coli* suşu ile deneysel kontamine edilen toplam 933 adet gıda örneği
- ✓ Klasik kültür-identifikasyon ile lateral flow testini karşılaştırmışlar,
- ✓ Zenginleştirme sonrası 2.3 kob/gr, zenginleştirme yapılmaksızın 2.3×10^3 kob/gr bakteriyi tanımlayabilme,
- ✓ *E. coli* O157 için spesifitesini %96, sensitivitesini %100 olarak bildirmişlerdir.



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Enzimle İşaretlenmiş İmmunosorbent Testler (ELISA) :

- ✓ İlk defa 1966 yılında Avrameas ve Uriel enzim işaretli konjugatları doku antijenleri için,
 - ✓ Engvall ve Perlman 1971 yılında farklı enzimler kullanarak ELISA'yı serolojik yöntem olarak ilk defa,
- Solid bir faza antijen veya antikorun adsorpsiyonu.
 - Örnek ve gerekli reagentlerin ilavesi.
 - İnkübasyon ve yıkama.
 - İşaretli antikor veya antijenin ilavesi.
 - Spesifik substratın ilavesi.
 - Reaksiyonun durdurulması ve sonuçların değerlendirilmesi

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Gıda Kaynaklı Patojenler Ticari ELISA Kitleri :

<u>BAKTERİ veya TOKSİN TÜRÜ</u>	<u>TİCARİ İSMİ</u>	<u>ÜRETİCİ</u>
<u>Bacillus cereus diarrhoeal enterotoxin</u>	<i>Bacillus</i> diarrhoeal enterotoxin	TECRA
•		
<u>Campylobacter</u>	EiaFoss <i>Campylobacter</i> VIA	Foss Electric TECRA
<u>Clostridium botulinum neurotoxin</u>	BoNT	R-diagnostics
<u>Escherichia coli O157</u>	EHEC-TeK Assurance <i>E. coli</i> O157 VIA Premier O157	bioMe´rieux BioControl TECRA Meridian
<u>Listeria</u>	<i>Listeria</i> -TeK <i>Listeria</i> VIA	bioMe´rieux TECRA
<u>Salmonella</u>	<i>Salmonella</i> -TeK <i>Salmonella</i> VIA	bioMe´rieux TECRA

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Tam Otomatize ELISA Cihazları



Brio



Gemini

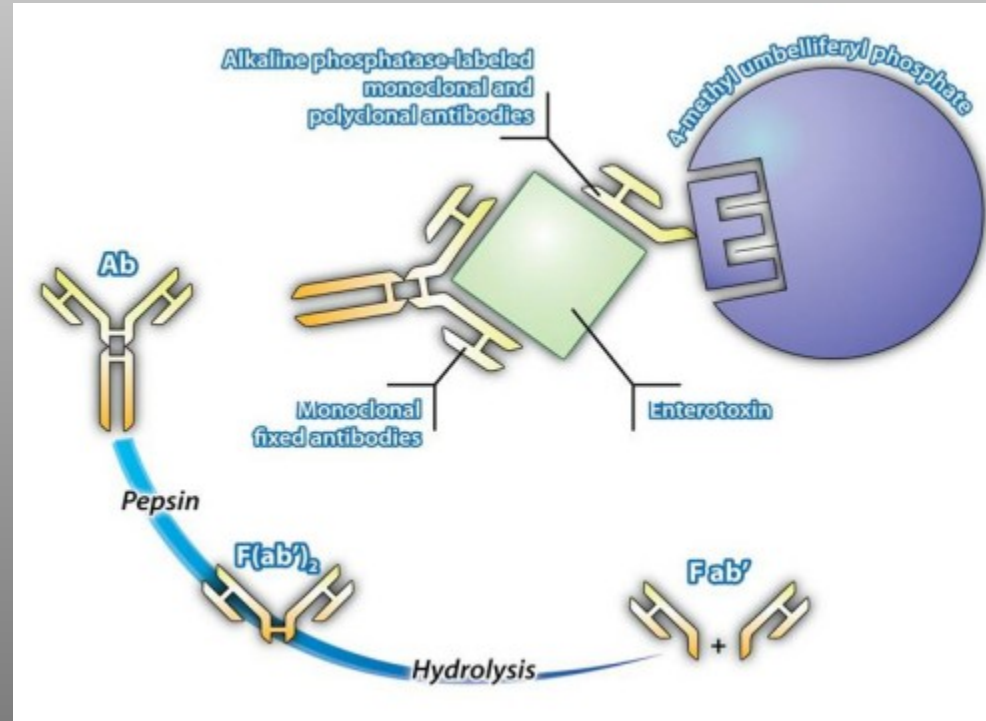


DynexDSX

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Enzimle İşaretli Floresan Testleri (ELFA) :

- ✓ Antijenin tanımlanmasında kromojenik substrat yerine florojenik substratın kullanıldığı yöntem,
- ✓ Hedef antijene spesifik bir yakalayıcı antikor bulunmakta,
- ✓ İkinci konjuge bir antikora ilaveten floresan reaksiyonu oluşturan substrat



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Enzimle İşaretli Floresan Testleri (ELFA)

VIDAS: Vitek Immuno Diagnostik Assay System (bioMerieux)

- ✓ Otomatize ELFA,
- ✓ Bir zenginleştirme işlemini takiben 45 dakika ile iki saat içerisinde sonuç
- ✓ Sistem tipik olarak iki parça,
- ✓ 1-Tek kullanımlık pipet ucu benzeri, iç yüzeyi hedef antijene spesifik antikorla kaplanmış **SPR** (solid phase receptacle)
- ✓ 2-Test için gerekli yıkama solüsyonları, alkalın fosfatazla işaretlenmiş antikorları içeren konjugat, substratı (4-methyl-umbelliferyl phosphate) barındıran, üzeri mühürlenerek kapatılmış bir strip,
- ✓ Tüm dünyada 18000'in üzerinde ayrı noktada kullanıcı.

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Enzimle İşaretli Floresan Testleri (ELFA)

VIDAS: Vitek Immuno Diagnostik Assay System (bioMerieux)

- ✓ Zenginleştirme solusyonu içinde kültür örneği hazırlanır,
- ✓ Test striptinin ilk kuyucuğuna (örnek kuyucuğu) aktarılır, cihaza yerleştirilir,
- ✓ Cihaz otomatik olarak örneği SPR'ye alır, belli bir süre bekletir (antijen-antikor reaksiyonu),
- ✓ Diğer kuyucuklara aktarma, aralarda yıkama işlemi OTOMATİK,
- ✓ Test sonunda optik okuyucu son kuyucukta oluşan floresanı okur, sonucu verir.



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

VIDAS: Vitek Immuno Diagnostik Assay System (bioMerieux)

Liu ve ark. (2009) *Campylobacter* spp. identifikasyonu için standart metotla karşılaştırmalı olarak uyguladıkları ve sonuçlarda önemli bir farklılık oluşmayan yöntem:



Zenginleştirme: 25 gr kanatlı eti örneği 100 ml. Bolton broth+selective supplement içinde 42°C'de 48 saat %10 karbondioksitli etüvde inkübe,



VIDAS: Zenginleştirme solusyonu 0.65 µm. selüloz membran filtreden geçirilip miniVIDAS stripine aktarılır, strip cihaza yerleştirilir,

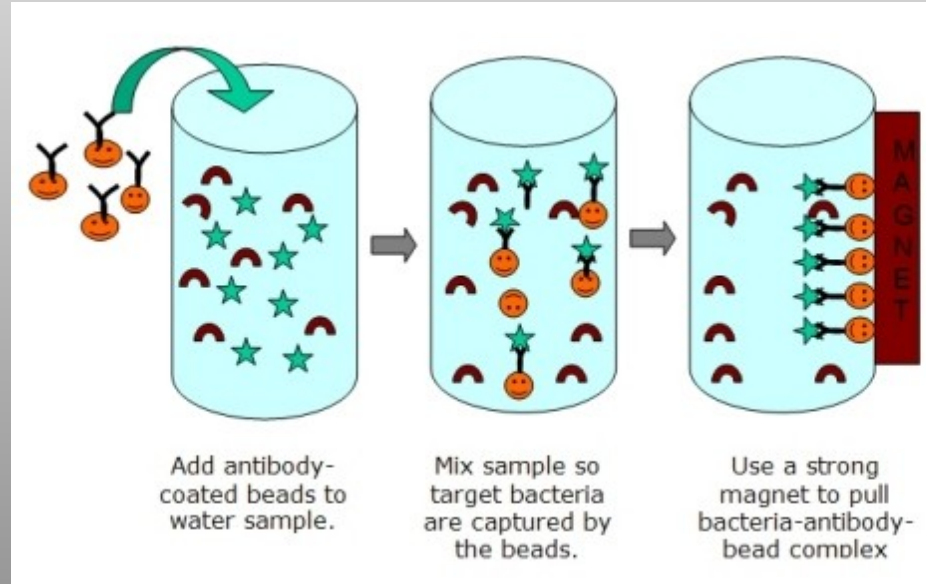


Yaklaşık 4 saat sonra sonuç cihazdan okunur.

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

İmmuno Manyetik Ayırma :

- ✓ Hedef maddelerin (bakteri, hücre, protein, nükleik asit vb.), yüzeyi antikor ile kaplı manyetik partiküllere bağlanmasına ve alan içerisinde manyetik güç uygulamasıyla karışımdan ayrılmasına dayanan...

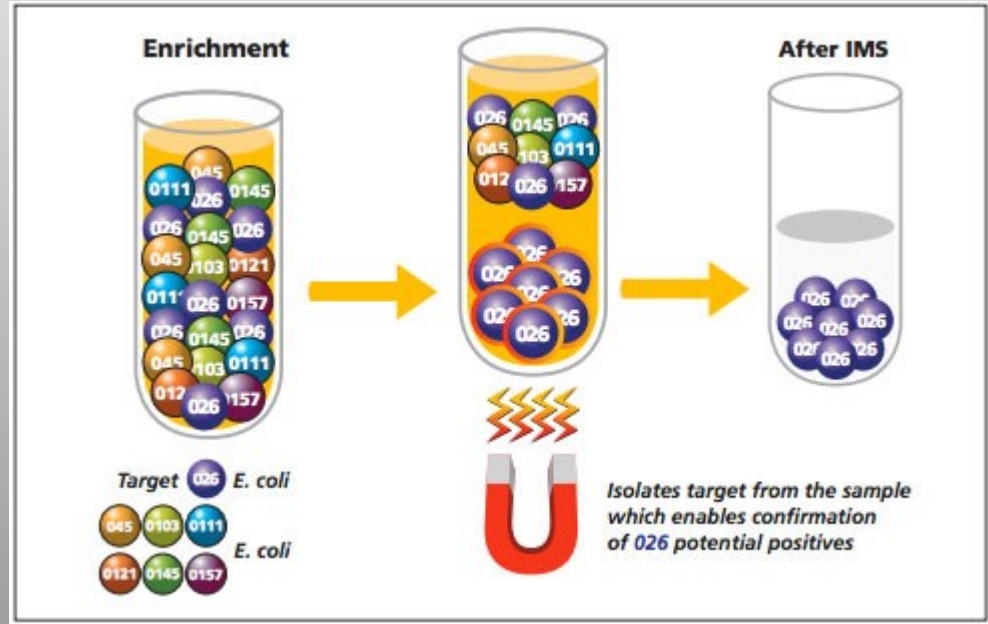


- ✓ İMA tek başına bir tayin yöntemi olmasa da, seçici zenginleştirmeye dayalı tüm tayin yöntemleri için zaman kazandıran önemli bir aşamadır

İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

İmmuno Manyetik Ayırma :

- ✓ Paramanyetik kürelerin antikorla kaplanması için streptavidin ve biotin;
- ✓ Performans: Antikoru tip, fonksiyonel affinitesi, analizde kullanılan partikül sayısı, inkübasyon süresi ve uygulanan yıkama,
- ✓ Seçici olarak antikor kaplı partiküllerin yüzeyine bağlanan mikroorganizmalar canlı kalır ve besiyerinde çoğalmaya devam eder



İmmunolojik Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

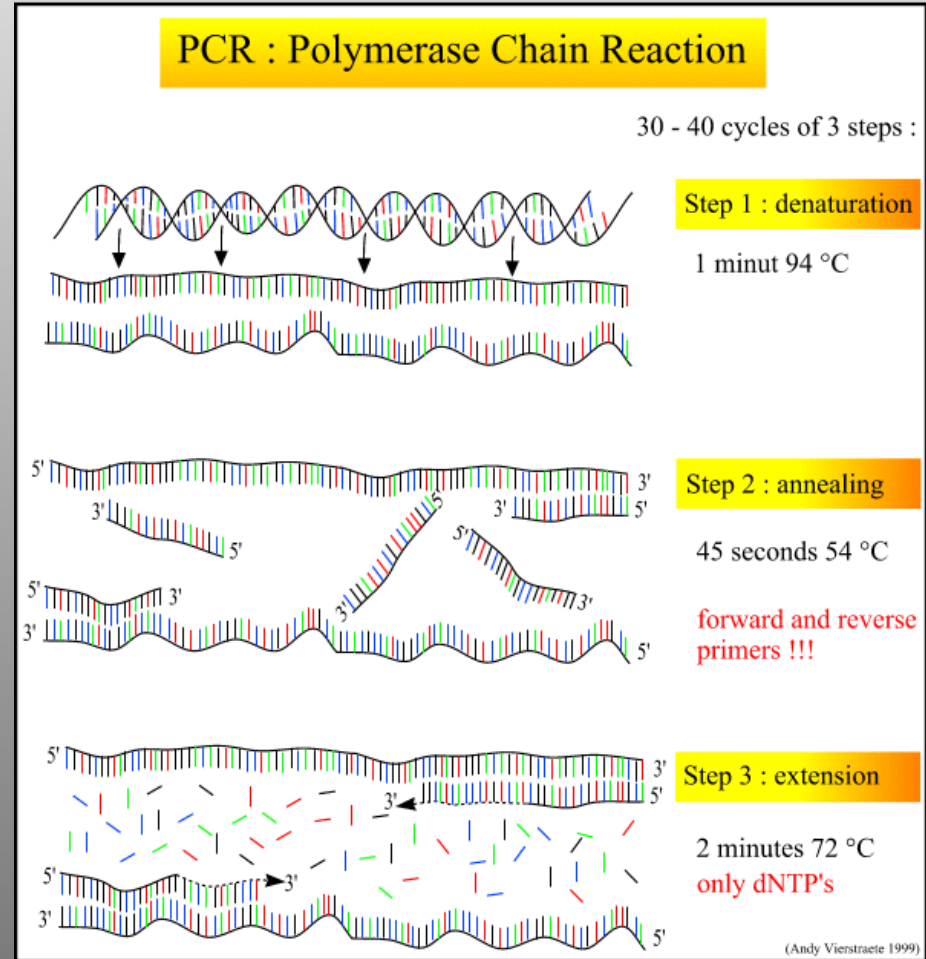
İmmuno Manyetik Ayırma :

- ✓ Spesifik antikorlarla kaplanmış metalik partiküller sıvı haldeki şüpheli örneğe eklenir,
- ✓ Ortalama 30 dakika ile bir saat inkübasyon: Bağlanma
- ✓ Tüp manyetik güç kaynağına yerleştirilip mıknatıs ile partiküllerin uzaklaştırılır,
- ✓ İzole edilen manyetik partikül-antijen kompleksinin uygun bir tampon çözelti ile yıkanır
- ✓ Hedef maddenin seçici olarak konsantre edilir, uygulanacak identifikasyon yönteminin başarısını artırır ve bir selektif zenginleştirme basamağının yerini alır.

Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) :

ÖZETLE: İzole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonukleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak, sayısal çoğaltılması ve uygun bir şekilde görüntülenmesi



Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

AVANTAJLARI:

- ✓ Kısa sürede sonuç alınabilmesi,
- ✓ Canlı hücre gereksinimi olmaması (özellikle hijyen kontrollerinde bulaşının kaynağını göstermek açısından),
- ✓ Hasar görmüş hücrelerin de tespit edilebilmesi
- ✓ Spesifitesi, doğruluk oranlarının yüksek olması.

GIDA ÖRNEKLERİ İÇİN:

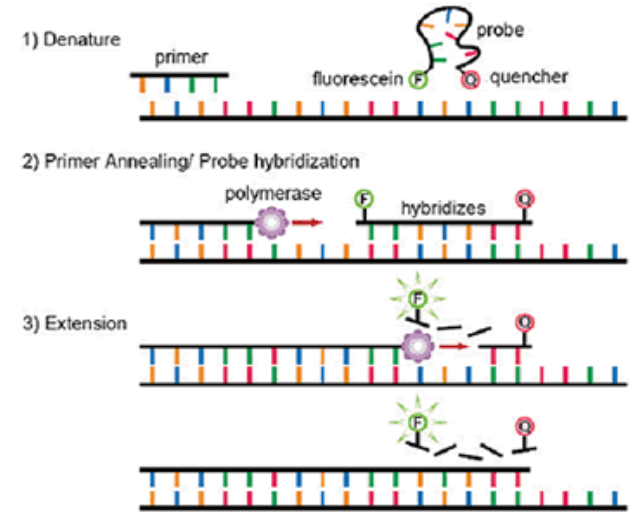
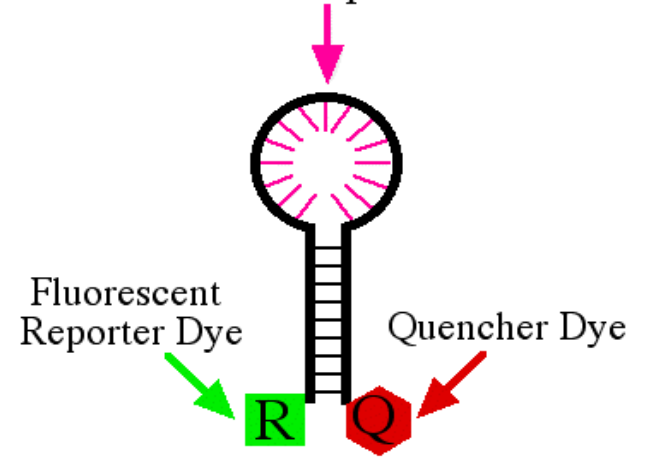
- ✓ Sıvı gıdalar filtreden,
- ✓ Katı gıdalar uygun tampon solüsyonla homojenize edilir,
- ✓ Bazen ön zenginleştirme gerekebilir
- ✓ Ekstraksiyon
- ✓ Hedef DNA, deoksiribonükleotidler, Taq polimeraz, hedef gene spesifik primerler Termal Cyclers'a,
- ✓ Jel elektroforez ve görüntüleme

Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Modifikasyonları:

- ✓ Touchdown, Nested, Multiplex, AFLP, RFLP ve bunların kombinasyonu;
- ✓ RealTime PCR
- ✓ Floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın miktarının gösterilmesi
- ✓ Floresan sinyali PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır
- ✓ Çok sayıda ticari kit...

PCR Product-Specific Nucleotides

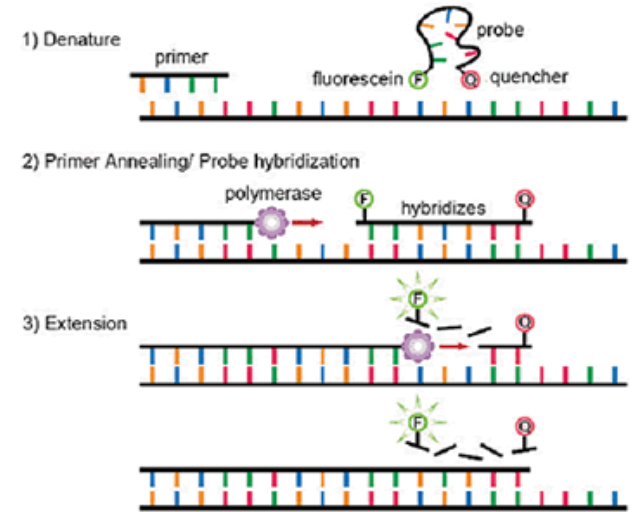
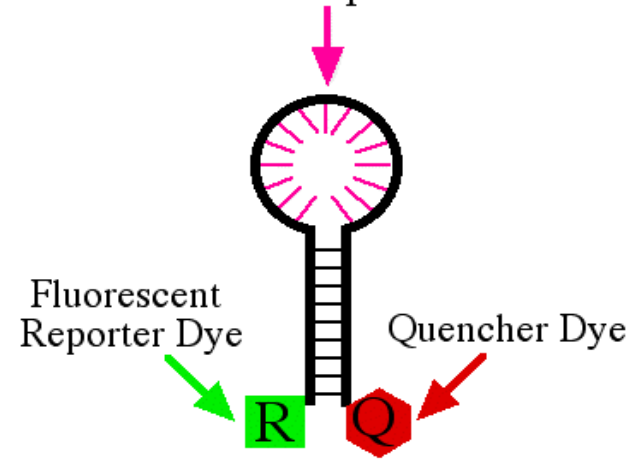


Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

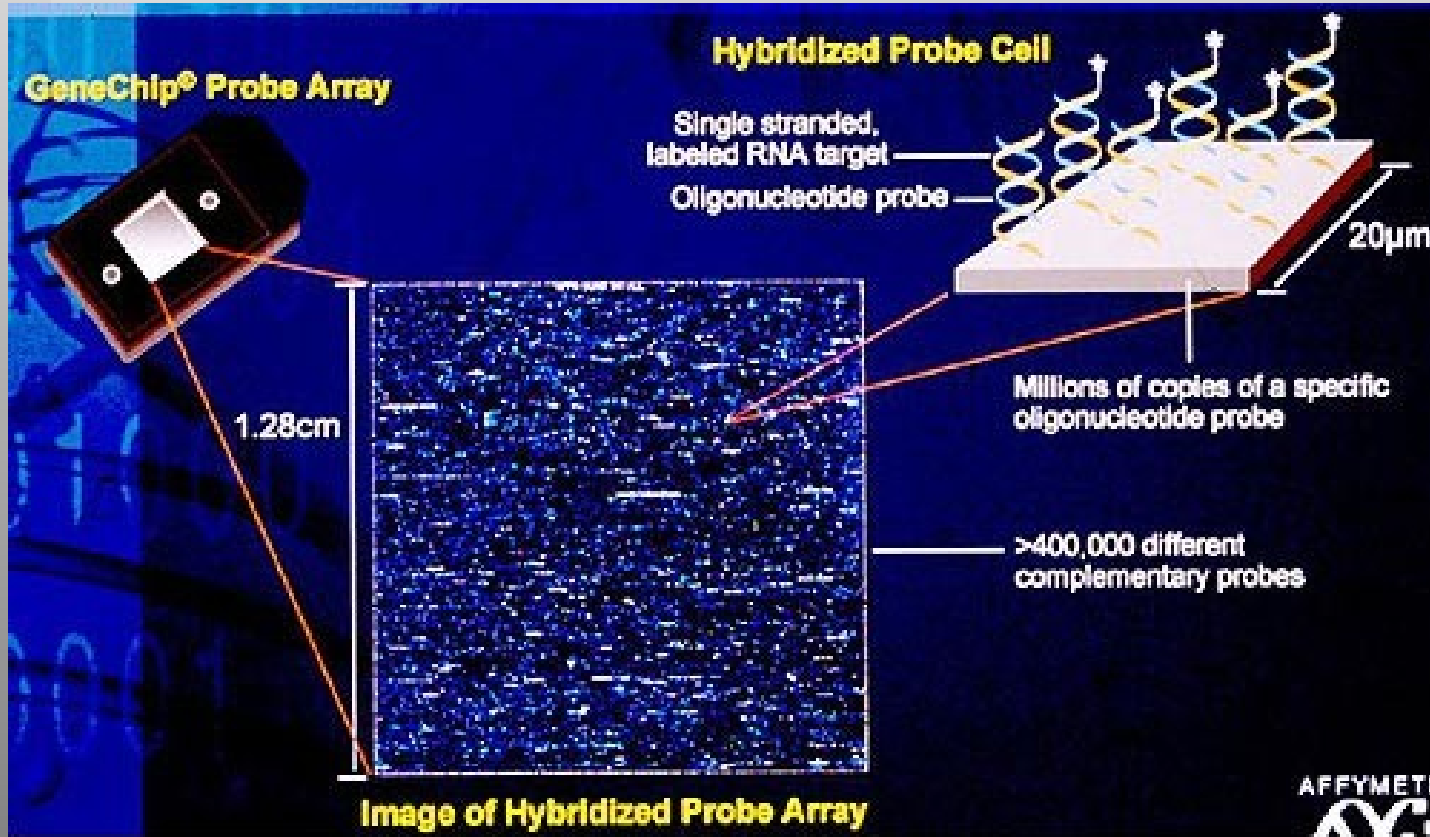
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Modifikasyonları:

- ✓ Touchdown, Nested, Multiplex, AFLP, RFLP ve bunların kombinasyonu;
- ✓ RealTime PCR
- ✓ Floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın miktarının gösterilmesi
- ✓ Floresan sinyali PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır
- ✓ Çok sayıda ticari kit...

PCR Product-Specific Nucleotides



Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon



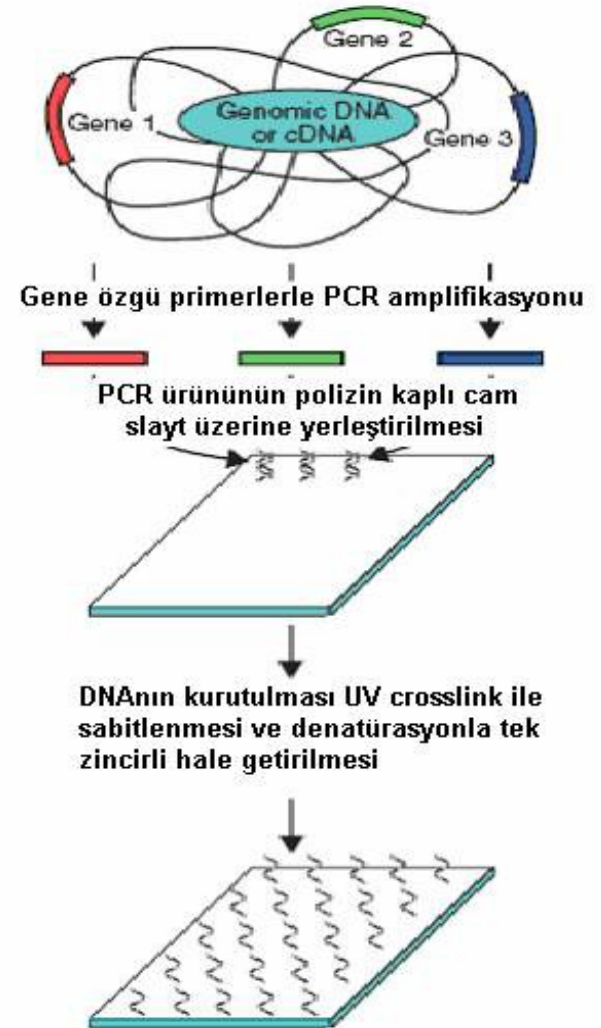
**Gen-çip
(Microarray)
Teknolojisi:**

Cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde oluşturulmuş mikroskobik DNA spotları

Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Gen-çip (Microarray) Teknolojisi:

- ✓ PCR ürünleri amplifikasyonla elde edilip, çip üzerine yaklaşık 2 cm^3 bir alana noktacıklar halinde yerleştirilir,
- ✓ Her bir PCR ürününün yerleştirildiği bölge ve içerdiği DNA dizisi kesin olarak bellidir.
- ✓ Bu DNA' lar kurutulur, sabitlenir ve denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir.
- ✓ Hazırlanan çipler, işaretlenmiş cDNA fragmentleriyle bağlanmak üzere kullanılırlar



Nükleik Asit Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Gen-çip (Microarray) Teknolojisi:

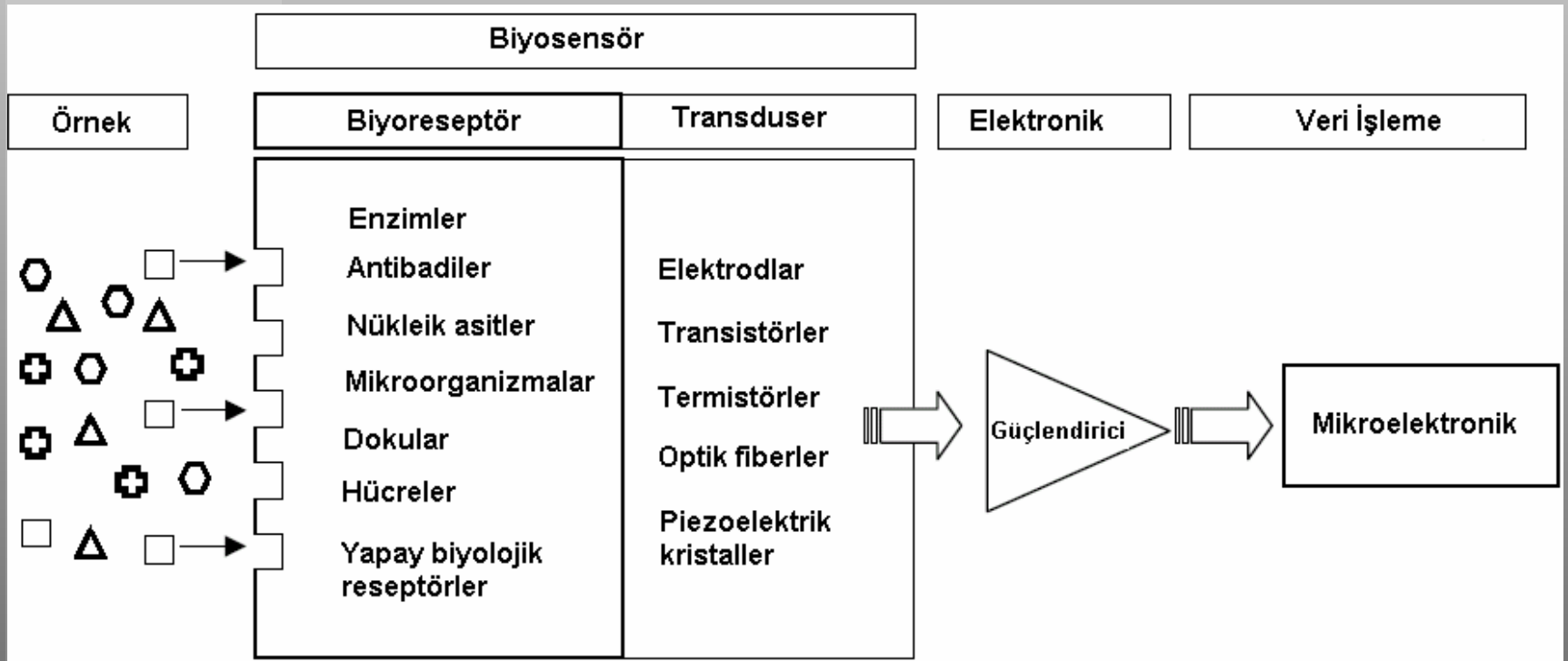


- ✓ Kim ve ark. (2008),
- ✓ *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp.,
- ✓ oligonükleotid probalar dizayn ederek deneme çalışması
- ✓ Her bir gıda kaynaklı patojenin DNA'sı ile yüksek spesifitede hibridizasyon elde etmişler
- ✓ oldukça hassas, hızlı ve etkili
- ✓ gıda endüstrisinde rutin kullanım için çok elverişli

Elektriksel Sinyal Ölçümü Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Biyosensör Teknolojisi:

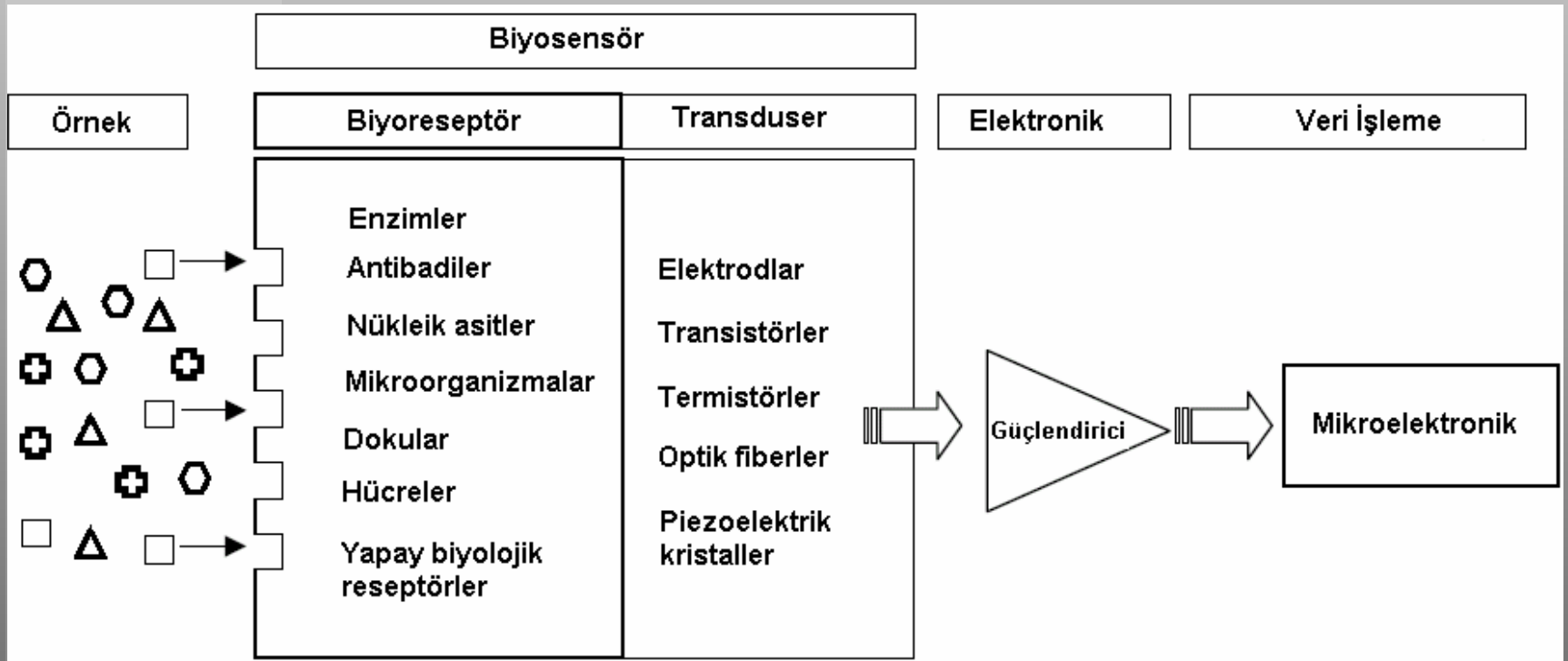
- ✓ Biyolojik algılayıcı ile, analiz edilecek hedefin konsantrasyonu ile orantılı olarak sinyal üreten transduser'in kombinasyonundan oluşan bir cihazdır.



Elektriksel Sinyal Ölçümü Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Biyosensör Teknolojisi:

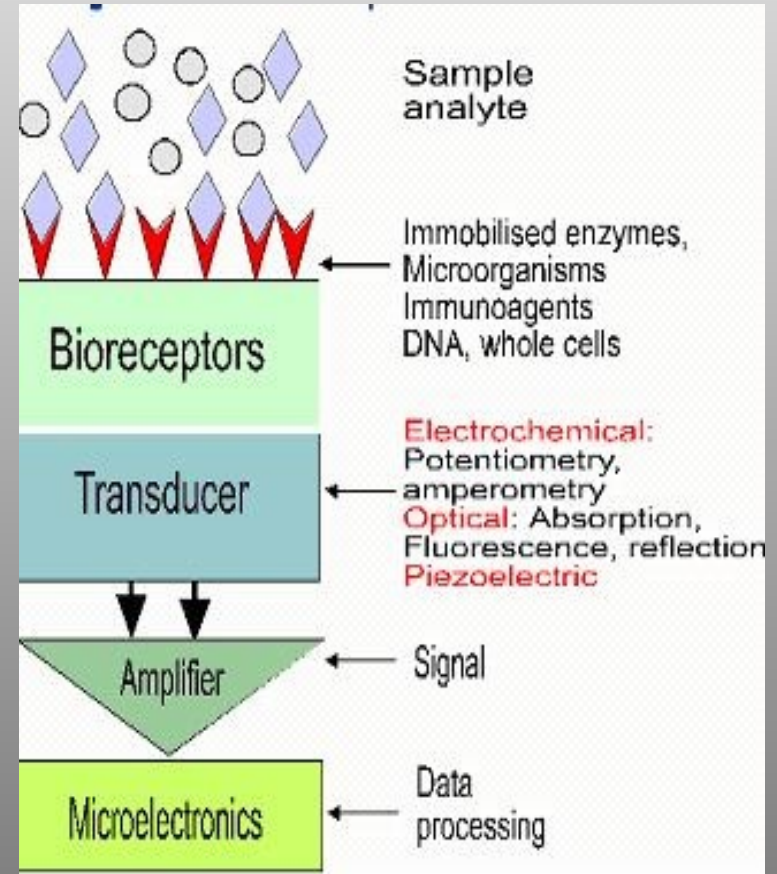
- ✓ 1- Seçici tanıma mekanizmasına sahip biyomolekül/ biyoajan,
- ✓ 2- Biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen çevirici
- 3- elektronik bölüm



Elektriksel Sinyal Ölçümü Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Biyosensör Teknolojisi:

- ✓ Gıdalarda kompozisyon belirlemede,
- ✓ Fermentasyon prosesinin on-line kontrolünde
- ✓ İşlenmiş ve çiğ gıdalarda kontaminasyonu belirlemede,
- ✓ Proses kontrolünde biyosensörlerin iki avantajlı yönü:
- ✓ Yüksek seçicilik ve hızlı cevap süresi
- ✓ HACCP kontrol sisteminde On-line ölçüm
- ✓ Gıda patojenleri; çok az örnek gerektirmesi, kısa sürede sonuç ve taşınabilir
- ✓ Patojenlerin tespitinde en hızlı gelişen teknoloji



Elektriksel Sinyal Ölçümü Tabanlı Yöntemlerle Hızlı İdentifikasyon

Biyosensör Teknolojisi:

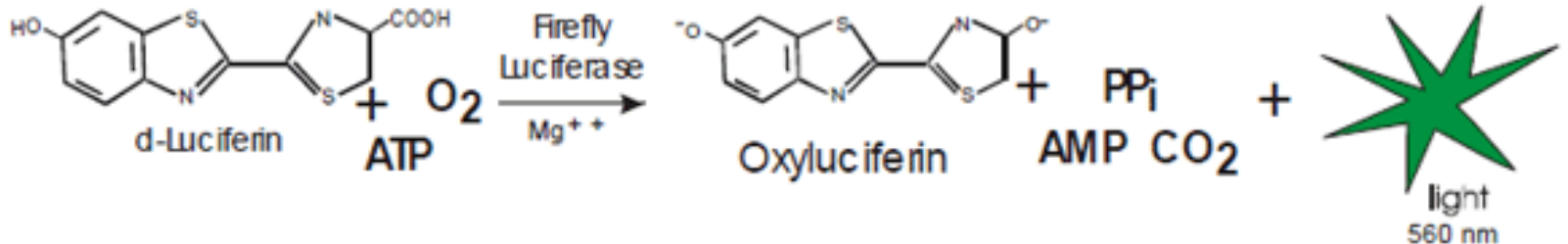
- ✓ Malthus 2000: Elektrokimyasal (iletkenlikteki değişimler) aynı anda 240 su numunesi, mikrobiyal yük
- ✓ BiaCore T100: SPR (yüzey plazmon rezonans) teknolojisi, 10 dakikalık süre içinde 10^3 kob/ml.'lik değişimi ölçebilme
- ✓ Detex System: Elektroimmunoassay biyosensör, et ve et ürünlerinde *Salmonella* spp. için %100, *Camplobacter* spp. için %99 duyarlılık



ATP Ölçüm Yöntemine Dayalı Hızlı Kontrol Sistemleri

ATP Biyolüminesans:

- ✓ Biyolüminesans: Canlı organizmalar tarafından kimyasal reaksiyonlarla ışık üretilmesi,
- ✓ Ateş böceklerinde (*Photinus pyralis*) luciferin O₂ ile birleşerek oksiluciferin
- ✓ Oksiluciferin uyarılmış form, çabucak ışık vererek geri döner,
- ✓ Reaksiyon lusiferaz enzimi ile olur, bu enzim inaktifken ATP'ye bağlı



ATP Ölçüm Yöntemine Dayalı Hızlı Kontrol Sistemleri

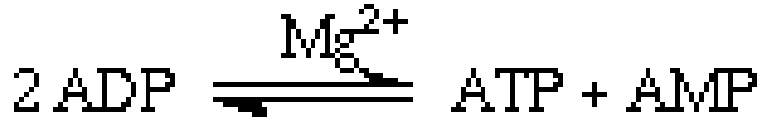
ATP Biyoluminesans:

- ✓ Önce mikrobiyal olmayan ATP non-iyonik bir deterjanla ekstrakte edilir
- ✓ 5 dk. içinde ortama salınan yüksek ATPaz enzimi ile yıkımlanır,
- ✓ Mikrobiyal ATP %5'lik trikloasetik asit / organik solvent (etanol, aseton, kloroform) ekstrakte edilir,
- ✓ Enzim-koenzim kompleksi (lusiferaz – lusiferin) ile reaksiyon başlatılıp lüminometre ile ölçüm,
- ✓ Monitörize HACCP uygulamaları için elverişli: Toplam mikrobiyal yükün belirlenmesi, sonucun hızlı bir şekilde görüntülenebilir olması,



ATP Ölçüm Yöntemine Dayalı Hızlı Kontrol Sistemleri

Adenilat Kinaz



Adenilat Kinaz ölçümleri:

- ✓ ATP ve AMP'den iki ADP oluşum reaksiyonunu katalize eden enzim
- ✓ AK ölçümü, ATP biyoluminesans ölçümüne göre 10 kattan 100 kata kadar daha hassastır. 5 dakika içinde 10 adet *E. coli* hücrelerini ölçebilecek hassasiyete

Corbitt ve ark. (2000),

- ✓ Çeşitli hayvansal ve bitkisel gıdalar,
- ✓ Adenilat kinaz ölçümü ile *E. coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus*
- ✓ 10^4 - 10^5 kob / 5 cm²

ATP Ölçüm Yöntemine Dayalı Hızlı Kontrol Sistemleri

3M / BIOTRACE's
Clean-Trace

Before
Activation



Lost
Sample

After
Activation



Ensuring The
Highest Levels
of hygiene



Adenilat Kinaz ölçümü esasına dayalı çalışan ve hijyen kontrollerinde sıklıkla kullanılan BIOTRACE – Clean Trace cihazı.

SONUÇ :

- ✓ Hızlı yöntemler, özellikle yoğun numune akışının olduğu gıda laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.
- ✓ Bu yöntemlerin güvenilirliği ile ilgili birçok araştırmanın sonuçları göstermiştir ki; bu testler çoğunlukla güvenilir, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip, hızlı ve ucuz testlerdir.
- ✓ Genellikle kullanımları kolay, kullanım için fazla eğitim gerektirmemeleri gelecekte onların yoğun bir şekilde kullanılacağına işaret etmektedir.
- ✓ Son yıllarda hızla gelişen PCR yöntemi, birçok patojen mikroorganizmanın gen sekanslarının belirlenmesi ile yaygın bir kullanım alanına kavuşmuştur.
- ✓ Gelecekte, hızlı yöntem uygulamalarının daha da gelişmesiyle, özellikle HACCP uygulamalarında, kontaminasyon noktalarının değerlendirilmesinde daha yaygın olarak kullanılacağı beklenmektedir.

TESSENKURIER