

Kanatlı Etlerinde İmmünomanyetik Ayırma (İMA) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Kombine Yöntemi İle *Salmonella* spp. İzolasyonu ve Tanımlanması

Ulya Ben¹, S. Aykut Aytaç^{1*}, Canan Cengiz¹

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara
*aytac@hacettepe.edu.tr

Özet

Bu çalışmada, Ankara çeşitli marketlerden toplanan kanatlı et örneklerinden immünomanyetik ayırma (İMA) yöntemi ile izole edilen önemli bir gıda patojeni olan Salmonellaların moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için İMA sonrası elde edilen *Salmonella* spp. izolatlarının DNA'ları izole edilmiş ve PZR yöntemi uygulanarak tüm *Salmonella* türlerinde bulunan *invA* genine özgün 284 bp' lik ve *S. Enteritidis*, *S. gallinarum* ve *S. pullorum* türlerinde bulunan *sefA* genine özgün 488 bp' lik bölümü çoğaltılarak jel görüntüleme yapılmıştır. Çalışma sonucunda denemeye alınan ve incelenen 50 adet tavuk eti örneğinin 11 tanesinde Salmonellalara özgün 284 bp' lik bant (*invA*) gözlenirken, bu 11 örneğin 6 tanesinde özellikle *S. gallinarum* ve *S. pullorum*' da bulunan 488 bp' lik bant (*sefA*) belirlenmiştir.

Giriş

Salmonella gıdalarda genelde düşük sayılarda bulunduğundan izolasyon şanslarını artırmak için İmmünomanyetik Ayırma (İMA) yöntemi gibi hızlı ve güvenilir teknikler geliştirilmiş olup tanımlanmalarında da PZR gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. İMA, karışık ve yoğun mikroflora içeren bir gıda örneğinden hedeflenen mikroorganizmayı yakalayabilen süperparamanyetik polisitiren mikroküreciklerin kullanımını içermektedir. PZR yöntemi özgün DNA dizilerinin, sentetik oligonükleotidler kullanılarak *in vitro* şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) mümkün hale getiren bir yöntemdir. Bu yöntem, belirli bir nükleotid dizisini içeren DNA bölgesinin, sayısal olarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Kültür, Tampon Çözeltiler, Boya Çözeltileri ve Besiyerleri, Deney Düzenekleri ve İzolasyon Kiti

Çalışmada *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 kültürü kullanılmıştır. Ayrıca; Lambda tamponu, immünomanyetik ayırma (İMA) yıkama çözeltisi (pH: 7.4), 10 mM tris-HCl çözeltisi (pH: 8.0), 10 mg/mL lizozim çözeltisi, 0.5 M Na₂EDTA (disodyum etilendiamin tetraasetik asit) çözeltisi (pH: 8.0) ve tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu, (10x) 1 mg/mL etidyum bromür çözeltisi ve 6X yükleme boya çözeltisi, Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth (LAB M-İngiltere), TS Broth, TS Agar, Tamponlanmış peptonlu su (TPS), Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar ve Rambach Agar (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

Araştırmada Dynal[®] (Oslo, Norveç) firmasından sağlanan IMA yöntemi deney düzeneği ve Dynal[®] (Oslo, Norveç) firmasından sağlanan Dynabeads anti-*Salmonella* partikülleri kullanılmıştır ve DNA izolasyonu için Roche (Almanya) markalı high pure PCR template preparation kiti kullanılmıştır.

PZR Deney Düzeneği, Oligonükleotidler ve Jel Görüntüleme Düzeneği

Çalışmada THE-MWG (Almanya) markalı Primus 96 termocycler ve yine aynı firmadan sağlanan ve *invA* geninin 284 bp'lik bölümünü çoğaltan (1), 139 ileri primeri (5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3') ve 141 geri primeri (5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3') ve *sefA* geninin 488 bp'lik bölümünü çoğaltan A058 ileri primeri (5'-GAT ACT GCT GAA CGT AGA AGG-3') ve A01 geri primeri (5'-GCG TAA ATC AGC ATC TGC AGT AGC-3') kullanılmıştır (2).

Çalışmada Syngene (İngiltere) markalı InGenius jel görüntüleme ve analiz sistemi kullanılmıştır.

Yöntem

İmmünomanyetik Ayırma işlemi Dynal[®] (Oslo, Norveç) belirttiği şekilde yapılmış ve ISO'nun önerdiği Rambach ve Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar (Merck) besiyerleri kullanılarak olası *Salmonella* spp. kolonileri belirlenmiştir.

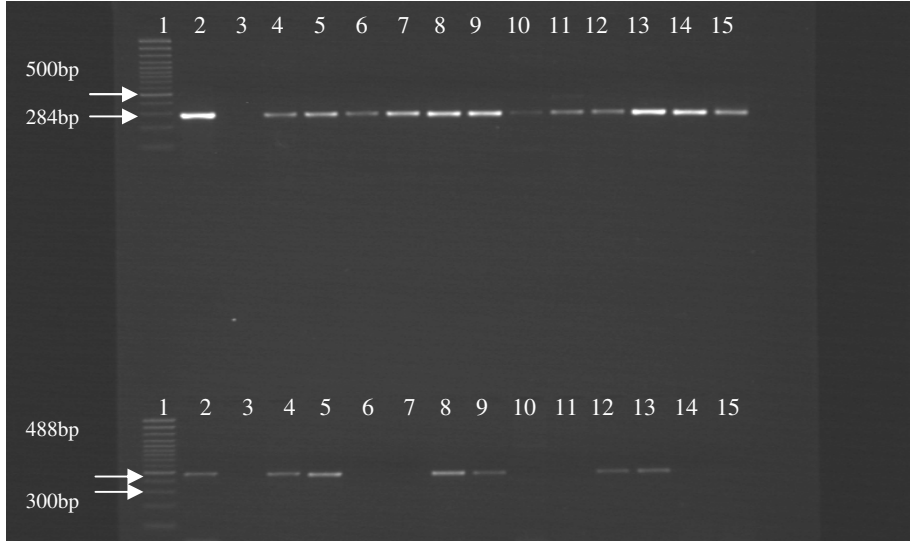
Optimizasyon çalışmalarında; kullanılan primer (0.5 µM), dNTPs (200 ve 260 µM), Taq polimeraz (1.25 U), MgCl₂ (2.2-3.0 mM) ve DNA (1.5µL) miktarları ile denatürasyon (94 °C, 45 sn.), bağlanma (50-64.5 °C, 45 sn.), uzatma (72 °C , 1 dak.) sıcaklıkları ve döngü sayısı (35x) denenmiştir. Daha sonra IMA yöntemi kullanılarak elde edilen şüpheli izolatların DNA izolasyonları yapılmış ve

izolatların hedef gen bölgelerinin PZR yöntemi ile çoğaltılması sağlanmış ve %1.5'lik agaroz jelde (v/v) (Serva, Almanya) elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma

Çalışmada *S. Enteritidis* ve *S. gallinarum* saf kültür çalışmasına ve tavuk örneklerinden elde edilen izolatlara uygulanarak elde edilen PZR sonuçları Şekil-1'de gösterilmiştir.

Şekil 1' de de görüldüğü gibi denemeye alınan 50 tavuk örneğinden İMA uygulanarak elde edilen izolatlara PZR yöntemi uygulandığında toplam 12 örnekte *Salmonella* spp. varlığı (284 bç' lik bandlar) saptanırken bunlardan 6 tanesinde (4, 5, 8, 9, 12, 13) 488 bç' lik *sefA* genine ait bandalar gözlenmiş ve bunların muhtemelen bu gene sahip olan ve tavuk etlerinde bulunabilen *S. gallinarum* ve *S. pullorum* oldukları sonucuna varılmıştır.



Şekil 1. PZR sonuçları

1	100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci
2	Pozitif kontrol
3	Negatif kontrol
4-15	<i>InvA</i> (284 bç)
4, 5, 8, 9, 12, 13	<i>SefA</i> (488 bç)
6, 7, 10, 11, 14, 15	Band gözlenmemiştir

Kaynaklar

1. Rahn K, de Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan, JE, Ginocchio C, Curtis III R, Gyles CL. 1992. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method for detection of Salmonella, Molecular and Cell Probes, 6, 271-279.
2. Oliveira SD, Santos LR, Schuch DMT, Silva AB, Salle TP, Canal CW. 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR, Veterinary Microbiology, Volume 87, 25-35