

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

### 1. AMAÇ VE KAPSAM

Bu talimat gıda örneklerinde *Salmonella* türlerinin aranmasına yöneliktir. Analiz iki aşamalı selektif zenginleştirme sonrasında protein temelli bir sistem olan RapidChek Select *Salmonella* lateral flow test stribi ile *Salmonella* varlığının tespiti ve şüpheli pozitif sonuçların biyokimyasal testlerle doğrulanması esasına dayanır.

### 2. TANIMLAR

-

### 3. KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER

#### 3.1. Cihaz ve Ekipman

- Otoklav (121°C)
- Etüv (180±5°C)
- İnkübatör (37±1°C)
- Analitik terazi (0.01g hassasiyette)
- Steril örnekleme malzemeleri: spatül, makas, pens, bistüri
- Stomacher ve steril stomacher poşetleri
- Blender ve steril edilebilir blender kapları; gerektiğinde
- Vorteks
- Test tüpleri ve şişeler
- Steril Eppendorf tüpü
- Dereceli pipetler veya otomatik pipetler
- Petri kutuları; 90-100 mm çapında, cam veya plastik malzemeden yapılmış
- Öze
- Lam
- Su banyosu (37±1°C; 41,5±1°C)

#### 3.2. Besiyerleri

##### 3.2.1. RapidChek Select Pre-enrichment Broth

20 g dehidre besiyeri 1 l distile su içinde çözündürülür ve otoklavda 121°C' da 15 dakika sterilize edilir. Supplement ilave edilmemiş steril bazal besiyeri buzdolabında 4 haftaya kadar muhafaza edilebilir. Sterilizasyon sonrası 1l besiyeri için 10ml **RapidChek SELECT Supplement** ilave edilir ve karıştırılır. Hazırlanan besiyeri 3 saat içinde kullanılmalıdır.

##### 3.2.2. RapidChek Select Secondary Enrichment Broth

7,4 g dehidre besiyeri 100 ml distile su içinde çözündürülür, sürekli karıştırılarak kaynayıncaya kadar ısıtılır ve soğutulur. Bu şekilde hazırlanan besiyeri buzdolabında 4 haftaya kadar muhafaza edilebilir.

##### 3.2.3. RapidChek Select *Salmonella* Lateral Flow Strip

##### 3.2.4. Ksiloz Lizin Deoksikolat (XLD) Agar

Yeast extract powder	3 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

Ksiloz	3,75 g
Laktoz	7,5 g
Sükroz	7,5 g
L-Lizin hidroklorür	5,0 g
Sodyum tiyosülfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	6,8 g
Demir (III) amonyum sitrat	0,8 g
Fenol red	0,08 g
Sodyum deoksikolat	1 g
Agar	9 g–18 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri sterilize edilmez. Besiyeri kaynama sıcaklığına kadar su banyosunda tutulur ve soğutulur. pH 25°C' da 7,4 ± 0,2 olacak şekilde ayarlanır.

### 3.2.5. Nutrient Agar (NA)

Meat extract	3 g
Pepton	5 g
Agar	9 g-18 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

### 3.2.6. Triple Sugar Iron (TSI) Agar

Meat extract	3 g
Yeast extract	3 g
Pepton	20 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Laktoz	10 g
Sükroz	10 g
Glikoz	1 g
Demir (III) sitrat	0,3 g
Sodyum tiyosülfat	0,3 g
Fenol red	0,024 g
Agar	9 g-18 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 7,4±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

### 3.2.7. Üre Agar

#### 3.2.7.1. Temel Besiyeri

Pepton	1 g
Glikoz	1 g

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
Fenol red	0,012 g
Agar	9 g-18 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 6,8±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

### 3.2.7.2. Üre Çözeltisi

Üre	400 g
Distile su	1000 ml

Filtrasyon yoluyla sterilize edilir.

### 3.2.7.3. Tam Besiyeri

Temel besiyeri	950 ml
Üre çözeltisi	50 ml

### 3.2.8. L-Lizin Dekarboksilasyon Besiyeri

L-Lizin monohidroklörür	5 g
Yeast extract	3 g
Glikoz	1 g
Bromcrezol purple	0,015 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 6,8±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

### 3.2.9. β-Galaktosidaz Reaktifi

#### 3.2.9.1. Tampon Çözeltisi

Sodyum dihidrojen fosfat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	6,9 g
Sodyum hidroksit, 10 mol/L çözelti yaklaşık	3 ml
Distile su, son hacim	50 ml

pH' sı 25°C' da 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

#### 3.2.9.2. ONPG Çözeltisi

o-Nitrofenil β-D-galaktopirinosit (ONPG)	0,08 g
Distile su	15 ml

#### 3.2.9.3. Tam Reaktif

Tampon çözeltisi	5 ml
ONPG çözeltisi	15 ml

### 3.2.10. Voges-Proskauer Testi İçin Reaktifler

#### 3.2.10.1. VP Besiyeri

Pepton	7 g
Glikoz	5g

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

Dipotasyum hidrojen fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' 6,9±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

### 3.2.10.2. Kreatin Çözeltisi (N-amidinosarkosin)

Kreatin monohidrat	0,5 g
Distile su	100 ml

### 3.2.10.3. Naftol Çözeltisi

1-Naftol	6 g
Etanol, % 96	100 ml

### 3.2.10.4. Potasyum Hidroksit Çözeltisi

Potasyum hidroksit (KOH)	40 g
Distile su	100 ml

### 3.2.11. İndol Tepkimesi İçin Reaktifler

#### 3.2.11.1. Tripton-Triptofan Besiyeri

Tripton	10 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
DL-Triptofan	1 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 7,5±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

#### 3.2.11.2. Kovaks Reaktifi

4-Dimetilaminobenzaldehit	5 g
Hidroklorük asit, ρ = 1,18 g/ml - 1,19 g/ml	25 ml
2-metilbütan-2-ol	75 ml

### 3.2.12. Yarı Katı Nutrient Agar

Meat extract	3 g
Pepton	5 g
Agar	4 g–9 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

### 3.2.13. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Sodyum klorür (NaCl)	8,5 g
Distile su	1000 ml

Sterilizasyondan sonra pH' sı 25°C' da 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121°C' da 15 dakika sterilize edilir.

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

### 4. UYGULAMA

#### 4.1. Numune Hazırlama

Analiz için en az 25 g(ml) numune kullanılmalıdır. Gerekliğinde katı ve sert gıdaların homojenizasyonu amacıyla blender kullanılabilir. Başlangıç Numune/RapidChek Select Pre-enrichment Broth oranı (1/9) korunarak daha fazla miktarda numune kullanılabilir. Gerekliğinde homojenizasyon için stomacher kullanılmalıdır.

#### 4.2. Birinci Seçici Zenginleştirme

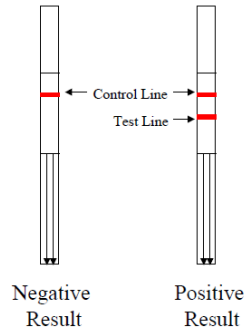
Birinci seçici zenginleştirme amacıyla RapidChek Select Pre-enrichment Broth  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'da  $19\pm 3$  saat inkübasyona bırakılır.

#### 4.3. İkinci Zenginleştirme

Birinci seçici zenginleştirmenin sonunda RapidChek Select Pre-enrichment Broth' dan, önceden  $41,5^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa ısıtılmış 1 ml RapidChek Select Secondary Enrichment Broth içeren Eppendorf tüpüne 0,1 ml inoküle edilir. RapidChek Select Secondary Enrichment Broth  $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta  $7\pm 1$  saat inkübe edilir. Yüksek sayıda ( $<1000$  kob/g) mikroorganizma içeren numuneler için inkübasyon süresi 16-22 saat olmalıdır.

#### 4.4. Lateral Flow Assay

İkinci seçici zenginleştirme sonrasında RapidChek Select *Salmonella* Lateral Flow Strip RapidChek Select Secondary Enrichment Broth içine daldırılarak 10 dakika beklenir. Stribin okuma bölgesinde test ve kontrol çizgilerinin oluşması şüpheli pozitif, yalnızca kontrol çizgisinin oluşması negatif, yalnızca test çizgisinin oluşması ise geçersiz sonucu gösterir.



Şekil 1. RapidChek Select *Salmonella* Lateral Flow Strip üzerinde Pozitif ve negatif sonuçlar

#### 4.5. Klasik Doğrulama

Tüm şüpheli pozitif sonuçlar doğrulanmalıdır. Doğrulama RapidChek Select Secondary Enrichment Broth kullanılarak yapılmalıdır. Doğrulama için RapidChek Select Secondary Enrichment Broth besiyerinden XLD agar besiyerine öze ile ekim yapılır. Ters çevrilen petri kutuları inkübatöre yerleştirilerek  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'da  $24\pm 3$  saat inkübe edilir. Inkübasyon sonunda XLD agar üzerinde,  $\text{H}_2\text{S}$  oluşumundan dolayı siyah merkezli ve lizin dekarboksilasyonu sonucu kırmızımsı yarı şeffaf zonlu olan koloniler tipik *Salmonella* kolonileridir. Doğrulama için, her petri kutusundaki muhtemel *Salmonella* kolonilerinden en az bir tane alınır ve önceden hazırlanmış

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

olan NA besiyerine ekim yapılır. Petri kutuları  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' da  $24\pm 3$  saat inkübe edilir. İdentifikasyon için karbonhidrat testleri, üre testi, L-lizin dekarboksilaz testi,  $\beta$ -galaktosidaz testi, voges-proskauer testi ve indol testleri yapılır. L-lizin dekarboksilasyon testi pozitif,  $\beta$ -galaktosidaz, VP ve indol testleri negatif, laktoz ve/veya sakkarozu kullanamayan bunun yanında glikozu kullanabilen, sülfiti indirgeyerek hidrojen sülfid ve üreyi parçalayarak amonyak gazı oluşturan, koloniler *Salmonella* olarak değerlendirilir. Doğrulama amacıyla biyokimyasal identifikasyon test kitleri (bioMeriëux Api 20 E) kullanılabilir.

### 4.5.1. TSI Agar

NA besiyeri üzerinde gelişen seçilmiş kolonilerden, yatık agar olarak hazırlanan TSI agar besiyerinin yüzeyine ve iğne uçlu öze ile dip kısmına ekim yapılır.  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta,  $24\pm 3$  saat süreyle inkübe edilir. İnkübasyon sonucunda gözlenen sonuçlar şu şekilde yorumlanır:

#### a) Taban

Sarı	glikoz pozitif
Kırmızı veya değişiklik yok	glikoz negatif
Siyah	hidrojen sülfid oluşumu
Kabarcık veya yarık	glikozdan gaz oluşumu

#### b) Eğimli yüzey

Sarı	laktoz ve/veya glikoz pozitif
Kırmızı veya değişiklik yok	laktoz ve/veya sükroz negatif

Tipik *Salmonella* kütürleri yüzeyde kırmızı renk, dipte asit oluşumu ile sarı renk, hidrojen sülfür oluşumu ile siyah renk oluşturan ve gaz oluşturan kolonilerdir.

### 4.5.2. Üre Testi

Yatık agarın yüzeyine ekim yapıldıktan sonra  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta,  $24\pm 3$  saat süreyle inkübe edilir ve belirli aralıklarda kontrol edilir. Tepkime gerçekleştiğinde ürenin parçalanması sonucu amonyak gazı oluşur ve fenol red indikatör boyasının rengi, kırmızı gül pembesine sonrasında kiraz kırmızısına döner. Tepkime 2-4 saat sonunda gözlenir.

### 4.5.3. L-lizin Dekarboksilasyon Testi

Sıvı besiyeri yüzeyinin hemen altına ekim yapılır ve  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta,  $24\pm 3$  saat süreyle inkübe edilir. İnkübasyonun sonunda oluşan sarı renk tepkimenin gerçekleşmediğini gösterirken, bulanıklık ve mor renk tepkimenin oluştuğunu yani sonucun pozitif olduğunu gösterir.

### 4.5.4. $\beta$ -Galaktosidaz Testi

Şüpheli *Salmonella* kolonilerinden bir öze dolusu örnek alınır ve 0,25 ml FTS içeren deney tüpüne konulur. Tüp içerisine 1 damla toluen ilave edildikten sonra tüp çalkanır ve  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' a ayarlanmış olan su banyosunda yaklaşık 5 dakika bekletilir.  $\beta$ -galaktosidaz tayini için deney tüpüne 0,25 ml  $\beta$ -galaktosidaz reaktifi ilave edilir ve  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' a ayarlanmış olan su banyosunda  $24\pm 3$  saat süreyle inkübe edilir. Genellikle pozitif sonuç göstergesi olan sarı renk 20 dakika içinde gözlenir. 24 saat içinde renk oluşmaması negatif sonuç olarak değerlendirilir.

### 4.5.5. Voges-Proskauer Testi

## GIDALARDA *SALMONELLA* ARANMASI (RAPIDCHEK SELECT *SALMONELLA*)

Şüpheli *Salmonella* kolonilerinden bir öze dolusu örnek alınır ve 3 ml tuz çözeltisi içeren deney tüpüne konulur. 37±1°C sıcaklıkta, 24±3 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 2 damla kreatin çözeltisi, 3 damla 1-naftol etanolik çözeltisi ve 2 damla potasyum hidroksit çözeltisi ilave edilir ve her ilaveden sonra tüp çalkalanır. 15 dakika içinde varolan pembe rengin, açık kırmızıya dönüşmesi tepkimenin pozitif olduğunu gösterir.

### 4.5.6. İndol Testi

Şüpheli *Salmonella* kolonilerinden, 5 ml tripton/triptofan besiyeri içeren tüpe inokulasyon yapılır. İnokulasyon yapılan tüp, 37±1°C sıcaklıkta, 24±3 saat boyunca inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında, 1 ml kovaks reaktifi ilave edilir. Kırmızı halka oluşumu, pozitif tepkimeyi gösterirken, sarı-kahverengi halka oluşumu, negatif tepkimeyi gösterir.

### 4.5.7. Beklenen Biyokimyasal Test Sonuçları

L-lizin dekarboksilasyon testi	pozitif
Laktoz/sakaroz kullanımı	negatif
Glikoz kullanımı	pozitif
Hidrojen sülfid oluşumu	pozitif
Amonyak gazı oluşumu	pozitif
β-galaktosidaz üretimi	negatif
VP testi	negatif
İndol testi	negatif

*Salmonella* serotiplerinden iki tanesi yukarıda belirtilen özellikler yönünden farklılık gösterir. *Salmonella* Typhi glikozdan gaz oluşumu göstermezken *Salmonella* Paratyhi H<sub>2</sub>S oluşturmaz ve lizin dekarboksilaz negatiftir.

### 4.6. Referans Kültürler

Pozitif Kontrol: *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028)

Negatif Kontrol: *Escherichia coli* (ATCC 25922)

## 5. SONUÇ VE HESAPLAMALAR

Negatif sonuçlar 25 g(ml) numunede *Salmonella* “bulunamadı”, pozitif sonuçlar ise *Salmonella* “saptandı” olarak rapor edilir.

## 6. REFERANSLAR

RapidChek Select Test Kit Manual

ISO 6579, 2002, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for Detection of *Salmonella* Spp.

ISO 6887-1, 1999, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination - Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions.