GIDA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

MİKROORGANİZMA İLE NUMUNELERİN AŞILANMASI KILAVUZU

(EK-5)

2022

Mikroorganizma ile Numunelerin Aşılanması Kılavuzu

1. AMAÇ ve KAPSAM

Bu talimatın amacı, mikrobiyolojik analizlerde, geçerli kılma veya doğrulama çalışmaları ve/veya kalite kontrol çalışmaları için numunelerin arzu edilen mikroorganizmalar ile aşılanmasına ait genel prosedürün anlatılmasıdır.

2. SORUMLULUKLAR

Bu talimatın yürütülmesinden yetkili tüm laboratuvar personeli sorumludur.

3. TANIMLAR ve KISALTMALAR

MKB: Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Referans Suş: Geçerli bir kültür koleksiyonundan elde edilen, cins ve tür düzeyi belirli, tercihe göre World Federation of Culture Collections (WFCC) veya the European Culture Collections Organisation (ECCO) üyesi olan ve en az cins ve tür düzeyinde kendi özelliklerine göre katalogda tanımlanmış mikroorganizma.

Stok Kültür: Referans stoktan yapılan birincil alt kültür.

Çalışma Kültürü: Stok kültür veya referans materyalden elde edilen sertifikalı ya da sertifikasız alt kültür.

Referans Materyal (RM): Yeniden canlandırılacak mikroorganizmaları yeterince homojen ve stabil olarak içeren ölçme işleminde kullanılacak mikroorganizma içeren referans malzeme.

Sertifikalı Referans Materyal (CRM): Geçerli bir prosedür ile tekrar canlandırılacak, ölçüm izlenebilirliği ve belirsizliği bulunan, belirtilen miktarda mikroorganizma içeren sertifikalı referans malzeme.

Kob: Koloni oluşturan birim.

EMS: En Muhtemel Sayı

MRD: Maximum Recovery Diluent

BHI: Brain Heart Infusion Broth.

4. UYGULAMA

4.1. Doğrulama Çalışmalarında Kontamine Örneklerin Doğal ve Yapay Kullanımı İçin Tercih Sırası

1. Seçenek: Doğal olarak kirlenmiş numuneler (Doğal Kontamine Numune)

Çalışmalar için ideal olan doğal olarak kontamine olmuş numunedir ve hedef organizma için (beklenen) tespit seviyesine yakın bir kontaminasyon seviyesine sahiptir.

2. Seçenek: Karışımla kirlenme

Doğal olarak kontamine olmuş numunelerin çok yüksek bir seviye içerdiği tespit edilirse, konsantrasyon doğal olarak kontamine olmuş numunenin normal bir arka plan mikroflorası içeren benzer bir madde ile "seyreltilmesi" ile azaltılabilir. Karışık numune, hedef mikroorganizmanın homojen bir dağılımına sahip olacak şekilde yapılmalıdır.

3. Seçenek: Yapay olarak kontamine olmuş numuneler (Dışardan Spike Yapılarak Kirletilen Numune)

Yapay aşılama için kullanılan suşların tercihen aynı öğeden izole edilmiş olması ve hedef organizmanın doğal çeşitliliği (örneğin serotip, genotip ve fenotip) dikkate alınmalıdır.

Hedef mikrofloranın seviyesi, bu üründe doğal olarak oluşan kontaminasyonun temsilcisi olmalıdır. Ürün "normal" bir arka plan mikroflorası içermelidir.

4. Seçenek: Referans malzemeler

Kararlı ancak stresli bir durumda uygun fakat iyi tanımlanmış seviyelerde hedef mikroorganizma içeren sertifikalı referans materyali gibi referans materyal, hem kalitatif hem de kantitatif metotlarda numuneleri kirletmek için kullanılabilir. Kalitatif analizler için, hedef mikroorganizmanın gıda kaynaklı yalnızca birkaç suşu veya serotipi referans materyali olarak mevcut olduğunda kullanımı sınırlandırılmalıdır.

4.2. Numunelere Mikroorganizma Aşılama Yöntemleri

4.2.1. Karışımla Kontaminasyon

Doğal olarak kontamine olan numunelerden x gramı, istenen kontaminasyon seviyesine ulaşmak için kirletilmemiş numunenin y gramı ile karıştırılır. Karışımla kirlenmiş numune, o gıda maddesi için uygun üreme ısısında analizden önce en az 1 gün boyunca inkübe edilir ve mikrobiyal yükün gıda maddesinde dengeye gelmesi sağlanır.

4.2.2. Ekim Protokolü Kullanılarak Gıdaların Yapay Kontaminasyonu

Miktarı belirlenen kültürün analiz edilecek örneğe inokülasyonundan sonra stabil hale gelmesi için farklı depolama sıcaklıkları ile ilgili olarak belirli bir süre saklanması prensibine dayanır.

4.2.2.1. Yüksek Nemli Gıdaların Sıvı (Broth) Kültürü İle Yapay Kontaminasyonu

Tek örnekli aşılama ile mikroorganizma(lar) içeren gıdaların hazırlanması.

a) Hedeflenen mikroorganizma kültürü elde etmek için kullanılan suş, seçici olmayan sıvı zenginleştirme besiyerine inoküle edilir ve optimal koşullar dikkate alınarak inkübasyona bırakılır. Besiyerinde üreyen suş miktarı tespit edilir.

b) İnkübasyondan sonra uygun bir seyreltici ile hedeflenen düzeye ulaşmak için seyreltmeler yapılır. Çalışmada hedeflenen seyreltme seviyesi, inoküle edilecek gıdaya, kullanılacak suşun kontaminasyon seviyesine, beklenen mikroflora seviyesine ve gıdanın saklama koşullarına bağlıdır.

c) Üretim prosesinde ısıl işlem gören gıdaları kirletmek için kullanılan suşlar, ısı stresi oluşturmak için sıcaklığa maruz bırakılmalıdır (Örneğin, kirletme işleminden önce 50°C'ta 15 dk bekletme).

d) Bilinen hacimdeki suş gıdaya pipetlenerek/püskürtülerek inoküle edilir. İnokülasyon, numunelerin tümüne karıştırılarak homojenize edilebileceği gibi, ayrı ayrı da yapılabilir. Gıdanın su aktivitesinin etkilenmemesi için inokülum hacminin mümkün olduğunca düşük olması gerekir. Genellikle 25 g numune başına 0,25 mL uygulanması önerilir (%1).

e) Homojenliği sağlamak için numune iyice karıştırılır.

f) Numunenin kararlılığını/stresini sağlamak için numune normal depolama sıcaklığında muhafaza edilir. Mikroorganizmaların potansiyel gelişimi ve yaşaması için depolama süresi ve sıcaklığı

dikkate alınmalıdır. Farklı depolama sıcaklıkları ile ilgili olarak, aşılanmış gıdaları aşağıda belirtilen minimum süre boyunca saklayın.

- Dondurulmuş gıdalar (örneğin dondurma): -20°C'de en az 2 hafta,
- Buzdolabında (örneğin portakal suyu): 2-8°C'de en az 48 saat,
- Oda sıcaklığında (örneğin fındık): 20-25°C'de en az 2 hafta

g) İstenilen kontaminasyona ulaşıldığından emin olmak için numunelerin kontaminasyon seviyesinin kontrolü yapılmalıdır.

4.2.2.2. Düşük Nemli Gıdaların Yapay Kontaminasyonu

a) Düşük nemli gıdaların yapay kontaminasyonu için liyofilize edilmiş kültür kullanılır. Liyofilize edilmiş kültürün hazırlanması için belirlenen suş, seçici olmayan zenginleştirme besiyerinde optimal koşullarda inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında, santrifüj ile hücreler toplanır. Steril tamponlu su ile iki kez yıkanır. Santrifüj işlemi tekrarlanır, süpernatant boşaltılıp alttaki kısım steril %10 yağsız kuru süt ile tekrar süspansiyon haline getirilir. Bu süspansiyona liyofilizasyon işlemi uygulanır.

b) Liyofilizasyon işleminden sonra homojen ince bir toz oluşturmak için liyofilize edilmiş kültür ezilir. Kontaminasyon seviyesini belirlemek için seçici olmayan bir besiyerinde ve optimal koşullarda inkübe edilir.

c) 0,1 g hazırlanan liyofilize kültür ile 10 g'lık temiz gıda, steril bir kap içinde (örneğin plastik torba) karıştırılır. Karışımın homojen olmasına önem verilir ve bu karışımdan 10 katlı seyreltmeler yapılır.

d) Kirletilen gıda, o gıdaya uygun depolama sıcaklığında (tercihen normal saklama sıcaklığında) muhafaza edilir. Herhangi bir analizden önce mikrobiyal popülasyonun en az iki hafta boyunca gıdada dengeye gelmesine izin verilmelidir.

e) Uygun bir süre saklandıktan sonra inokülasyon seviyesinin kontrolü yapılabilir.

4.2.2.3. Kirletme Prosedürü Kullanılarak Gıdaların Yapay Kontaminasyonu

Seyreltilmiş kültüre stres koşulları uygulandıktan sonra stresli kültürün analiz edilecek örneğe eklenmesi prensibine dayanır.

Kirletme protokolü aşağıda gösterildiği gibi farklı adımlardan oluşmaktadır.

a) Kontamine edilecek suş seçici olmayan sıvı zenginleştirme besiyerine (örneğin Tryptone Soy Broth'a) inoküle edilir. Suş için optimal koşullar dikkate alınarak bir gece inkübasyona bırakılır.

b) İnkübasyon sonrası üreyen suş miktarının tespit edilmesi için on katlı seyreltmeler hazırlanır (örneğin 10^{-7} ve 10^{-8}). Yayma yöntemi ile 10^{-7} ve 10^{-8} tüplerden 0,1 mL seyreltme sıvısı iki ya da üç petri olarak Tryptic Soy Agar besiyeri yüzeyine yayılır. Petriler 24 saat 37°C'de veya mikroorganizmaya uygun koşullarda inkübe edilir. Her bir petrideki koloni sayılır ve bu veriler üzerinden ortalama mikroorganizma yükü belirlenir ve buradan istenilen dilüsyon seviyesine kadar seyreltim yapılır.

c) Mikroorganizmalara stres uygulamak için kirletme yapılacak örneğe uyumlu olacak şekilde aşağıdaki işlemlerden uygun olanı seçilir:

- Belirli bir sıcaklıkta su banyosunda bekletilerek ısıl işlem (örneğin 50°C'de 15 dk),
- Dondurma işlemi (örneğin -20°C'de 72 saat),

- Kimyasal işlem (örneğin yüksek tuz konsantrasyonunda veya düşük pH'da işlem),
- 4°C'de saklama (örneğin en az bir hafta boyunca)

d) Uygulanan stres ile mikroorganizmalardaki hasar seçici ve seçici olmayan besiyerinde sayım yapılarak değerlendirilir. Yeterli stres uygulandığında 0,5 Log_{10} kob/ml'den fazla fark beklenir.

e) Kirletme için kültür istenilen seviyede seyreltilir. Kalitatif yöntemler için bu seviye, metodun en düşük LOD seviyesi $eLOD_{50}$ (tahmini LOD) olmalıdır.

f) Bilinen hacimdeki suş, gıdaya pipetlenerek/püskürtülerek inoküle edilir. İnokülasyon, numunelerin tümüne karıştırılarak homojenize edilebileceği gibi, ayrı ayrı da yapılabilir. Belirli miktarda suş numunenin tümüne birden ya da numunelere tek tek inoküle edilebilir. İnokülum hacmi, su aktivitesini önemli ölçüde etkilememesi için mümkün olduğunca düşük olmalıdır. Genel olarak 25 g numune başına 0,25 ml kullanılır.

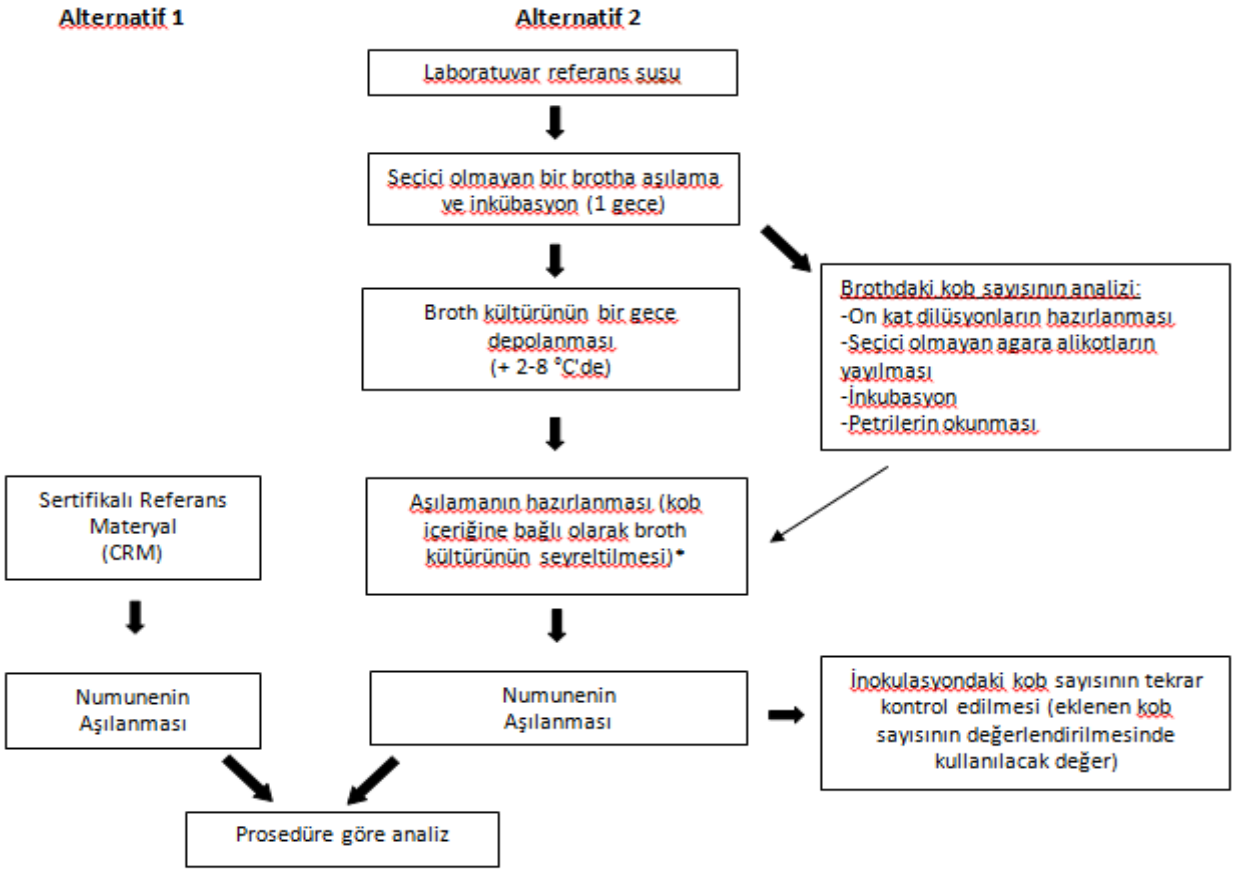
g) Homojenliği sağlamak için numune iyice karıştırılır.

Enterik çubuklar, bir gece boyunca broth besiyerinde yaklaşık olarak 10^8 ila 10^9 kob/mL üreyecektir. Bu nedenle, beş- on katlı seri seyreltme için yaklaşık 10^3 ila 10^4 kob/mL verilmeli ve 0.1 mL seyreltme içinse 10^2 - 10^3 kob verilmelidir.

Alternatif olarak, önceden sayılmış hücre süspansiyonunun uygun besiyerinde (örneğin %20 yağsız süt) dondurulmuş alikotları (-80°C'de) aşılama için kullanılabilir. Uygun bir besiyeri kullanarak standart petri sayımlarıyla koloni sayılarını doğrulayın.

Hedef mikroorganizmaya ek olarak, örnekler zorlu bir flora ile aşılanabilir (örneğin, hedef mikroorganizma ile etkileşime girebilen ve doğal olarak matrikste bulunanlar).

Şekil 1: Mikroorganizma ile numunelerin aşılanması için proses (mikroorganizma ile kirletme=spike)



*Son dilüsyon için, koloni sayısını ayarlarken, istenirse dondurarak (-80°C'de) inokülatı uygun alikotlarda saklamak için % 20 yağsız süt kullanılabilir.

4.2.3. Mc Farland İle Mikroorganizma Miktarı Tespiti:

Baryum klorür ile sülfürik asit karıştırılınca meydana gelen baryum sülfat, ortamda opak renkli bir bulanıklık oluşturmaktadır. Çok kompleks yapıda olmayan bir besiyerinde üretilen bakteriler de aynı renkte bir bulanıklık meydana getirmektedirler. Baryum klorür ile sülfürik asit oranlarının değiştirilmesiyle farklı bulanıklıkta çözeltiler oluşmakta olup, bunlara karşılık gelen bakteri sayısı da, bulanıklığın artması ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Ancak her mikroorganizmanın, standart bulanıklık tüplerine göre meydana getirdiği yoğunluktaki miktarları aynı değildir. Diğer bir ifade ile her bakteri No.1 McFarland tüpünde yaklaşık, 300 x 10^6 kob/mL kadar bulunmaz. McFarland 0,5 standardı yaklaşık olarak 1 mL'de 1,5 x 10^8 kob/mL hücre içeren homojen bir *Escherichia coli* süspansiyonuna karşılık gelir.

Tablo 1: McFarland tüplerinde yoğunluk tayini

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
%1 H_2SO_4	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
%1 $BaCl_2$	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Bakteri hücre Sayısı milyon/ml	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000

Bulanıklığı veren McFarland çözeltileri ile bakteri yoğunluğunun kıyaslanmasında besiyerinden gelecek etkiyi kaldırmak amacı ile bakteri süspansiyonu santrifüj edilip 1-3 kez steril filtreden geçirilmiş fizyolojik tuzlu su ile yıkanır ve orijinal bakteri süspansiyonu hacmine getirilerek spektrofotometrede (545 veya 650 nm) ya da çıplak göz ile kıyaslaması yapılır.

4.2.4. Örnek Çalışma

4.2.4.1. Kalitatif Metotlarda $eLOD_{50}$ Düzeyinin Belirlenmesi

Test porsiyonlarının inoküle edilmesi sırasında aynı anda inokulumun kontaminasyon seviyesini belirlemek için dilüsyonlardan seçici olmayan agara ekim yapılarak ya da MPN yöntemi ile ISO 7218'e göre sayım yapılır. Buna göre çalışmalarda kullanılacak olan inokülasyon seviyeleri hazırlanırken;

- **Yüksek seviye**, beklenen LOD_{50} değerinin 9 katı ($9 \times LOD_{50}$),

(Protokol 1 için, 1 test porsiyonu)

- **Orta seviye**, beklenen seviyenin 3 katı ($3 \times LOD_{50}$),

(Protokol 1 için 4 test porsiyonu, Protokol 2 için 3 test porsiyonu

- **Düşük seviye**, beklenen değeri LOD_{50} ($1 \times LOD_{50}$),

(Protokol 1 için 4 test porsiyonu, Protokol 2 için 5 test porsiyonu olacak şekilde hazırlanmalıdır.

Örneğin, ana stoğun yükü 6 x 10^8 kob/mL olarak bulunmuşsa, bu ana stoğun 10^{-7} dilüsyonunun ml'sinde 60 kob/mL olacağı kabul edilir ve bu dilüsyona "**Dilüsyon A**" adı verilerek, çalışmada kullanılır. Ancak ana stok hazırlandıktan sonraki, bu yeni gecelik kültürün miktarı bilinmediğinden, $eLOD_{50}$ tespitinde kullanılacak kontaminasyon seviyelerini bulmak için, çok sayıda dilüsyonu hazırlanır. Mikroorganizma yükü planlanan miktar doğrultusunda, LOD seviyesine kadar, aşağıda belirtilen şekilde 1:3 lük seyreltmeleri yapılır ve dilüsyonların her biri isimlendirilir. Daha sonra bu dilüsyonlardan seçici olmayan bir besiyerine ekim yapılarak elde edilen koloni sayıları tespit edilir.

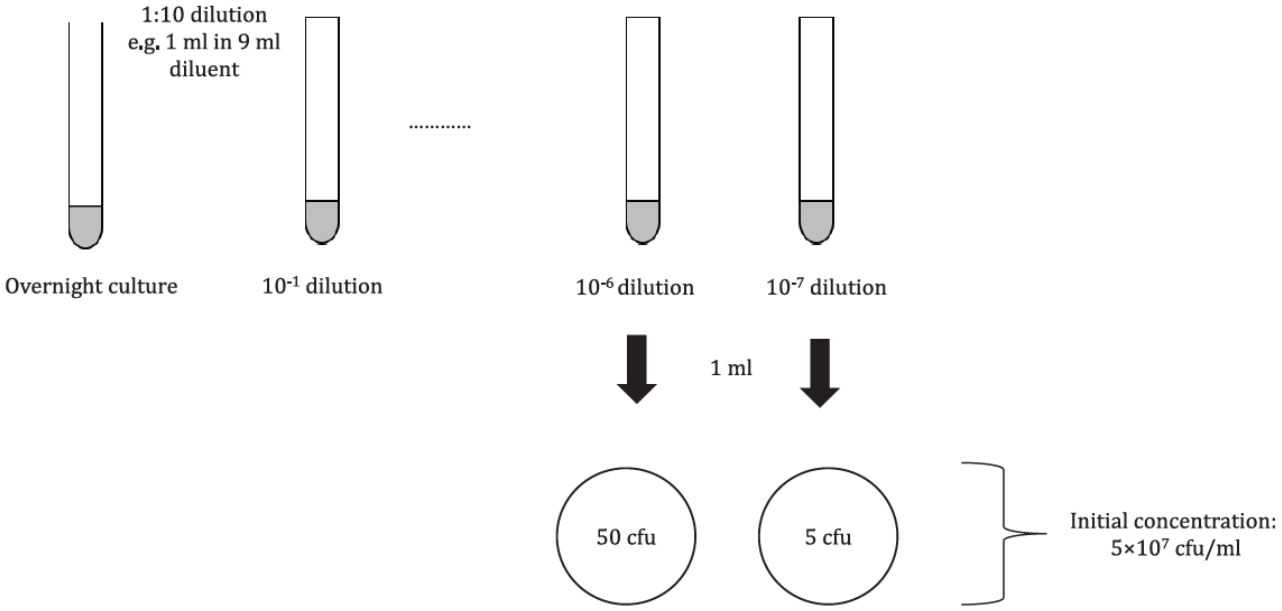
- Ana stoğun 10^{-7} dilüsyonundan 1 ml alınır, **Dilüsyon A** (60 kob/ml),
- Dilüsyon A dan 1 ml alıp, 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon B** (20 kob/ml),
- Dilüsyon B den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon C** (6,67 kob /ml),
- Dilüsyon C den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon D** (2,22 kob /ml),
- Dilüsyon D den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon E** (0,74 kob /ml),
- Dilüsyon E den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon F** (0,25 kob /ml) olması planlanır.

Tablo 2: Hazırlanan Dilüsyonlar ve Elde Edilen Sonuçlar

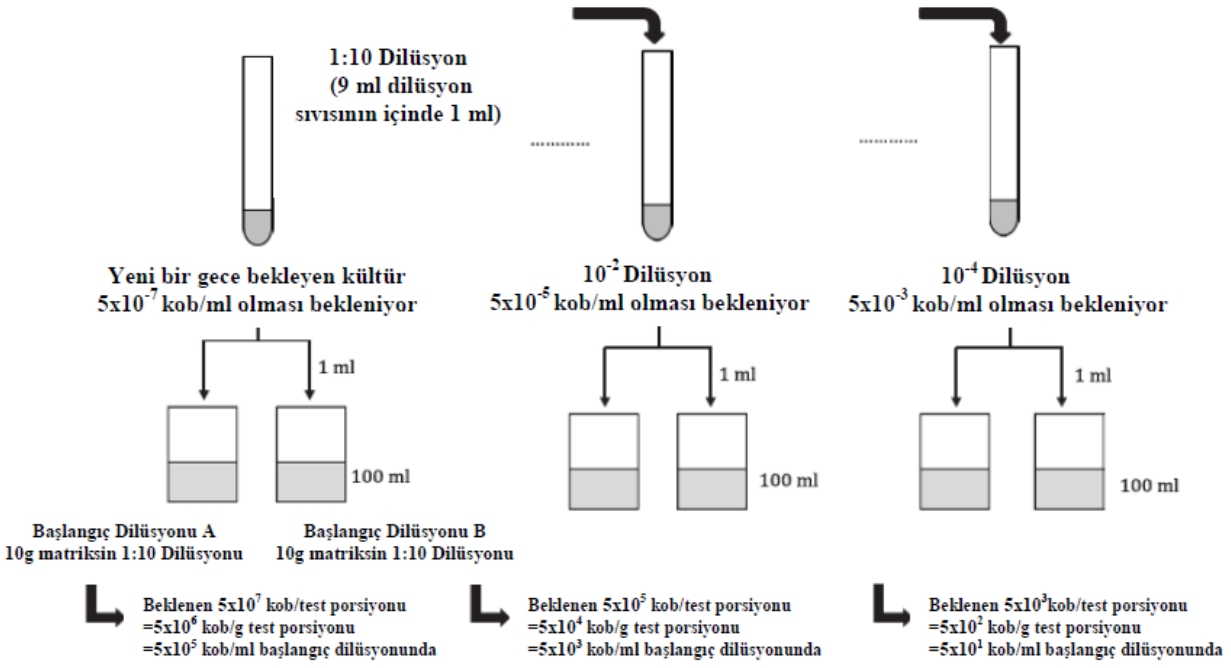
Dilüsyon Adı	Planlanan Koloni Sayısı	Elde Edilen Koloni Sayısı
A	60kob/ml	54 kob/ml
B	20 kob/ml	18 kob/ml
C	6.67 kob/ml	6 kob/ml
D	2,22 kob/ml	2 kob/ml
E	0,74 kob/ml	Üreme yok
F	0,25 kob/ml	Üreme yok

*Kalitatif metotlar için örnek bir çalışma hazırlanması Mikrobiyoloji Verifikasyon Rehberi 5.4.1'de açıklanmıştır.

4.2.4.2. Kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) için, bir matriksin yapay kontaminasyonunda kullanılacak olan inokulum seviyesinin ön belirlenmesi (*ISO 16140-3, Ek:D).

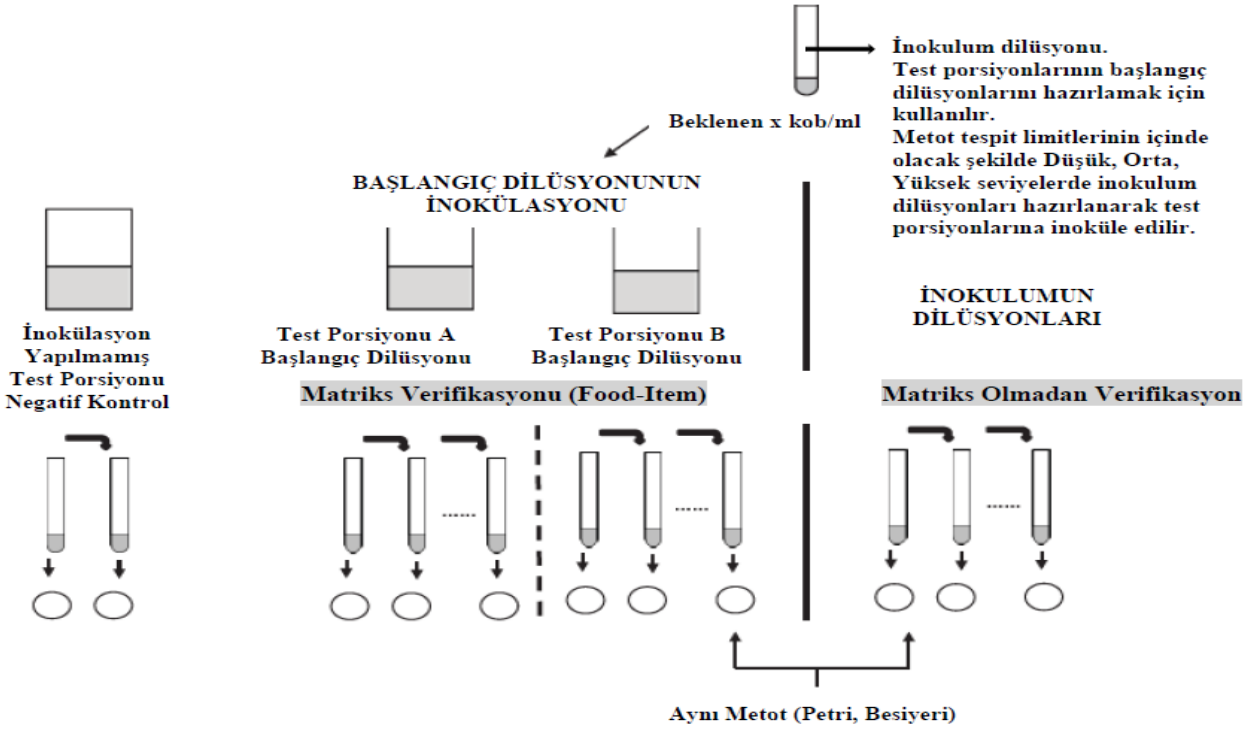


***Şekil 3.** Kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) için, bir matrikse ait test porsiyonlarının inokülasyonu (*ISO 16140-3, Ek:D).



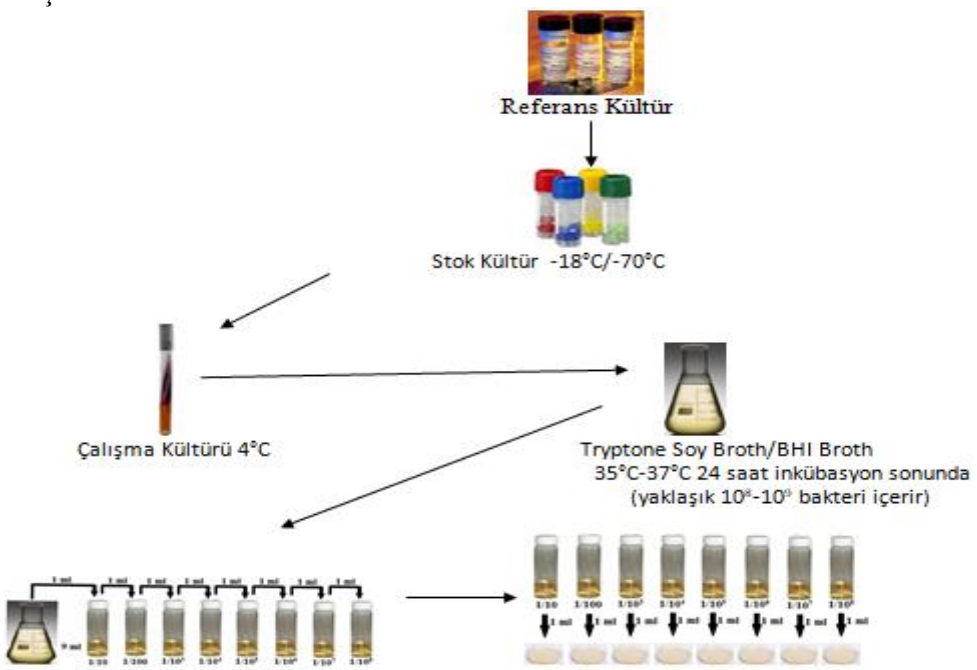
4.2.4.2.1. Bir matriks için, yapay kontaminasyon kullanılarak yapılan kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) (*ISO 16140-3, Ek:D).

***Şekil 4.** Bir matriks için, yapay kontaminasyon kullanılarak yapılan kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) (*ISO 16140-3, Ek:D).



***** Kantitatif metotlar için örnek çalışma Mikrobiyoloji Verifikasyon Rehberi 6.2.2'de açıklanmıştır.

Referans Kültürden Stok Kültür ve Çalışma Kültürü Hazırlama talimatına göre stok kültür ve çalışma kültürü oluşturulur.



MRD ile dilüsyon hazırlama, PCA/TSA'ya inokulasyon, 35°C 24 saat inkübasyon

35-37°C de 24 saat inkübasyonun sonunda petrilerde sayım yapılır. Örneğin ;

10^{-6} lık dilüsyonda paralel petrilerde 130 139 koloni sayılırsa = 1.3×10^8

10^{-7} lik dilüsyonda paralel petrilerde 15 / 19 koloni sayılırsa = 1.7×10^8

10^{-8} lik dilüsyonda paralel petrilerde 1 /3 koloni sayılırsa = 2×10^8 olarak hesaplanır.

10^{-8} lik dilüsyonda 15 den az koloni sayıldığı için hesaplamaya alınmaz.

$$N = \frac{\Sigma C}{V.(n1+0{,}1 \times n2).\ d}$$

∑c= Bütün petrilerde sayılan kolonilerin toplamı

V= Her plağa bırakılan inokülum hacmi, mL

n1= ilk dilüsyonda sayılan petri sayısı

n2= ikinci dilüsyonda sayılan petri sayısı

d= ilk süspansiyona ait dilüsyon faktörü (10^{-n})

$$N = \frac{130+139+15+19}{1.(2+0{,}1 \times 2).\ 10^{-6}} = 1.4 \times 10^8$$

Buradan ANA STOĞUN yük miktarı 1.4×10^8 kob/mL olarak tespit edilir.

5. KAYNAKLAR (REFERANSLAR)

- Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara
- TS EN ISO 7218 A1:D2 Mikrobiyolojik Analizler İçin Genel Şartlar ve Rehber
- TS EN ISO 16140-2:2016 Gıda zinciri mikrobiyolojisi- Doğrulama yöntemi- Bölüm 2: Alternatif (patentli) yöntemlerin eferans yöntemlere karşı doğrulaması için protokol
- TS EN ISO ISO 16140-3:2021 Gida Zinciri Mikrobiyolojisi-Metot Validasyonu- Bölüm 3: Referans Metotların ve Doğrulanmış Alternatif Metotların Tek Bir Laboratuvarda Doğrulanması İçin Protokol