

$$r = \frac{1}{2} * a * b$$

FEN BİLİMLERİ ve MATEMATİK ALANINDA AKADEMİK ARAŞTIRMA ve DERLEMELER

EDİTÖR

Dr. Öğr. Üyesi Mine SULAK

$$r = \frac{ab}{a+b+c}$$



**FEN BİLİMLERİ ve
MATEMATİK ALANINDA
AKADEMİK ARAŞTIRMA ve
DERLEMELER**

Editör

Dr. Öğr. Üyesi Mine SULAK



Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Akademik Araştırma ve Derlemeler,
Editör:Dr. Öğr. Üyesi Mine SULAK

Genel Yayın Yönetmeni: Berkan Balpetek

Kapak ve Sayfa Tasarımı: Duvar Design

Baskı: Mayıs 2021

Yayıncı Sertifika No: 49837

ISBN: 978-625-7680-62-2

© Duvar Yayınları

853 Sokak No:13 P.10 Kemeraltı-Konak/İzmir

Tel: 0 232 484 88 68

www.duvar yayinlari.com

duvarkitabevi@gmail.com

Baskı ve Cilt: Vadi Grafik Tasarım ve Reklamcılık Ltd. Şti.

İvedik Org. San. 1420. Cad. No: 58/1

Yenimahalle/ANKARA

Tel: 0 312 395 85 71

Sertifika No: 47479

İÇİNDEKİLER

1.Bölüm	5
Postmortem Örneklerin Analize Hazırlanması ve Analizi	
<i>Gözde Karabulut</i>	5
<i>Elif Pınar Başarır</i>	5
2:Bölüm	19
Adli Toksikolojiye Giriş	
<i>Gözde Karabulut</i>	
<i>Elif Pınar Başarır</i>	
3:Bölüm	29
Sularda <i>Salmonella</i> Spp. Aranması	
<i>Pınar Mursaloğlu KAYNAR</i>	

● 1.Bölüm ●

POSTMORTEM ÖRNEKLERİN ANALİZE HAZIRLANMASI ve ANALİZİ

*Araş. Gör. Dr. Gözde Karabulut¹
Elif Pınar Başarır²*

1 Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 43100, Kütahya, TÜRKİYE, Sorumlu Yazar

2 Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Programı, 06100, Ankara, TÜRKİYE

1. POSTMORTEM DÖNEMDE OTOLİZ

Yaşam boyunca, ökaryotik hücrelerin membran geçirgenliği başta olmak üzere hayatta kalması için oksidatif fosforilasyon ve adenosin trifosfat (ATP) gerekir. Ölümden sonra, vücutta mevcut olan oksijen tükenir ve hücreler anaerobik hale gelir. Sonuçta ATP üretiminin fermentasyonel bir yolunun kullanılması, adenosin difosfatın (ADP) ve laktik asidin üretilmesi ile sonuçlanır. Bu fermentasyon yolu, hücrede bulunan zarların seçici geçirgenliğini muhafaza etmek için yeterli enerji sağlamaz. Bu da zar kanallarında selektiviteden yoksunluğa neden olur ve böylelikle hücre içerisindeki lizozomal enzimler, sitoplazmaya salınır. Fermentatif yolun bir yan ürünü, hücre içi ortamın laktik asidin artışıyla ilgili olarak hızla asidik hale gelmesidir. pH'daki bu değişiklik, membranların stabilitesini etkiler, hidrolitik enzimleri aktive eder ve otoliz meydana gelir. Otolizin bir diğer sonucu da, yaşamsal öneme sahip birçok enzimin aktivitelerini yitirmesidir. Kalp, böbrek ve karaciğerde birçok enzim grubu otolizin başlangıcında 24-36 saat içinde aktivitelerini hızla kaybederler. Bu süreç hücresel yıkıma ve anaerobik ortamın yaratılmasına, ayrışma ve çürümeye yol açar.

Ölümden sonra, ilaç metabolizmasından sorumlu bazı enzimler bir süre çalışmaya devam eder ve böylece ilaçların konsantrasyonunda değişiklikler meydana gelebilmektedir. Enzimler sayesinde meydana gelen otoliz ile birlikte hücre parçalanır. Böylece hücre içindeki eksojen materyalin de salınımı gerçekleşir. Vücutta bulunan bakteriler, bazı özel ilaçları ve/veya metabolitleri substrat olarak kullanarak, postmortem dönemde toksikoloji sonuçları üzerinde önemli bir etkisi olabilecek diğer bir faktör, ilaçların zaman içinde bir konsantrasyon gradyanı boyunca yeniden dağılımıdır (Skopp, 2010).

Postmortem toksikoloji, kadavralardan ya ölümden kısa bir süre sonra ya da parçalanmış ya da çıkarılan cisimlerden ve anı zamanda formalinle sabitlenmiş örneklerden alınan doku ve sıvıların analizini içerir.

Vaka geçmişi bilgisi çok önemlidir. Ölümü veya belirli ajanların belirtilen kullanımını çevreleyen koşullar, rutin protokollere dahil edilmeyen belirli ilaç veya zehir sınıflarının olası varlığını kontrol etmek için rutin olmayan prosedürlerin de ilave edilerek kullanılmasını gerektirebilir. Bu tür maddelere örnek olarak, digoksin ve diğer kardiyak glikositler, insülin, kuaterner amonyum kas gevşetici maddeler, suda çözünür veya çok yüksek polar bileşikler [örneğin, p-hidroksibütirat (GHB)] ve ağır metallerin tuzları verilebilir. Bu tür maddelere cinayet veya suç unsuru taşıyan zehirlenmelerde veya terapötik tedavileri takiben karşılaşılmıştır. Dolayısıyla, uygun numune seçimi ve korunması konusunda bilgi sahibi olunmalıdır. Belirli bir ilacın veya vücutun durumunun bir faktör olduğu durumlar da belirli örnekler özellikle uygun olabilir. İlacın ölüm anında bulunduğu yerden

postmortem yeniden dağıtılması ve postmortem ilaç stabilitesi veya dönüşümü gibi sorunlar hem numune seçiminde hem de bulguların sonraki yorumlanmasında kilit rol oynamaktadır (Drummer, 2004; Skopp, 2004).

2.BAKTERİYEL İNVAZYON

Yaşam süresince, ağız ve dış ortamla temas halindeki vücut boşlukları, gastrointestinal sistem, akciğerler, enfeksiyonun olduğu bölgeler dışındaki insan vücudunun iç kısmı, steril bir ortama sahiptir. Bununla birlikte, ölümden sonra vücutta bakteriyel yayılma meydana gelmektedir. Vücuda dış kaynaklardan gelen bakteriler de vücudu istila edebilirler. Cesedin açık alanda olması, böcekler ya da diğer hayvanların müdahalesi sonucunda oluşan transfer veya toprak florasından da bulaş olabilir. Çürümenin gözle görülebilen ilk bulguları arasında, batin sağ alt kadrının yeşil renk alması ve yüzeysel damarağında kırmızı ve yeşilimsi renkte mermerleşme yer almaktadır. Diğer çürüme belirtileri deride kabarcıklaşma ve kayma, çürüme gazı oluşumuna bağlı vücut bölgelerinde şişmedir. Çürüme gazları nedeniyle oluşan basınç birikmesi, kanlı çürüme sıvısını ağız ve burun boşluklarından dışarıya çıkmasına neden olur. Bir süre sonra, cildin kırmızı-yeşil rengi siyahlaşma, böcek aktivitesinde artma, organlarda çürümeye bağlı doku formasyonda bozulma ve ardından iskeletleşme görülür. Çürüme aşaması sırasında, kan ve dokuların pH'ı alkaliye dönüşmektedir (Robertson&Drummer, 1995).

3.POSTMORTEM DÖNEMDE ADLİ TOKSİKOLOJİ

Doğal olmayan, ani, şiddetli veya beklenmedik ölümlerde, araştırmacı genellikle otopsi materyalinde yabancı bileşiklerin bulunup bulunmadığına dair kanıtlar aramaktadır. Otopsi sırasında kişinin zehirlenip zehirlenmediğini, eğer zehirlendiyse kullanılan maddenin türü, maddenin yan etkileri ve bu etkilere göre otopsi bulgularının yorumlanması gibi sorular yanıtlanmaya çalışılmaktadır. Kan, idrar veya doku içerisinde bulunan bir ilacın veya zehrin tarama testinden sonra belirlenmesi halinde, örnekteki madde miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Böylece ilacın veya zehrin, vücut içerisinde kantitatif analiz yöntemleri ile toksik veya ölümcül doz aralığında olup olmadığı saptanır (Drummer, 2007).

Vücut sıvılarında ve dokularında bir analit tespit edildiğinde sorular ortaya çıkar. Bu sorular, analitin konsantrasyonu, ölüm anındaki konsantrasyonunu yansıtır mı, yoksa ölüm zamanındakinden daha mı yüksek yoksa daha mı düşük gibidir. İlaç konsantrasyonunu değiştirebilen koşullar, insan enzimleri, bakteriyel enzimler, pH, sıcaklık ve hidrolizden kaynaklanan değişiklikleri içerir. Dolayısıyla, örnekte bulunan ilaç seviyeleri kasıtlı veya başka bir şekilde aşırı dozu mu yoksa terapötik bir seviyeyi mi temsil ettiği ve aynı zamanda tolerans ve/veya

farmakogenomik sorunların olup olmadığı önem arz etmektedir. Ölüm ile bedenin bulunması arasındaki zaman aralığı hakkında bilgi veya kişinin ölümden önceki terapötik tedavilerine ilişkin bilgiler genellikle mevcut değildir. İlaç seviyelerini yorumlarken dikkate alınması gereken ek bir faktör, merhumun ölümden önce önemli miktarlarda yedek sıvılar almış olduğu durumdur. Bununla birlikte, bu basit bir seyreltme etkisi değildir çünkü sıvının infüzyonu, dokular ve kan arasında yeniden yeni denge kurma çabalarına yol açar.

4. DOKU VE SIVI ÖRNEKLERİ

a) Kan

Ölüm sonrası kan, ölümden sonra hızlı bir şekilde elde edilse bile, hücre zarı potansiyelinin kaybı ve hemolizin başlaması gibi ölüm anında meydana gelen süreçlerden etkilenmektedir. Diğer ölüm sonrası süreçler erken başlar ve genellikle ölüm sonrası aralığın artması ile artar. Bu nedenle, ölüm sonrası kanın herhangi bir numunesi fizyolojik veya toksikolojik olarak klinik numuneye eşdeğer değildir. Ölüm sonrası yeniden dağıtım fenomeni nedeniyle kan örnekleme için yerlerin doğru seçimi çok önemlidir. Bu, ilacın ölüm anında bulunduğu yerden vücuttaki başka bir yere doğru postmortem hareketi olarak tanımlanır. Bu hareketi gösteren bazı temel mekanizmalar vardır (P'elissier-Alicot et al., 2003).

İlk mekanizma, ilacın hücrelerin içinden çevre kana difüzyonudur. Bu, ölüm anında meydana gelen ve genellikle hücrelerden hem endojen hem de eksojen maddelerin düzensiz akışına neden olan hücre zarının bütünlüğünün kaybolmasıyla başlar. Bu mekanizma nedeniyle ölüm sonrası kan elektrolit ve glikoz tayininde kullanılmaz.

İkinci bir mekanizma, ilacın belirli doku depolarından salınması ve ardından kalp odalarındaki kana yönelik ilaç konsantrasyonu gradyanlarının oluşturulmasıdır. Akciğer dokusunda ölümden önce ilaç birikimi özellikle önemlidir ve bu, birçok ilaç için, özellikle lipide çözünebilenler için bir depo görevi görür. İlaçların akciğer depolarından ölümden sonra salınması, ilacın pulmoner damarlar yoluyla kalp odalarına taşınmasıyla sonuçlanır. Bu tür postmortem difüzyon genellikle yüksek hacimde dağılım gösteren ($\geq 3 \text{ L / kg}$) ve yüksek akciğer seviyelerine ulaşan ilaçlarda meydana gelir (Hilberg et al., 1999a). İlacın doku depolarından salınmasının, pH değişiklikleri ve denatürasyon sonucu spesifik olmayan ilaç-makromoleküler bağlanmanın bozulmasını içerdiğine inanılmaktadır. Kalp dokusunda yoğunlaşan ilaçlar doğrudan kalp kanına salınır ve odalardan numune alınması ölüm anında kanda yanlış ilaç konsantrasyonu verir. Bununla birlikte, yüksek düzeyde lipofilik ilaçların kandan yağ dokusuna geçebileceği bilinmektedir.

Üçüncü bir mekanizma, ilacın gastrointestinal ve hepatik sistemlerden uzağa difüzyonudur ve sonuçta kalp kanına girer. Bu mekanizma, özellikle dengede olmayan aşamada ölüm meydana geldiğinde ilgilidir; yani midede ve bağırsaklarda hala önemli miktarda ilaç mevcuttur. Bu nedenle, örneğin, gastrointestinal sistemden gelen etanol, kalp zarına ve ayrıca göğüs sıvılarına yeniden dağılıbilir (Plueckhahn, 1967). Bu nedenle, analiz için kan alındığında femoral damar gibi periferik bölgelerden bir örnek alınması önemlidir, çünkü femoral kan üzerindeki miktar tayini, ölüm öncesi konsantrasyonunun en güvenilir ölçüsü olarak kabul edilir (Dalpe-Scott et al., 1995; Hilberg et al., 1999b).

Çürüme sırasında gazların üretimi ve ortaya çıkan basınçlar, farklı bölgelerden gelen kanın karışmasıyla sonuçlanabilir (Prouty & Anderson, 1990). Ölüm sonrası kan verilerinin yorumlanmasını zorlaştıran diğer faktörler arasında hemoliz derecesi veya kan matrisindeki diğer değişiklikler bulunur. Bir kan pıhtısındaki ilaç konsantrasyonu, pıhtılaşma anında kandaki konsantrasyonu yansıtabilir, bu oluşumun yaralanma veya kafa travması anında meydana geldiği varsayılabilir. Bu nedenle, kanın plazma veya serumu ayrıldığı klinik toksikolojinin aksine, postmortem toksikolojide tam kan analizi tercih edilir.

b) İdrar

Ölüm, ilacın mesaneye atılmasını engelleyecek kadar hızlı olmadıkça, idrar, farklı ilaç sınıfları ve bunların metabolitlerinin başlangıç taraması için yararlıdır. İdrarda ilaç bulmak, önceki kullanımı gösterir, ancak ölümden önce kandaki herhangi bir bozulma veya ilaç konsantrasyonunu belirtmek için tek başına kullanılamaz. İdrar analizi, kan analizinden daha basittir; örneğin idrar, bakteriyel büyümeyi hemen desteklemez (Drummer&Gerostamoulos, 2002).

c) Vitroz Sıvı Ve Beyin Omurilik Sıvısı

Vitroz sıvı potasyum düzeylerinin belirlenmesinin, postmortem aralığı belirlemek için yararlı bir yöntem olarak kullanılabilir ancak; bu yöntem yalnızca be-densel çürüme başlamadığında kullanılmalıdır. Çünkü ölüm ve numune alma arasındaki süre arttıkça potasyum seviyeleri yükselir (Stephens & Richards, 1987).

Vitroz sıvı, birçok ilaç ve alkolün varlığını analiz etmek için kullanılmıştır (Hepler & Isenschmid, 1998; Jones, 1998). Vitroz sıvı, kan ve dokulara kıyasla çok az protein içerir. Yalnızca kandaki serbest ilaç vitroz sıvıya girer ve çoğu ilaç kandaki proteinlere ve diğer makromoleküllere en azından önemli derecede bağlanma sergilediğinden, vitroz ilaç seviyeleri femoral kanda olduğundan daha düşüktür. Vitroz sıvı korumalı bir alandır; genellikle, çok az bakteri kontaminasyonu ve dolayısıyla az fermentasyon vardır. Bu nedenle, dokulardaki alkol varlığı

ğının ölümden önce tüketimden mi kaynaklandığını yoksa ölüm sonrası feryantasyonun bir sonucu olarak mı oluştuğunu belirlemek için faydalı olabilir.

Pek çok ilacın beyin omurilik sıvısına girdiği bilinmektedir. Kan bulunmaması durumunda beyin omurilik sıvısının ilaçların kalitatif tayininde faydalı olduğu bulunmuştur. Beyin omurilik sıvısı analizi, aynı zamanda diğer sıvılara göre daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip olması nedeniyle eroin kullanımını da ortaya çıkarabilir (Jenkins & Lavins, 1998; Engelhart & Jenkins, 2007).

d) Mide İçeriği

Tüm mide içeriği analiz için alınmalı ve toplam ağırlık kayıt edilmelidir. Sindirilmemiş tabletler veya diğer ilaçlar ayrı ayrı analiz edilmelidir. Herhangi bir sindirilmemiş malzeme de dahil olmak üzere mide içeriğinde bulunan toplam ilaç miktarı adli açıdan önemlidir çünkü ölüm şeklini yorumlamada yararlı olabilir (yani intihara yönelik aşırı dozun göstergesi olabilir). Mide içeriği normalde asidik olduğundan, mide içeriğindeki eser miktarlarda bazik ilaçların saptanması mideye geri difüzyona bağlı olabileceği gibi yutmanın ardından kalan ilacı da gösterebilir.

e) Beyin

Beyin, anestetikler ve hidrokarbonlar gibi lipofilik ilaçlar için iyi bir depodur, oysa birçok polar bileşik kan-beyin bariyerini önemli miktarlarda geçemez. Psikotrop ilaçlar beyne kolayca girer ve beyindeki seviyeleri ölüm şeklini belirlemede faydalıdır. Beyin ayrıca kan alkolü için yedek bir örnek olarak kullanılır. Denge durumunda, beyindeki alkol / kandaki alkol oranı yaklaşık 0.85'tir. Beyin kokain seviyeleri, kokaine bağlı ölümleri değerlendirmek için faydalıdır. Maruziyetten birkaç dakika ila yaklaşık 3 saat sonra, kokain için beyin / kan kokain oranı yaklaşık 4 ila 10'dur. Maruziyetten sonraki 3 ila 6 saat içinde ölüm vakalarında beyin / kan kokain oranı yaklaşık 0,4 ila 0,8'dir. Ancak bu oranlar, kronik olarak kokain kullanan kişilerde farklı olabilir (Bertol et al., 2008).

f) Karaciğer Ve Safra

Karaciğer, çoğu ana ilacı ve metabolitleri yoğunlaştırır ancak etanol bu durumun önemli bir istisnasıdır. Terapötik, toksik ve ölümcül vakalardaki karaciğer ilaç seviyelerinin aralığı hakkında kapsamlı veri mevcuttur. Safra, birçok ilaç ve metabolitleri, özellikle opioidler ve benzodiazepinler için iyi bir kaynaktır ve diğer dokularda bulunmayıp sadece safra kesesinde depolanması nedeniyle, ilaçların veya metabolitlerin tespit edilebildiği tek örnek olabilir. Son ilaç alımı ile ölüm arasında uzun bir aralığın geçtiği durumlarda safra faydalı olabilir (Skopp, 2004; Dinis-Oliveira, 2010; Hepler & Isenschmid, 1998)

g) Akciğer, Dalak, Böbrek Ve Deri

Akciğer dokusunun analizi, gazlar (karbon monoksit dışında), anestetikler ve çözücüler gibi uçucu maddeleri içeren durumlarda yararlıdır. Dalak kırmızı kan hücrelerini yoğunlaştırdığı için, siyanür veya karbon monoksit bağli hemoglobini belirlemede faydalı olabilir. Ölüm öncesi toksik maruziyetten türetilen siyanür, ileri derecede çürüme ile hızlı bir şekilde kaybedilebildiğinden, dalak, toksikolojik olarak önemli seviyelerde siyanür bulunabilen tek organ olabilir. Rutin bir kan örneğinin bulunmadığı veya kullanılamayacağı durumlarda dalak, ölümden önce karbon monoksit maruz kalmayı tahmin etmek için dikkatli bir şekilde kullanılabilir. Böbrek dokusunun analizi, ağır metalleri tespit etmek için faydalıdır. Yanmamış derinin analizi, kundaklamayla ilgili durumlarda hızlandırıcıların kullanımını tespit etmek için faydalı olabilir (Skopp, 2004; Dinis-Oliveira, 2010; Hepler & Isenschmid, 1998).

h) Kemik, Dişler, Tırnaklar Ve Saç

Pek çok ilacın ve ağır metalin kemik, diş, tırnak ve saçla birleştiği bilinmektedir. Ancak bu dokular, ani ölüm durumunda ilaç veya toksik maddeler içermeyebilir, sadece kronik olarak alınan dozları ifade ederler. Dişler, yanmış vücutlarda analiz için faydalıdır. Saç, bölümlere ayrılabilir ve ilaç kullanımının zamanlamasıyla ilgili bir model oluşturabilmek için ayrı ayrı analiz edilebilir. Saç ayda yaklaşık 1 cm uzadığından, ilaç kullanımının ne zaman kesildiği tahmin edilebilir (Dalpe-Scott et al., 1995).

5. ÖRNEK TOPLAMA VE SAKLAMA

Tüm örnekler için, örneklerin yeterli miktarlarda ve uygun şekilde toplanması ile koruyucuların ve saklama kaplarının (örneğin, cam, plastik, naylon, folyo) uygun saklama sıcaklığı ile birlikte kullanılması esastır (Skopp, 2004). Sıvılar için cam kaplar ile doku ve mide içeriği için cam veya plastik kaplar kullanılması tavsiye edilir. Koruyucu olarak en az % 1 - 2 sodyum florür içeren tüplerde kan alınmalı ve 0 - 4°C'de saklanmalıdır. Bu, alkol üreten veya alkol içeren örneklerde alkol konsantrasyonunu azaltabilen bakteriyel büyümeyi ve enzim aktivitesini inhibe edecektir. Koruyucu olmadan, oda sıcaklığında bakteriyel etki olasıdır ve bakteriler tarafından alkol üretimi 0,10 ila 0,15 g/dL konsantrasyonlara kadar ulaşabilir. Sodyum florür ayrıca kokain ve diğer ester içeren maddeleri metabolize edebilen kolinesteraz aktivitesini de inhibe edecektir. Uzun süre saklanan kan örnekleri dondurulabilir. Dokular kısa süreler için 0 ila 4°C'de saklanabilir. Çoğu ilaç bu sıcaklık aralığında stabildir, ancak bazı ilaçlar (örneğin kokain) değişkendir. Dokular aynı zamanda dondurulabilir. Bununla birlikte, işlem den önce do-

kuların dondurulması ve çözündürülmesi, hücreleri parçalayabileceği ve ilaç içeren sıvı kaybına neden olabileceği için tavsiye edilmez. Kısa veya uzun süreli dondurmanın kullanıldığı yerlerde, dondurulmuş dokular hızla kesilmeli ve tartılmalıdır. Vitroz sıvı ve idrar 0 ila 4°C’de saklanabilir veya dondurulabilir. Oda sıcaklığında 24 saat depolanan mekonyum, özellikle kokain ve kannabinoidler olmak üzere ilaç kaybını gösterir. Mekonyum, ilaç konsantrasyonu kaybı olmaksızın dokuz ay boyunca -15°C’de saklanabilir (Ostrea, 2001). Alkol dışındaki uçucu maddeler için analiz edilecek örnekler dondurularak hava geçirmez şekilde kapatılmış kaplarda saklanmalıdır. Diğer tüm biyolojik örnekler kapalı ve dondurulmuş olarak saklanmalıdır.

6. ANALİTİK TEKNİKLER

Immunoassayler ve kromatografik prosedürler tarama teknikleridir. Doğrulama için standart teknik, genellikle gaz kromatografisi (GC) veya sıvı kromatografisi (LC) ile birleştirilmiş kütle spektrometrisidir.

Sıvı kromatografisi, kas gevşetici maddeler için gereklidir. Uzun zamandır asidik barbitüratlar için kullanılmaktadır ve benzodiazepinlerin analizi için birçok avantajı vardır. Temel ilaçların rutin analizlerine giderek daha fazla uygulanmaktadır. Yüksek hızlı HPLC, çok kısa bir çalışma süresi ile etkili ve güvenilir sonuçlar elde etme de sağladığı faydalar ile kullanımı artmaktadır.

Bazı metal tuzları (yani, talyum veya arsenik) ile öldürücü zehirlenmeye hala rastlanmaktadır. Metallerin kütle aralığı üzerinde çok yüksek hassasiyet sağlayan, endüktif olarak birleştirilmiş plazma kütle spektrometresi analiz için kullanılmaktadır (Marin et al., 2008).

Siyanür, asidik koşullar altında biyolojik matristen serbest bırakıldıktan sonra bir nitrojen-fosfor detektörü kullanılarak gaz kromatografisi ile uygun bir şekilde belirlenebilir (Gambaro et al., 2007).

7. BULGULARIN YORUMLANMASI

Ölüm sonrası bulguların yorumlanması giderek daha karmaşık hale gelmektedir. Bunun nedeni, postmortem yeniden dağılım, metabolik enzimlerdeki genetik tabanlı polimorfik varyasyonlardan kaynaklanan bireysel metabolizma hızlarındaki önemli farklılıklar, birden fazla ilacın aynı anda kullanımından kaynaklanan ilaç etkileşimleridir.

8. POSTMORTEM YENİDEN DAĞILIM

Postmortem dönemde ilaç konsantrasyonlarında, en önemli değişikliklere yol açan etkenlerden biri yeniden dağılımdır. Yeniden dağılmaya yatkın olan ilaçlar,

otolizle birlikte yüksek bir dağılım hacmine sahiptirler. Yeniden dağılımı etkileyen faktörler; ilacın proteine bağlanma eğilimi ve lipofilitesi, cesedin bulunduğu pozisyon ve çevresel şartlardır. Genel olarak, kardiyak kanın periferik kandan daha yüksek bir ilaç konsantrasyonuna sahip olduğu gözlenmiştir, ancak değişikliğin büyüklüğü ilacın fizyokimyasal özelliklerine, dağılım hacmine, ölümün denge altında mı yoksa dengede olmayan koşullarda mı meydana geldiğine organ konsantrasyonları ve postmortem aralığın uzunluğuna bağlıdır. Kardiyak / periferik orandaki varyasyonlar, belirli bir ilaç için bile çok önemli olabilir (Dalpe-Scott et al., 1995). Her zaman bir periferik kan örneğinin dahil edilmesinin genel önemi not edilmiştir. Periferik kan mevcut değilse, yalnızca kardiyak kana dayalı bulguların yorumlanması genellikle tehlikelidir ve bu gibi durumlarda, hatalı bir sonuç olasılığını en aza indirmek için özellikle karaciğer olmak üzere doku konsantrasyonları gereklidir. Karaciğer, akciğer, mide ve kalpten yüksek seviyelerde ilaç komşu bölgelere salındığından ölüm sonrası yeniden dağılım organlar arasında da meydana gelebilir (Moriya & Hashimoto, 1999). Organlarda travmatik yaralanma olduğunda (yani midede, bağırsaklarda, karaciğerde vb. yırtılma), etkilenen organda bulunan ancak travma nedeniyle komşu bölgeye sıçrayan ilaç nedeniyle kontaminasyon potansiyeli yüksek alanlar meydana gelebilir. Bu tür sorunları çözmek için birden fazla alanın örneklenmesi ve farklı örneklerin test edilmesi gereklidir. Postmortem kanın bulunmadığı alkol içeren durumlarda, kandaki alkol seviyelerini diğer ölüm sonrası dokulardakilerle karşılaştıran çalışmalardan elde edilen korelasyon verilerinden kandaki alkol seviyeleri tahmin edilebilir. Ölüm sonrası yeniden dağıtımda yer alan karmaşık süreçler nedeniyle, ölümden önce alınan bir ilaç dozunun belirlenmesi için tek bir postmortem kan örneği değil çoklu örnek analizi gereklidir (Prouty & Anderson, 1990; Hilberg et al., 1999b).

9. SONUÇ

Doğal olmayan, travmatik kökenli, ani ve beklenmedik ölümlerin araştırılmasında, araştırmacı tarafından alkol, ilaç, uyutucu, uyuşturucu, uyarıcı ve toksik dozda madde kullanımının olup olmadığı, madde bulunması durumunda ölüme katkıda bulunan bir faktör olup olmadığı konusunda ölçülebilir bilimsel kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır. Madde ve metabolit tayini postmortem örneklerin (kan, doku vb.) yeterli ve uygun koşullarda elde edilip analiz edilmesiyle yapılır. Bu noktada, ölüm ve postmortem örneklemenin yapılacağı sürenin kısa tutulması, yeterli hacim ve miktarda örneklem yapılması, kontaminasyonun önlenmesi, örneklerin düzgün şekilde paketlenmesi, taşınması ve bu esnada eğer gerekliyse soğuk zincirin korunması önem arz etmektedir.

Postmortem örneklerden numune alma sırasında bulunan ilaç konsantrasyonu, bazıları konağa, bazıları ölüm sonrası değişikliklere ve bazıları da analitin fizikokimyasal özelliklerine bağlı birçok faktörün sonucudur ve ölüm zamanındaki ilaç konsantrasyonunu temsil etmeyebilir. Bu nedenle, negatif bir bulgu her zaman ilaçların dahil olmadığı anlamına gelmez; ve yüksek düzeyde ilaç bulgusu da her zaman aşırı dozun meydana geldiği anlamına gelmez. Hem kandaki hem de dokudaki (örn. Karaciğer veya beyin) ilaç seviyelerinin analizi ve karşılaştırması gerekli olabilir ve kantitatif bulguların doğru yorumlanması için mümkün olduğunda yapılmalıdır. Postmortem örneklerden tüketilen ilaç dozunun tahmin edilmesi oldukça zor bir süreçtir. Ayrıca, örnek sonuçlarında birkaç ilacın bulunması, ölüme neden olan ana madde, sinerjik etkiler veya ilaç etkileşimleri gibi sorunları da çözmeyi gerektirir. Özetle, adli toksikolog, bir veya daha fazla maddenin ölüm nedeninde bir rolü olup olmadığına ilişkin belirli bir görüşe kolayca işaret edemeyebilir, karmaşık koşulların olduğu durumlarda kesin bir yoruma veya sonuca izin vermeyen geniş bir vaka bulgusu yelpazesi sunabilir.

KAYNAKLAR

1. Bertol, E., Trignano, C., Grazia Di Milia, M., Di Padua, M., and Mari, F. (2008), Cocainerelated deaths: an enigma still under investigation. *Forensic Sci. Int.* , (176), 121–123.
2. Dalpe-Scott, M., Degouffe, M., Garbutt, D., and Drost, M. (1995), A comparison of drug concentrations in postmortem cardiac and peripheral blood in 320 cases. *Can. Soc. Forens. Sci. J.* , (28), 113–121.
3. Dinis-Oliveira, R.J., (2010), Collection of biological samples in forensic toxicology, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20 (7), 363–414.
4. Drummer O.H., Gerostamoulos J. (2002) Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. *Ther Drug Monit.*, 24(2), 199–209.
5. Drummer, O. H. (2004), Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci. Int.*, (142), 101–113.
6. Drummer, O. H. (2007), Postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.*, (165), 199–203.
7. Engelhart, D. A., and Jenkins, A. J. (2007), Comparison of drug concentrations in postmortem cerebrospinal fluid and blood specimens. *J. Anal. Toxicol.* , (31), 581–587.
8. Gambaro, V., Arnoldi, S., Casagni, E., Dell’Acqua, L., Pecoraro, C., and Frolidi, R. (2007), Blood cyanide determination in two cases of fatal intoxication: comparison between headspace gas chromatography and a spectrophotometric method. *J. Forensic Sci.* , (52), 1401–1404.
9. Hepler, B. R., and Isenschmid, D. S. (1998), Specimen selection, collection, preservation, and security. In: Karch, S. B. (Ed.), *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, 873–889.
10. Hilberg, T., Ripel, A., Slørdal, L., Bjørneboe, A., and Mørland, J. (1999a), The extent of postmortem drug redistribution in a rat model. *J. Forensic Sci.* , (44), 956–962.
11. Hilberg, T., Rogde, S., and Mørland, J. (1999b), Postmortem drug redistribution: human cases related to results in experimental animals. *J. Forensic Sci.* , (44), 3–9.
12. Hu, Z., Yang, X., Ho, P. C., Chan, S. Y., Heng, P. W., Chan, E., et al. (2005), Herb–drug interactions: a literature review. *Drugs*, (65), 1239–1282.
13. Jenkins, A. J., and Lavins, E. S. (1998), 6-Acetylmorphine detection in postmortem cerebrospinal fluid. *J. Anal. Toxicol.* , (22), 173–175.
14. Jones, G. R. (1998), Interpretation of postmortem drug levels. In: Karch, S. B. (Ed.), *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, 970–985.

15. Kupiec, T. C., Raj, V., and Vu, N. (2006), Pharmacogenomics for the forensic toxicologist. *J. Anal. Toxicol.* , (30), 65–72.
16. Marin, S. J., Coles, R., Merrell, M., and McMillin, G. A. (2008), Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC–MS–MS. *J. Anal. Toxicol.* , (32), 491–498.
17. Moriya, F., and Hashimoto, Y. (1999), Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. *J. Forensic Sci.* , (44), 10–16.
18. P’elissier-Alicot, A.L., Gaulier, J.M., Champsaur, P., and Marquet, P. (2003), Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. *J. Anal. Toxicol.* ,(27), 533–544.
19. Plueckhahn, V. D. (1967), The significance of blood alcohol levels at autopsy. *Med. J. Aus.*, (July 15), 118–124.
20. Prouty, R. W., and Anderson, W. H. (1990), The forensic science implications of site and temporal influences on postmortem blood–drug concentrations. *J. Forensic Sci.* , (35), 243–270.
21. Robertson, M.D., Drummer O.H. (1995), Postmortem drug metabolism by bacteria. *Journal of Forensic Science*, 40 (3), 382–386.
22. Skopp, G. (2004), Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.* ,(142), 75– 100.
23. Skopp, G. (2010), Postmortem toxicology. *Forensic Sci Med Pat-hol*, (6), 314–325.
24. Stephens, R. J., and Richards, R. G. (1987), Vitreous humor chemistry: the use of potassium concentration for the prediction of the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* , (32), 503–509.
25. Woo, T. M. (2008), When nature and pharmacy collide. *Adv. Nurse Pract.*, July, 69–72.

● 2.Bölüm ●

ADLİ TOKSİKOLOJİYE GİRİŞ

*Araş. Gör. Dr. Gözde Karabulut¹
Elif Pınar Başarır²*

1 Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 43100, Kütahya, TÜRKİYE, Sorumlu Yazar

2 Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Programı, 06100, Ankara, TÜRKİYE

1. Adli Toksikoloji

Toksikoloji; çeşitli kimyasallar, fiziksel ve biyolojik etkenlerin insanlar, hayvanlar ve çevre üzerindeki zararlı etkilerini araştıran bilim dalıdır.

Toksikolojinin en eski alt bölümlerinden biri olan ve başlıca kimyasal maddelerin neden olduğu yasal olarak suç içeren olayların ve kimyasal madde kaynaklı şüpheli ölüm ve zehirlenmelerin aydınlatılmasında görev yapan bilim dalı olan adli toksikoloji ile birlikte kimyasal maddelerin çok çeşitli amaçlarla kullanılması ve yaşantımızın her anında karşılaştığımız için analitik toksikoloji, klinik toksikoloji, çevresel toksikoloji, endüstriyel toksikoloji, mesleki toksikoloji, biyokimyasal toksikoloji, mekanistik toksikoloji, genetik toksikoloji, düzenleyici toksikoloji, gelişimsel toksikoloji, reproduktif toksikoloji gibi toksikoloji pek çok alt çalışma dalına ayrılmıştır.

Adli toksikoloji toksikolojinin en eski dallarındandır. Kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki zararlı etkilerinin teşhis ve tedavileri ile uğraşır, zehirlenmeleri adli tip açısından inceler. Zehirlenmenin, hukuksal açıdan değerlendirilmesinde, maruz kalınan kimyasal maddenin “neden-etki” ilişkisinin saptanması önemlidir. Bu ise biyolojik materyalden (kan, idrar, doku ve organlar) alınan örnekteki toksik maddenin miktarını saptamak, bulunan miktarın ise “doz-etki” açısından yorumunu yapmaktır. Adli toksikoloji; ölümle sonuçlanan bir vakanın orijininin belirlenmesinde, olay yerinde ele geçen bir maddenin söz konusu zehirlenmeye sebep olup olmayacağının araştırılmasında, olay ile şüpheli toksik maddenin ilişkisinin incelenmesinde, ters ilaç etkisi veya aşırı doz madde etkisinin belirlenmesinde, akut zehirlenme vakalarında toksik ajanın belirlenmesinde, kimyasal savaş ajanları ve narkotik maddeler ile meydana gelen zehirlenmelerde, madde etkisi altında işlenen suçların (cinsel istismar, trafik kazası, iş kazası, hırsızlık, gasp, cinayet vb) aydınlatılmasında, reçeteli/reçetesiz ilaç istismarında, işyeri maruziyetinin belirlenmesinde, ticari ürün içeriklerinin araştırılarak insan sağlığını tehdit edici unsurların hukuki çerçevesinin ortaya konmasında adaletin işleyişine ışık tutan bir bilim dalıdır.

Adli toksikolojide esas, toksik maddeyi tespit etmenin yanı sıra, bu maddenin mevcut duruma adli boyut kazandırabilecek kabiliyete sahip olup olmadığının yorumlanmasıdır. Mevcut durum bir ölüm vakası ise, tespit edilen madde konsantrasyonunun ölümcül dozda olup olmadığı veya tespit edilen maddenin ölüme neden olacak davranışa yol açacak özellikte ve dozda olup olmadığının değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Adli toksikoloji başlıca 3 alt bölümden oluşur: Postmortem Toksikoloji, İnsan Performansı Toksikolojisi ve İlaç İdrar analizidir.

2. Postmortem Toksikoloji

Postmortem toksikoloji; ölüm nedeni araştırılırken otopside elde edilen biyolojik materyallerde kimyasalları, ilaçları ve zehirleri tespit ederek ilişkili maddelerin konsantrasyonunu tanımlar ve bulguların yorumlanmasına katkı sağlar. Postmortem toksikoloji ölümün doğrudan zehirlenmeye bağlı olmadığı birçok durumlarda çok kıymetli veriler sunabilir. Trafik kazası kurbanlarında alkolün varlığı, zorlamalı bazı ölümlerde psikoaktif ilaçların mevcudiyeti, saldırgan ve tutarsız davranan kişilerde alkol, narkotik ilaçlar, halusinojenlerin varlığının gösterilmesi buna örnek verilebilir. Bunun aksine, bazı olgularda toksikolojik bulguların negatif çıkması da iddiaların çürütülmesine yarayabilir. Benzer biçimde, ilaçlarını düzenli alması gereken bazı hastalarda, örneğin epilepsi hastalarında, kanda olması gereken ilaç konsantrasyonunun bulunmaması, kişinin bir nöbet geçirerek öldüğü varsayımını güçlendirebilir (Poklins, 1997).

Doğal olmayan, saldırı sonucu, ani veya beklenmedik ölümlerde, genellikle ortaya atılacak birincil soru, otopsi materyalinde yabancı bir maddenin bulunup bulunmadığıdır. Bir ilaç veya toksik madde tespit edildiğinde, uygulama yolu, akut veya uzun süreli maruz kalım ve madde miktarının ölüm nedenine, önlenmesine veya doğrudan müdahale etmek için yeterli olup olmayacağına ilişkin ek sorular takip edecektir (Hearn & Walls, 2007). Postmortem olgularda yapılan analizler; yabancı maddenin ve/veya onun ana metabolitinin miktarının belirlenmesi, ilaç miktarının saptanması, ilacın ölüme neden olup olmadığı, önleyip önlemediği veya doğrudan ölümlle ilişkili olduğunu anlamada yeterli olup olmadığını içermektedir (Jones, 1998).

3. İnsan Performansı Toksikolojisi

Alkol; toksikolojide özellikle klinik ve adli toksikolojide sık olarak karşılaşılan bir maddedir. Alkolün yaygın kullanımı onun klinik olarak değerlendirilmesi kadar, postmortem ve performans adli toksikolojisinde de önemini arttırmıştır. Postmortem adli toksikolojide, ölüme neden olabilen ilaçlar ve metabolitleriyle birlikte bulunma oranı yüksek olan alkolün, insan vücut sıvı ve dokularındaki varlığı veya yokluğu incelenir, varsa miktar tayini ile ölüm/olay nedeninin açıklanmasına çalışılır. İnsan performans toksikolojisi, özellikle bu maddelerin varlığının veya yokluğunun saptanmasıyla, kişinin performans ve davranışındaki rolünün değerlendirilmesini sağlar (Levine, 2003).

Alkolün; intihar, cinayet, trafik kazası, iş kazası ve kriminal suçlar gibi birçok adli olaylarla ilişkili olduğu bilinmektedir. İnsan diyetinde yer alan tek alkol etil alkol (etanol)dür. Santral sinir sisteminin direkt olarak kan ile ilişkisi nedeniyle, yasal prosedürlerde etil alkolün kişinin performansına etkisinin değerlendirilmesi

açısından kan alkol derişimi tercih edilmektedir (Logan et.al, 2008).

4. İlaç İdrar Analizi

Toksikolojinin kanun ve adalet için uygulanması olarak tanımlanan adli toksikoloji içinde, adli amaçlı yapılan madde testleri önemli bir alt alandır. Kişilerin yasaklı/kontrole tabi maddelerin ve/veya metabolitlerinin biyolojik materyallerde analizi ile madde kullanımı ve ilişkili durumların adli olarak değerlendirmesini kapsamaktadır (Levine, 2003). Bununla birlikte, iş yeri madde kullanım testleri, madde istismarına karşı caydırıcı bir unsur olarak yürütölmenin yanında iş yerlerinde emniyet ve üretkenlik sağlamak için kullanılır (Smith et.al, 2004).

5. Adli Vakaların Aydınlatılmasında Kullanılan Biyolojik Örneklerin Önemi

Bir olayda işlenen suçun açıklığa kavuşturulması, adli makamların olayla ilgili doğru kararı vermesi ve suç mahalli-suçlu-kurban ilişkisinin ortaya çıkarılması, olay yerinde bırakılan biyolojik örneklerin miktarına ve kalitesine bağlıdır. Suç mahallinde bulunan biyolojik örnekler; kan ve kan lekeleri, cinsel sıvılar ve lekeler, dişler ve kemikler, tırnaklar, dokular ve organlar, saçlar-kıllar, tükürük ve tükürük lekeleri, ter, idrar, burun akıntısı ve diğer biyolojik sıvılardır. Locard'ın "her temas bir iz bırakır" sözü vaka, suç mahalli ve olayın failleri, mağdurları ya da tanıkları arasındaki bağlantının kurulmasında biyolojik delillerin vazgeçilmez olduğunu göstermektedir.

Tüm bireylerin DNA yapıları (tek yumurta ikizleri hariç) yani genetik kodları birbirinden farklıdır, bu genetik kod kan, doku, sperm, tükürük, saç ve kemik hücreleri gibi her hücrede aynıdır (kimerik bireyler hariç). Bu temel prensiplere dayanan DNA profillemesi, adli olaylarda kimlik/suçlu/zanlı tespiti, kimliği belirsiz kişilerin kimliklendirilmesi, annelik-babalık davalarının sonuçlandırılması, felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi ve saptanması amacı ile kullanılmaktadır.

6. Biyolojik Örnekler

Doğal olmayan, travmatik kökenli, ani ve beklenmedik ömümlerin araştırılmasında, araştırmacı tarafından alkol, uyutucu, uyuşturucu, uyarıcı ve toksik-öldürücü dozda madde kullanımının olup olmadığı, madde bulunması durumunda ölüme katkıda bulunan bir faktör olup olmadığı konusunda ölçülebilir bilimsel kanıtlara ihtiyaç duymaktadır. Adli toksikolojik değerlendirmenin ilk basamağını madde tarama testi, sonrasında ise örnek üzerinde doğrulayıcı testler yapılarak madde miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Madde ve metabolitlerin miktarı özellikle femoral venöz kan başta olmak üzere diğer örneklerden belirlenir (Drummer, 2007).

Bu noktada, adli olay içeren ölüm vakası ve biyolojik örneklemenin yapılacağı sürenin kısa tutulması, yeterli hacim ve miktarda örnekleme yapılması, kontaminasyonun önlenmesi, örneklerin düzgün şekilde paketlenmesi, taşınması ve bu esnada eğer gerekliyse soğuk zincirin korunması önem arz etmektedir.

a) Kan

Kan, psikoaktif madde/ilaçların ve metabolitlerin tespit edilmesi, konsantrasyonlarının belirlenmesi ve yorumlanması için tercih edilen iyi bir örnektir. Ölüm sonrasında genellikle periferik (femoral vb.) kan ve kalp kanı alınır. Kalp kanı yeniden dağılım ve kontaminasyon riski nedeniyle kalitatif analizler için tercih edilir. Özellikle travma gibi durumlarda mide içeriğinden kaynaklı kontaminasyon riski artar. Kalp kanı genellikle periferik kandan daha fazla miktardadır ve başlangıç toksikoloji testleri için kullanımı uygun bir örnektir. Bir çok maddenin postmortem kan konsantrasyonları, ölüm anında ilacın dağılımının tamamlanmaması ve/veya hücresel düzeyde pasif difüzyon nedeniyle postmortem yeniden dağılım veya büyük organlarda vasküler yollar nedeniyle kanın alındığı bölgeye göre değişiklik gösterebilir. Kalp kanında tespit edilen psikoaktif madde/ilaçların konsantrasyonları genellikle periferik kandan yüksektir (Drummer&Gerostamoulos, 2000).

Kan idrar örneği ile karşılaştırıldığında; özellikle yeni psikoaktif maddelerle ilgili olarak, alınan maddenin metabolitleri hakkında bilgi bulunmadığı durumlarda, ana maddenin tespit edilmesinde avantaj sağlar. Kan aynı zamanda, egzoz gibi gazlar veya uçucu kimyasal maddelere bağlı zehirlenme vakalarında da kullanılabilen iyi bir örnektir (Hepler & Isenschmid, 1998).

b) İdrar

İdrar genel bilinmeyen madde taramalarında kullanılan önemli bir örnektir. Alınan maddeler ve metabolitleri idrarda biriktiği için konsantrasyonları kana göre daha yüksektir. Bu nedenle idrar çok az miktarlarda alınabilmiş olsa dahi tarama testleri için vazgeçilmezdir. Renal filtrasyon nedeniyle kanda olduğu gibi yüksek molekül ağırlıklı interferansları içermemesi numune hazırlama aşamasında avantaj sağlar. Alınan maddeye bağlı olarak 24 saatten 1 aya kadar değişebilen tespit süresi imkânı vardır. Madde alımı ile ölüm zamanı arasındaki süre 1 saatten az olduğu durumlarda, madde idrara henüz geçmemiş olduğundan, idrarda tespit edilemeyebilir. Ayrıca ölümün hızla gerçekleştiği vakalarda da alınan madde kanda yüksek konsantrasyonda tespit edilmesine rağmen idrarda tespit edilemeyebilir. İdrardaki pozitif bulgular ise madde kullanımına işaret etse de kullanım zamanı ve miktarı hakkında fikir vermez (Skopp,2004; Drummer&Gerostamoulos, 2002).

c) Safra

Birçok maddenin safrada biriktiği bilinmektedir. Özellikle kronik ağır metal maruziyeti ve ksenobiyotik kullanımı durumunda iyi bir örnektir. Özellikle idrar alınamayan vakalarda kalitatif tarama amaçlı kullanılabilir. Safradaki pozitif bulgular önceden veya kronik psikoaktif madde/ilaç kullanımına işaret eder. Safra örneği alındıktan sonra koruyucu madde eklenmiş olsa dahi fermentasyon nedeniyle -20°C de saklanması tavsiye edilir (Drummer&Gerostamoulos, 2002).

d) Vitröz Sıvı

Vitröz sıvı, tüm postmortem vakalardan alınması gereken bir örnektir. Berrak, pıhtılaşmış materyal içermeyen tuzlu su çözeltisi halindedir. Çok az miktarda enzim ve protein içerdiği için, proteine bağlanma oranı yüksek veya lipofilik maddeler vitröz sıvıda kana göre daha düşük konsantrasyonda bulunurlar. İzole bir bölgede bulunduğu için kontaminasyon ve bakterilere daha az maruz kalır. Bu nedenle fermentasyonla oluşan post-mortem etil alkolü, ante-mortem etil alkol kullanımından ayırt etmekte kullanılması önerilir. Ayrıca ölüm zamanını belirlemede önemli bilgi verir (Skopp, 2004; Dinis-Oliveira, 2010).

e) Beyin Omurilik Sıvısı

Beyin omurilik sıvısı ileri derecede kokuşma görülen vakalardan alınması önerilen, vitröz sıvı gibi kontaminasyon ve bakterilere karşı korunaklı bir örnektir. Yüksek molekül ağırlıklı proteinlerden arındırılmış plazma örneği gibidir. Beyin omurilik sıvısı, hipoglisemi vakalarında glukoz ve laktat tayini ile eroin kullanımı ve ölüme katkısının değerlendirilmesi açısından önemlidir (Jenkins & Lavins, 1998).

f) Mide İçeriği

Özellikle kullanılan madde/ilaç hakkında bilgi olmadığında mide içeriği genel tarama testleri için çok önemlidir. Henüz sindirilmemiş tabletler, bitkisel maddeler gözle görülebilir. Solventler veya herbisitler ise gözle görülebilmesinin yanı sıra karakteristik kokuları ile de mide içeriğinde fark edilirler. Mide içeriğinde düşük miktarda tespit edilen psikoaktif madde/ilaç veya bunların metabolitleri bu maddelerin ölüm öncesi kullanımından çok kandan mideye pasif difüzyonlarının bir göstergesi olabilir. Ayrıca ağır metal zehirlenmesi şüphesi durumunda midenin veya ince bağırsak içeriğinin de alınması önerilir (Skopp, 2004; Dinis-Oliveira, 2010; Hepler & Isenschmid, 1998).

g) Dokular

Postmortem toksikolojik incelemeler için genellikle karaciğer başta olmak üzere böbrek, akciğer, dalak, kas ve yağ dokusu gibi örnekler alınır. Birçok ilaç/psikoaktif madde/zehir karaciğerde metabolize olduğu için hem metabolize olmamış ana madde hem de metabolitlerini tespit etmek için karaciğer oldukça değerli bir örnektir. Tespit edilen maddenin karaciğer/kan konsantrasyon oranı, akut aşırı doz ile kronik kullanımının ayırt edilmesinde de kullanılır.

Akciğer, özellikle intravenöz alımlarda yüksek konsantrasyonlar tespit edilir. Uçucu madde veya anestezi madde vakalarında akciğer ve beyin dokularının alınması önerilmektedir. Ayrıca trakea havası da örnek olarak alınmalı ve tamamen kapalı kaplarda gönderilmelidir. Böbrek ağır metal vakalarında, dalak ise siyanür ve karbon monoksit analizlerinde özellikle kan alınamayan vakalarda oldukça yararlı örneklerdir. Beyin yüksek yağ içerikli yapısı nedeniyle halojenli hidrokarbonlar gibi lipofilik maddelerin birikimi için uygun ortam sağlar. Ayrıca anatomik olarak korunaklı olduğundan post-mortem etkileşimlerden daha az etkilenir.

Kas, çürüme, yanma, dekompozisyon meydana gelmiş vakalarda dahi alınması önerilen biyolojik örneklerdir (Skopp, 2004; Dinis-Oliveira, 2010; Hepler & Isenschmid, 1998).

h) Saç ve Tırnak

Saç ve tırnak gibi keratinize dokular, ağır metal, psikoaktif madde/ilâç/zehirlere kronik maruziyetin test edilmesinde kullanılırlar. Saçın uzunluğuna bağlı olarak haftalar hatta aylar öncesindeki psikoaktif madde/ilâç/zehir kullanımlarının tespit edilmesine olanak sağlar. Saç örneği saçlı deriye yakın alınmalıdır. Segmental analiz için kök ve uç kısımları ayırt edici şekilde belirtilmelidir. Tam tırnak örneği el ve ayaklardan alınır ve psikoaktif madde/ilâç/zehir vb. madde ve metabolitlerinin tespit imkânı sağlar (Dalpe-Scott et al., 1995).

Sonuç

Yasal olarak kabul edilen ve mahkemelerde delil olarak sunulabilen DNA profilleri üretmek için olay yerinden toplanacak biyolojik örneklerin toplanması, paketlenmesi, korunması, saklanması ve taşınması sırasında çok dikkatli olunmalıdır. Suç mahallinden toplanan biyolojik örnek ıslak ya da nemli bir şekilde veya usulüne uygun olarak paketlenmeden laboratuvara incelenmeye gönderilmiş ise, bu şekilde elde edilen biyolojik örnek üzerinde mikroorganizmaların üremesi için elverişli bir ortam oluşacağından ve bu mikroorganizmaların üremelerine bağlı olarak meydana gelen yıkımlar, DNA'nın elde edilmesini zorlaştıracak aynı za-

manda elde edilen DNA da tahribata uğramış olacaktır. Bu durum vakanın aydınlatılmasına yardımcı olacak kanıtların kaybolmasına neden olabilmektedir.

Biyolojik bir örnek toplanırken; ıslak ise, güneşe maruz kalmadan steril oda şartlarında kurutulup depolandıktan sonra paketlenmeli, ambalajda steril kağıt zarflar ve karton kutular kullanılmalı, kontaminasyon olmamasına ve kanıt güvenliğine dikkat edilmeli, her delil için ayrı ayrı paketlenmeli, numuneler ısıya, soğuğa, titreşime maruz bırakılmamalı, sürtünme, deformasyon, kirlenme ve her türlü kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere ve/veya etkilere dayanıklı bir şekilde ambalajlanmalıdır.

Sonuç olarak; suç mahallindeki biyolojik örneklerin tespiti, suça ilişkin olayların yeniden yapılandırılması ve canlandırılması için oldukça kritik bir öneme sahiptir. Bir suç mahallinde toplanan farklı biyolojik kanıt türleri, bir bireyi bir suça dahil etmek veya hariç tutmak için kullanılabilir. Özellikle suç mahallinden elde edilen delillerle bireylerin tanımlanmasında her bireyde farklı bir kod düzenine sahip olan DNA molekülü vakaları aydınlatmada en büyük paya sahiptir.

Çünkü DNA parmak izi kişiseldir yani her bir kişiye özgüdür ve bu da suçlu profilinin sağlam ve doğru bir şekilde ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Olay ile ilgili olarak bulunan her türlü vücut sıvısı, deri döküntüsü ve saç-kıl örnekleri büyük önem taşıyan biyolojik örneklerdir. Bu biyolojik örneklerden elde edilen DNA ile yapılan profillemeye çalışması adli vakaların aydınlatılmasında önemlidir. Çünkü kişiye özgü genetik kod taşıyan biyolojik örnekler, çeşitli şekillerde elde edilebilir olmaları ve aynı zamanda bu nedenle olay yerinde kalmaması ve/veya bulunamaması için tedbir alınması son derece zordur ve bu örneklerin sağladığı sonuçlar yorum yapılma gerekliliği olmadan, bilimsel, ölçülebilir ve objektif kriterlerle değerlendirilerek adli vakaların aydınlatılmasında önemli rol oynarlar.

KAYNAKÇA

1. Dalpe-Scott, M., Degouffe, M., Garbutt, D., and Drost, M. (1995), A comparison of drug concentrations in postmortem cardiac and peripheral blood in 320 cases. *Can. Soc. Forens. Sci. J.*, (28), 113–121.
2. Dinis-Oliveira, R.J., (2010), Collection of biological samples in forensic toxicology, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20 (7), 363-414.
3. Drummer O.H., Gerostamoulos J. (2000) Postmortem redistribution of morphine and its metabolites. *J. Forensic Sci.*, 45, 843-845.
4. Drummer O.H., Gerostamoulos J. (2002) Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. *Ther Drug Monit.*, 24(2), 199-209.
5. Drummer, O. H. (2007), Postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.*, (165), 199–203.
6. Hearn, W.L. & Walls, H.C., (2007), Introduction to post-mortem toxicology, in *Drug Abuse Handbook, 2nd Edition*, (965-975), S.B. Karch ed., Florida: CRC Press.
7. Hepler, B. R., and Isenschmid, D. S. (1998), Specimen selection, collection, preservation, and security. In: Karch, S. B. (Ed.), *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, 873–889.
8. Jenkins, A. J., and Lavins, E. S. (1998), 6-Acetylmorphine detection in postmortem cerebrospinal fluid. *J. Anal. Toxicol.*, (22), 173–175.
9. Jones, G.R. (1998), Interpretation of post-mortem drug levels, in *Drug Abuse Handbook*, (970-985), S.B. Karch ed., Florida: CRC Press.
10. Levine, B. (2003), Forensic Drug Testing, in: *Principles of Forensic Toxicology, 4th ed.* (1-46), USA.
11. Logan, B., Gullberg, R., Negrusz, A., Jickells, S., (2008), Alcohol, drugs, driving, in: *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, (299-321), Pharmaceutical Press.
12. Poklins, A. (1997), Forensic Toxicology, in: Eckert WG, *Introduction to Forensic Sciences*, 2nd Ed. Florida: CRC Press.
13. Smith, A., Wadsworth, E., Moss, S., Simpson, S., (2004), *The Scale and Impact of Illegal Drug Use by Workers*, Cardiff: HSE Books.
14. Skopp, G. (2004), Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.*, (142), 75– 100.

● 3.Bölüm ●

SULARDA *SALMONELLA* SPP. ARANMASI

Dr. Öğretim Üyesi Pınar Mursaloğlu KAYNAR¹

¹ Hitit Üniversitesi, Alaca Avni Çelik Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

GİRİŞ

Salmonella türleri *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan Gram negatif, basil şeklinde, sporsuz, kapsülsüz, mezofilik, aerob veya fakültatif anaerob üreyebilen bir bakteri grubudur. *Salmonella gallinarum* ve *Salmonella pullorum* türleri dışındaki diğer *Salmonella* türleri peritrik kirpikleri sayesinde hareket ederler. Genellikle S tipi koloni görünümü yaparlar. *Salmonella*'lar geniş bir grup içerisinde yer alırlar. Antijenik yapısında somatik (O) antijeni tüm *Salmonella* 'larda bulunurken, kirpik (H) antijeni ise hareketli olanlarda görülür. Yüzeysel antijenlerden Vi'de tüm *Salmonella* 'larda bulunmamaktadır. Diğer yüzeysel antijenlerden fimbria (pilus) antijeni ve mukoid koloni yapanlarda M antijeni içerir. İnsan ve hayvanların dışkılarıyla yayılım gösteren *Salmonella* 'lar, gastroenterit enfeksiyonlara, enterik ateşi (tifo ve paratifo), bakteriyemi ve lokal enfeksiyonlara neden olabilirler veya kronik taşıyıcılıkta bulunabilirler. Dünyada ve ülkemizde sık rastlanılan bu gastroenterit enfeksiyonların etkeni *Salmonella* 'ların insanlara bulaşmasında kaynak olarak hayvansal gıdalar, lağım suyu veya lağım suyuyla kirlenmiş içilme ve kullanımdaki sular ile bu sularla sulama yapılan bitkisel ürünlerde görülürler. Bu kaynakların yarattığı gastroenterit enfeksiyonların yayılımıyla salgınlara ve böylece halk sağlığı problemlerine sebep olurlar. Gastroenterit enfeksiyonlara genellikle *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium'un sebep olduğu görülmektedir. Enterik ateşine (tifo) ise doğadaki tek konağı insan olan *Salmonella* Typhi'nin neden olduğu ve insan dışkılarıyla kirlenmiş sularla yayılımı görülür. Ülkemizde tüm *Salmonella* enfeksiyonlarının bildirimi zorunlu kılınmıştır. *Salmonella* enfeksiyonlarının tanısı şüpheli kolonilerin biyokimyasal testlerle doğrulanması ve özgül antiserumlarla serogruplandırılmasına dayanmaktadır. Ayrıca moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak da kesin tanı konulabilmektedir. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında dışkı numunelerinden laboratuvar tanısı yapılmaktadır. *Salmonella* spp. etkenin yayılmasının engellenmesi için bu etkenin kaynağının da bulunması önemli bir yer tutmaktadır. Gıda kaynaklı *Salmonella* 'ların bulunması için laboratuvar tanısında standardize edilmiş yöntemler kullanılır. *Salmonella* enfeksiyonların önemli bir kaynağı olan içme-kullanma suları, doğal kaynak suları, doğal mineralli sular ve içme suları gibi tüm su çeşitlerinde aranmaları önemlidir. Su kaynaklı zehirlenmelerde mutlaka *Salmonella* spp. aranması yapılmalıdır.

Bu bölümde, su kaynaklı *Salmonella* spp. aranması için laboratuvarlarda yöntem birliğinin sağlanması ve güvenilir sonuçların elde edilmesine yönelik standardize edilmiş yöntemler kullanılarak doğrulanması amaçlanmıştır.

1. YÖNTEM SEÇİMİ

İçme-kullanma suyu, içme suyu, doğal kaynak suyu, doğal mineralli su, atık su, deniz suyu gibi çeşitli su numunelerin analizleri ile epidemiyolojik araştırma veya salgınlarında kaynağının araştırılması için su numunelerinde *Salmonella* spp.'nin aranmasında referans standart yöntemler olarak TS EN ISO 19250, ISO 19250 ve SM 9260 B kullanılmaktadır.

Bu bölümde, içme-kullanma suyu, içme suyu, doğal kaynak suyu, doğal mineralli su ile bu su çeşitlerinin epidemiyolojik ve salgın araştırmaları için Sağlık Bakanlığı tarafından bildirilen TS EN ISO 19250 standart yöntemin laboratuvar uygulamalarına yer verilecektir. ISO 19250 standart yöntemi, EN ISO 19250 olarak Türk Standardları Enstitüsü (TSE) tarafından 12.06.2013 tarihinde TS EN ISO 19250 Su kalitesi – *Salmonella* spp.'nin belirlenmesi başlığıyla kabul edilmiştir.

2. LABORATUVAR GÜVENLİĞİ

Sularda *Salmonella* spp. aranmasını yapan laboratuvarın biyogüvenlik düzeyi (BGD)- 2 önlemlerini alması gerekmektedir. *Salmonella* Typhi normalde biyogüvenlik risk grubu 3 olarak tanımlanmıştır. Bu etkenlere yönelik yapılan doğrulama çalışmalarında, BGD-2 laboratuvar şartlarında Sınıf II A bir biyogüvenlik kabini kullanılmalıdır. Laboratuvar çalışanları sularda *Salmonella* spp. aranması için kullanılan yöntem ve uyulması gereken laboratuvar güvenliği konularında eğitim almalıdır. Bu yöntemin uygulamalarında özellikle doğrulama sırasında çalışanların mutlaka eldiven giymesi gerekmektedir. Ayrıca çalışma sırasında laboratuvarda oluşan atıklara göre tıbbi atık ve kesici-delici atık ayrıştırılmasıyla bertaraf işleminin yapılmasına dikkat edilmelidir.

3. LABORATUVAR ORTAM KOŞULLARI

Laboratuvarın ortam sıcaklığının 18 °C ile 27 °C arasında ve $\leq$ %50 rh nem değerinde olmalıdır. Laboratuvarın bu ortam koşullarını kalibreli bir ölçer ile ölçülerek izlemesini yapmalıdır.

4. LABORATUVAR DONANIMI

4.1 CİHAZ/EKİPMAN

Sularda *Salmonella* spp. aranması yönteminde geçen ve aşağıda belirtilen cihaz- ekipmanlar kullanılmalıdır. Kullanılan inkübatörlerin kalibrasyonun yaptırılması tavsiye edilmektedir.

- 36 ± 2 °C inkübatör
- 37 ± 1 °C inkübatör
- $41,5 \pm 1$ °C inkübatör
- Membran filtre cihazı ve vakum pompası
- 0,45 µm por çapında steril membran filtre kağıdı

4.2 ÇÖZELTİ / BESİYERİ / KİT / ANTİSERUM

Sularda *Salmonella* spp. aranması yönteminde geçen ve aşağıda belirtilen çözelti, besiyeri, kit ve antiserumlar kullanılmalıdır. Ticari dehidre besiyerleri veya kullanıma hazır besiyerleri tercih edilebilir. Besiyerlerin hazırlanması ve muhafazası için “TS EN ISO 11133 Gıda, Yem ve Su Mikrobiyolojisi - Kültür Ortamının Hazırlama, Üretim, Muhafaza ve Performans Deneyi” standardına uyulmalıdır.

- Tamponlanmış peptonlu su (TaPS)
- Soyalı Rappaport-Vassiliadis (RVS) sıvı besiyeri
- Muller-Kauffmann tetrasyonat novabiyosin (MKTTn) sıvı besiyeri
- Ksiloz lizin deoksikolat (XLD) agar besiyeri
- Seçici agar besiyeri (Örnek: Modifiye Brilliant Green agar-BG)
- Triple sugar iron (TSI) agar besiyeri
- Üre agar besiyeri
- L-Lizin dekarboksilaz sıvı besiyeri
- Seçici olmayan besiyeri (Örnek: Triptik Soy Agar -TSA)
- Fizyolojik tuzlu su
- Nutrient yarı katı besiyeri
- OMA, OMB, anti Vi ve anti H polivalan antiserumları

5. NUMUNE KABUL KRİTERİ

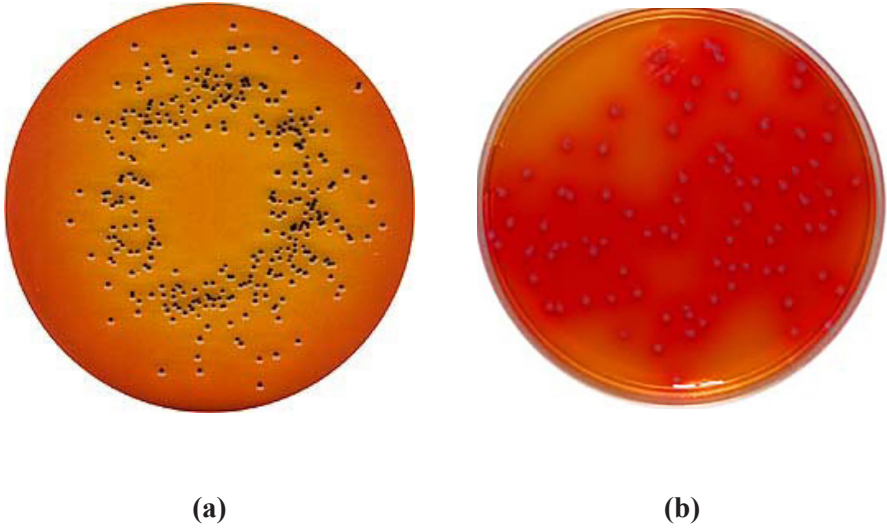
Su numunelerin mikrobiyolojik analizleri için “TS EN ISO 19458 Su Kalitesi-Mikrobiyolojik Analizler İçin Numune Alma” standardına göre su numuneleri alınmalı ve laboratuvara taşınmalıdır. Su numunelerin alımında steril plastik (PP- Polipropilen, PE- Polietilen) su numune alma kapları veya cam şişeleri kullanılmaktadır. Su numunesi alma hazırlıklarının güvenli, hızlı ve kolay yapılabilmesi açısından steril plastik numune alma kapların kullanımı tercih edilmelidir. Su numune alma kaplarının sızdırmaz olması önemlidir. Steril olmayan, kırık-çatlak ve sızdırma yapan kaplardaki su numunelerin *Salmonella* spp. aranması yapılmamalıdır. Orijinal ambalajındaki su numuneleri için kapak bütünlüğü korunmuş olmalıdır. Klorlanan veya klorlu olduğundan şüphelenilen su numuneleri mutlaka sodyum tiyosülfat içeren su numune alma kaplarına alınmalıdır. Sodyum tiyo-

sülfatlı su numune alma kapları, alınan numunelerdeki serbest veya kalıntı kloru tamponlaması için 20 mg/L oranında sodyum tiyosülfat içermesi gerekmektedir. Su numunelerinde *Salmonella* spp. aranması için yeterli su miktarı olarak en az 1 L'lik bir su numunesine ihtiyaç duyulmaktadır. Alınan su numunelerin güneş ışınlarından korunması ve birbirleriyle temasının engellenmesi sağlanarak muhafaza edilmeli ve en kısa sürede laboratuvara taşınmalıdır. Bir kısmı bile donmuş olduğu tespit edilen numuneler çalışmalara dahil edilmemelidir. Taşıma sırasında numunelerin donmaması için uygun sayıda buz aküsü kullanılabilir. Bu buz aküleriyle numunelerin birbirleriyle teması da engellenebilir. Su numunelerin alımından ve laboratuvara 4 saat içerisinde taşınmasında 5 ± 3 °C'de bir izotermik kap kullanılması, 4 saat sonrası için bir buzdolabında muhafaza edilmesine dikkat edilmelidir. Taşıma süresi 8 saatten fazla olduğu durumda ise su numunelerin konulduğu su numunesi kaplarının sıcaklıkları kalibreli bir sıcaklık ölçer ile ölçülerek kayıt altına alınması gerekmektedir.

6. LABORATUVAR YÖNTEMİ

6.1 LABORATUVAR YÖNTEMİNİN UYGULAMALARI

Bölüm 5'te belirtilen numune alma kriterlerine uygun olan su numuneleri öncelikle birkaç kez elle alt-üst edilerek karıştırılmalıdır. Su numunelerin en az 1 L'si membran filtre cihazından 0,45 µm por çapındaki steril membran filtre kağıdı kullanılarak süzme işlemi yapılmalıdır. Süzme işleminden sonra seçici olmayan ön zenginleştirme işlemi için membran filtre kağıtları 50 mL TaPS içerisine konulmalı ve 36 ± 2 °C'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakılmalıdır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra seçici sıvı besiyerinde zenginleştirme işlemi için TaPS'dan 0,1 mL RVS sıvı besiyerine ve 1 mL MKTTn sıvı besiyerine ilave edilmelidir. RVS sıvı besiyeri $41,5 \pm 1$ °C'de 24 ± 3 saat ve MKTTn sıvı besiyeri 36 ± 2 °C'de 24 ± 3 saat inkübe edilmelidir. Epidemiyolojik araştırma veya salgın incelemeleri sırasında yavaş gelişim gösteren *Salmonella* spp.'lerin bulunabilmesi için RVS sıvı besiyerindeki inkübasyon süresini $41,5 \pm 1$ °C'de 48 ± 4 saate kadar uzatılabilir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra RVS ve MKTTn sıvı besiyerlerinde gelişen şüpheli kolonilerden XLD agar ve Modifiye BG agar besiyerlerine ekimleri yapılmalıdır. Ekimleri yapılan plaklar, 36 ± 2 °C'de ve 24 ± 3 saat inkübasyona bırakılmalıdır. İnkübasyon tamamlandıktan sonrası her plakta gelişen *Salmonella* spp. kolonilerinden 1 (bir) tanesi doğrulamaya alınmalıdır. Doğrulanmaya alınan koloni *Salmonella* spp. olarak doğrulanmadığında ise 4 (dört) adet koloni daha doğrulama işlemine alınmalıdır. Tipik *Salmonella* spp. kolonilerin XLD agar besiyerinde genellikle siyah merkezli renksiz koloni görünümü gösterirken, Modifiye BG agar besiyerinde ise pembe-kırmızı renkli koloni görünümü bulunmaktadır (Resim 1).



Resim 1.

- a)** XLD agar besiyerinde *Salmonella* spp. koloni görünümü
b) Modifiye BG agar besiyerinde *Salmonella* spp. koloni görünümü

6.2 DOĞRULAMA

Seçilmiş *Salmonella* spp. şüpheli kolonilerin doğrulanması için TSA besiyerine ekimleri yapılarak 36 ± 2 °C’de ve 24 ± 3 saat inkübasyona bırakılmalıdır. İnkübasyon bitiminden sonra gelişen kolonilere biyokimyasal ve serolojik doğrulama testleri yapılmalıdır.

6.2.1. Biyokimyasal Doğrulama

Salmonella spp. şüpheli kolonilerin biyokimyasal doğrulanması için aşağıda verilen doğrulama testleri yapılabilir. Bu testler için ticari kitler de kullanılabilir. Bu kitlerin kullanımında üretici talimatlarına uyulması tavsiye edilmektedir.

- **Glikozdan asit ve gaz reaksiyonu, laktozdan asit reaksiyonu, sükrozdan asit reaksiyonu, hidrojen sülfür üretimi:** *Salmonella* spp. şüpheli kolonilerin TSI agar besiyeri yüzeyine sürme ve dip (batırma) kısmına ekimleri yapılmalı ve 36 ± 2 °C’de, 24 ± 3 saat inkübasyona bırakılmalıdır. *Salmonella* spp. kolonilerin TSI agar besiyerinin yüzeyinde alkali (kırmızı), dibinde gaz oluşumu ile asit (sarı) görünümüyle glikoz pozitif ve besiyerinin siyahlaşmasıyla hidrojen sülfür üretimi görülmektedir. Laktozu fermente eden *Salmonella* spp. kolonilerin TSI agar besiyerinde

sarı renk görünümü oluşturabildikleri için diğer biyokimyasal doğrulama testlerin yapılması tavsiye edilmektedir.

- **Üre hidrolizi:** *Salmonella* spp. şüpheli kolonilerin yatkı üre agar besiyerine ekimleri yapılmalı ve 36 ± 2 °C’de, 24 saat inkübe edilmelidir. İnkübasyon sonrası *Salmonella* spp. kolonilerin bu besiyerinde gül pembesi renk oluşturmadaıkları için doğrulama sonucu negatif olarak değerlendirilmektedir.
- **Lizin dekarboksilasyon reaksiyonu:** *Salmonella* spp. şüpheli kolonileri L-lizin dekarboksilaz sıvı besiyerine ve besiyeri kontrolü için lizin eklenmemiş dekarboksilaz besiyerine ekimleri yapılmalıdır. Besiyerlerin yüzeyleri steril sıvı parafin ile örtülerek 36 ± 2 °C’de ve 24 ± 3 saat inkübe edilmelidir. İnkübasyon sonunda *Salmonella* spp. kolonilerin lizin içeren besiyerinde menekşe renk görünümülerinden dolayı pozitif sonuç olarak değerlendirilmektedir. Tablo 1’de *Salmonella* suşlarının biyokimyasal test sonuçlarına göre % dağılımları, Tablo 2’de TSI agar besiyerinde *Salmonella* spp. kolonilerin değerlendirilmesi ve Tablo 3’de *Salmonella* spp. kolonilerin biyokimyasal test doğrulama sonuçları sunulmuştur.

Tablo 1. *Salmonella* suşlarının biyokimyasal sonuçlarına göre % dağılımları

BİYOKİMYASAL TEST	BİYOKİMYASAL TEST SONUCU	BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARINA GÖRE <i>SALMONELLA</i> SUŞLARIN % DAĞILIMLARI ^a
TSI’de glikoz (asit oluşumu)	+	100,0
TSI’de glikoz (gaz oluşumu)	+	91,9 ^b
TSI’de laktoz	-	99,2 ^c
TSI’de süktroz	-	99,5
TSI’de hidrojen sülfür	+	91,6 ^d
Üre hidrolizi	-	99,0
L-lizin dekarboksilasyonu	+	94,6 ^e

^aBu dağılım değerleri, tüm *Salmonella* suşlarının + veya – reaksiyon vereceğini göstermez. Bu yüzde değerleri, farklı bölgelerden veya farklı su kaynaklarından elde edilen suşlara göre değişebilir. ^b*Salmonella* Typhi anaerojeniktir (gaz oluşurmaz). ^c*Salmonella enterica* subsp. arizonae pozitif veya negatif laktoz reaksiyonu verir ama daima β -galaktosidaz pozitifdir. *Salmonella enterica* subsp. diarizonae’nın laktoz reaksiyonu negatif, β -galaktosidaz reaksiyonu pozitifdir. Ayrıca

bu suşlar, H₂S üretmezler. Bu suşların çalışılması sırasında tamamlayıcı biyokimyasal testler uygulanmalıdır. ^dAşırı düzeyde siyahlaşma durumunda asit oluşumunu gözlemek zor olabilir.

^e*Salmonella* Paratyphi A negatiftir.

6.2.2 Serolojik Doğrulama

Şüpheli görülen *Salmonella* spp. kolonilerin biyokimyasal doğrulanması sonrasında *Salmonella* O-, Vi-, H-antijenleri yönünden doğrulanmaların yapılması tavsiye edilmektedir. Bu serolojik doğrulama için *Salmonella* spp. kolonilerin TSA besiyerine ekimleri yapılarak 37 ± 1 °C’de ve 24 ± 3 saat inkübasyona bırakılmalıdır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra gelişen kültürler için aşağıdaki serolojik testler uygulanmalıdır. Ticari antiserumların kullanımının uygunluğunu pozitif kontrol suşlar ile test edilmesi tavsiye edilmektedir.

- **Otoaglutinasyon testi:** TSA besiyerinde gelişen kültürün temiz bir lam üzerine konulan bir damla fizyolojik tuzlu suda iyice çözölmeli ve bu lam elde 60 saniye süreyle çevrilmelidir. Süre sonunda kümelenme görüldüğü durumda aglutinasyon meydana geldiği için daha ileri serolojik testler uygulanmadan diğer kolonilerin otoaglutinasyon testlerin yapılmasına devam edilmelidir.
- **O antijen testi:** Otoaglutinasyon meydana getirmeyen koloniler için OMA ve OMB polivalan antiserumları ile otoaglutinasyon testinin uygulamaları yapılmalıdır. Bu uygulama sırasında fizyolojik tuzlu su yerine belirtilen antiserumlar kullanılmalıdır. Uygulama sonrası aglutinasyon oluşmasını pozitif olarak değerlendirilmelidir.
- **Vi antijen testi:** Otoaglutinasyon meydana getirmeyen koloniler için anti-Vi serumu ile otoaglutinasyon testinin uygulamaları yapılmalıdır. Bu uygulama sırasında fizyolojik tuzlu su yerine belirtilen antiserum kullanılmalıdır. Uygulama sonrası aglutinasyon oluşmasını pozitif olarak değerlendirilmelidir.
- **H antijen testi:** Otoaglutinasyon meydana getirmeyen koloniler için Nutrient yarı katı besiyerine ekimi yapılarak 37 ± 1 °C’de ve 24 ± 3 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası anti-H serumu kullanılarak otoaglutinasyon testinin uygulamaları yapılmalıdır. Bu uygulama sırasında fizyolojik tuzlu su yerine belirtilen antiserum kullanılmalıdır. Uygulama sonrası aglutinasyon oluşmasını pozitif olarak değerlendirilmelidir.
- Sularda *Salmonella* spp. aranması için uygulanan yöntemin şeması Şekil 1’de verilmiştir.

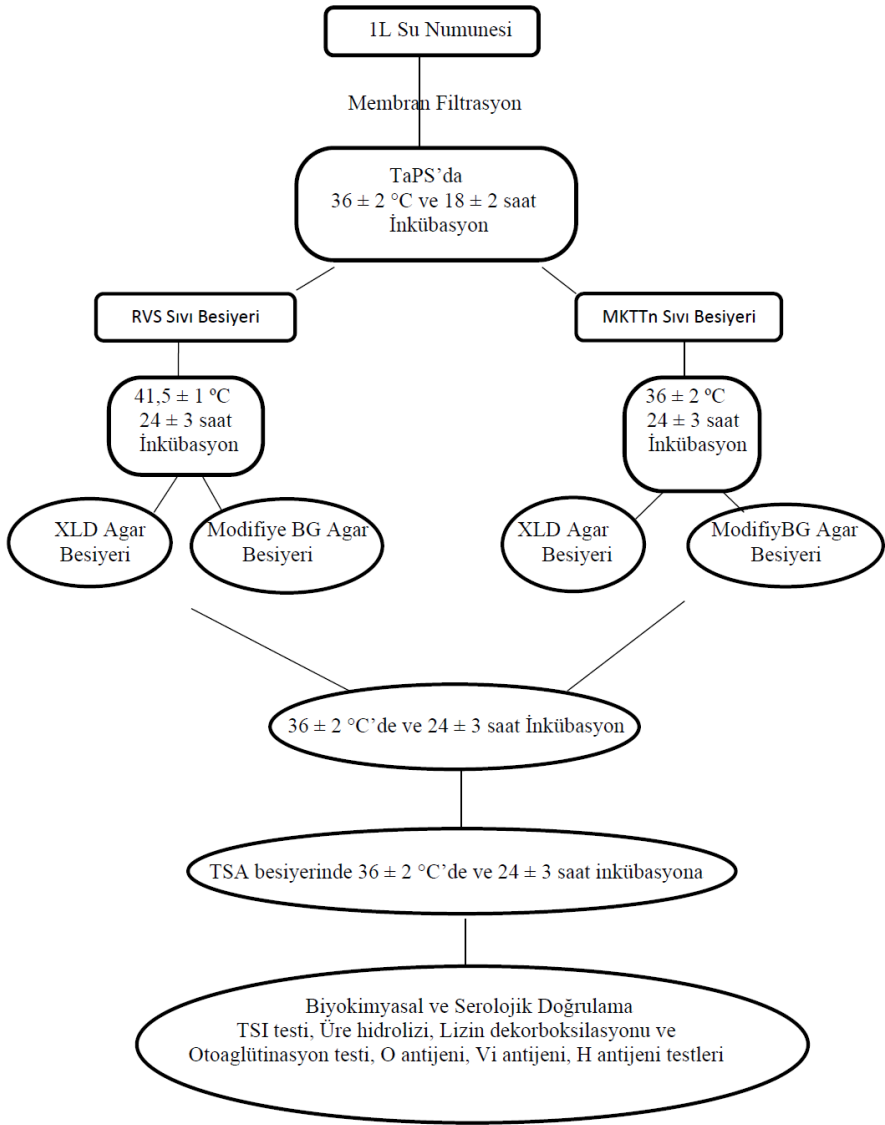
Tablo 2. TSI agar besiyerinde *Salmonella* spp. kolonilerin değeriendirilmesi

GÖRÜNÜM	AGAR BESİYERİNDE DEĞERLENDİRME DİP
Sarı renk (asit)	Glikoz pozitif (Glikoz fermentasyonu var)
Kırmızı veya değışmeyen renk (alkali)	Glikoz negatif (Karbonhidratların fermentasyonu yok)
Siyah	Hidrojen sülfür üretimi var
Kabarcık ve kırılmalar	Glikozdan gaz oluşumu var
	AGAR BESİYERİNDE DEĞERLENDİRME YÜZEY
Sarı	Laktoz veya sükroz pozitif (Laktoz veya sükroz kullanılmış)
Kırmızı veya değışmeyen renk (alkali)	Laktoz veya sükroz negatif (Laktoz veya sükroz kullanılmamış)

Tablo 3. *Salmonella* spp. kolonilerin biyokimyasal test doğrulama sonuçları*

BİYOKİMYASAL TEST DOĞRULAMASI	SONUÇLARI
TSI'de laktoz	-
TSI'de glikoz	+
TSI'de sükroz	-
TSI'de hidrojen sülfür	+
Üre kullanımı	-
L-lizin dekarboksilasyonu	+

*Biyokimyasal doğrulama sonuçlarında bir veya ikisinde beklenen sonuç dışında bir sonuç elde edildiği durumda *Salmonella* spp. şüpheli kolonilerin doğrulama işlemlerine devam edilmelidir.



Şekil 1. Sularda *Salmonella* spp. aranması için uygulanan yöntemin şeması

6.3 Sonuçların Değerlendirilmesi

Salmonella spp. şüpheli kolonilerin doğrulanması sonucunda laboratuvar uygulamasına alınan 1L su numunesi içerisinde *Salmonella* spp. “Bulundu (Bulundu/L şeklinde)” veya “Bulunmadı (Bulunmadı/L şeklinde)” olarak değerlendiril-

melidir. Elde edilen sonuçlar, TS EN ISO 19250 standart yöntemine göre raporlandırılabilir.

7. Kalite Kontrol

7.1 İç kalite kontrol

- Uygulamaya yönelik sterilite kontrolü
Sularda *Salmonella* spp. aranması yöntemin uygulamasının yapıldığı gün su numunesi ile birlikte steril distile su çalışmaya dahil edilmeli ve aynı uygulamalara tabi tutulmalıdır. Uygulama sonucunda steril distile su için ekimi yapılan besiyerlerinde üreme görülmemelidir. Üreme görülmesi durumunda uygulama basamakları kontrol edilerek uygulamalar tekrarlanmalıdır.
- İç kalite kontrolü
Sularda *Salmonella* spp. aranması yönteminin iç kalite kontrolü için referans *Salmonella* suşları ile kirletilmiş su numunelerin çalışılmasıyla yapılmalıdır. Ayrıca sularda *Salmonella* spp. aranması çalışmalarında kullanılan referans suş, besiyeri, kit, besiyeri hazırlamada kullanılan su, membran filtre kağıdı, laboratuvarın ortam sıcaklığı, nemi, hava ve yüzey kontrolü ile kullanılan inkübatörlerin hava ve yüzey kontrolleri yapılmalıdır.
- Dış kalite kontrolü
Sularda *Salmonella* spp. aranması yapan laboratuvarların kendi performanslarını görmeleri ve sonuçlarının geçerliliklerini izlemeyebilmeleri için farklı laboratuvarların sonuçlarıyla karşılaştırmaların yapılması tavsiye edilmektedir. Bu karşılaştırmalar için yeterlilik testi programlarına katılımı veya laboratuvarlar arası karşılaştırmalara katılımı tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Complying with ISO 17025. A practical guidebook for meeting the requirements of laboratory accreditation schemes based on ISO 17025:2005 or equivalent national standards. Vienna: United Nations Industrial Development Organization. 2009.
2. Doğal Mineralli Sular Hakkında Yönetmelik. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. 2004.
3. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. 2005.
4. Laboratuvar Güvenliği Rehberi. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. 2014.
5. Halkman AK. Salmonella. GDM310 Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notu 04. Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/2402/mod_resource/content/1/GDM310%2004.pdf, Erişim Tarihi: 10.01.2021.
6. <https://www.eolabs.com/product/pp0060-brilliant-green-agar>, Erişim Tarihi: 01.03.2021.
7. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F-8892433CFFAAF6AA849816B2EF554D02F3C406BA30>, Erişim Tarihi: 01.03.2021.
8. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları. Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Cilt I. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. 2014.
9. Salmonella.<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?-F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF054656FB4367467E> , Erişim Tarihi: 10.01.2021.
10. SM 9260 B. *Salmonella*. USA: Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. 2017.
11. TS EN ISO 7218. Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi – Mikrobiyolojik Analizler İçin Genel Şartlar ve Rehber. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2008.
12. TS EN ISO 7218/A1. Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi – Mikrobiyolojik Analizler İçin Genel Şartlar ve Rehber. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2014.
13. TS EN ISO 11133. Gıda, Yem ve Su Mikrobiyolojisi - Kültür Ortamının Hazırlama, Üretim, Muhafaza ve Performans Deneyi. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2014.

14. TS EN ISO 11133/A1. Gıda, Yem ve Su Mikrobiyolojisi - Kùltür Ortamının Hazırlama, Üretim, Muhafaza ve Performans Deneyi. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2018.
15. TS EN ISO 11133/A2. Gıda, Yem ve Su Mikrobiyolojisi - Kùltür Ortamının Hazırlama, Üretim, Muhafaza ve Performans Deneyi. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2020.
16. TS EN ISO 19250. Su kalitesi – *Salmonella* spp.’nin Belirlenmesi. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2013.
17. TS EN ISO 19458. Su Kalitesi-Mikrobiyolojik Analizler İçin Numune Alma. Ankara: Türk Standardları Enstitüsü. 2006.