



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA KAYNAKLI PATOJENLERİN
KONTAMİNASYON MİKTARLARINI EŞ ZAMANLI
PCR TEKNOLOJİSİ İLE BELİRLEYECEK TANI
KİTLERİNİN OLUŞTURULMASI VE
UYGULANMASI**

ESEN TUTAR

DOKTORA TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2016

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA KAYNAKLI PATOJENLERİN
KONTAMİNASYON MİKTARLARINI EŞ ZAMANLI
PCR TEKNOLOJİSİ İLE BELİRLEYECEK TANI
KİTLERİNİN OLUŞTURULMASI VE
UYGULANMASI

ESEN TUTAR

Bu tez,
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2016

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Esen TUTAR tarafından hazırlanan “Gıda Kaynaklı Patojenlerin Kontaminasyon Miktarlarını Eş Zamanlı PCR Teknolojisi ile Belirleyecek Tanı Kitlerinin Oluşturulması ve Uygulanması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 11 / 11 / 2016 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İsmail AKYOL (DANIŞMAN)

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Prof. Dr. Ekrem KİREÇCİ (ÜYE)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Prof. Dr. Nihat AKIN (ÜYE)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, SÜ

Doç. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN (ÜYE)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, SÜ

Yrd. Doç. Dr. Yekta GEZGİNÇ (ÜYE)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Esen TUTAR



Bu çalışma TÜBİTAK-1002 Hızlı Destek Programı kapsamında ve kısmen KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Proje No (lar): 115 O 099 (TÜBİTAK) ve 2014/2-32D (KSÜ-BAP)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, Şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**GIDA KAYNAKLI PATOJENLERİN KONTAMINASYON MİKTARLARINI EŞ
ZAMANLI PCR TEKNOLOJİSİ İLE BELİRLEYECEK TANI KİTLERİNİN
OLUŞTURULMASI VE UYGULANMASI**

(DOKTORA TEZİ)

ESEN TUTAR

ÖZET

Gıda patojenleri tüm dünyada hastalıklara, ekonomik kayıplara ve ölümlere neden olan önemli bir sorundur. Olumsuz etkilere yol açan gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi için hastalık etmeni mikroorganizmaların doğru teşhis edilmesi ve kontaminasyon miktarlarının bilinmesi gerekmektedir. Konvansiyonel PCR metodu patojenlerinin tanısında yaygın kullanılmakta ancak uzun zaman alması ve miktar ile ilgili sınırlı bilgi vermesinden dolayı Real Time PCR teknolojisi ile desteklenmektedir. Real Time PCR metodu kantitatif hassasiyeti, düşük belirleme limiti, spesifikliğı ve hızı gibi avantajlarından dolayı gıda patojenlerini tanımlamada kullanılan güvenilir bir yöntemdir.

Tez çalışmasında, farklı mikrobiyal gıda patojenlerinin tanımlaması için ortologus (16S rRNA) gen bölgesi amplifikasyonu yapılmış ve tanımlamalar nükleotid dizileme ile teyit edilmiştir. Tür seviyesinde tanımlanmış patojen mikroorganizmalar gıdalarda birlikte bulunabilirlik özelliklerine göre gruplandırılarak dört farklı multipleks PCR reaksiyonu oluşturulmuş ve standardizasyonu yapılmıştır. Standardize edilen dört reaksiyon ile dokuz farklı patojenin multipleks tanımlaması başarı ile yapılmıştır. Real Time PCR amplifikasyonu ile referans mikroorganizmaları bireysel olarak amplifiye edecek metotlar standardize edilmiş ve DNA konsantrasyonu ile koloni sayıları arasındaki korelasyonlar ile DNA-koloni ilişkileri belirlenmiştir. Türe spesifik reaksiyonlar birleştirilerek dört farklı Real Time PCR reaksiyonu tanımlanmıştır. Bu multipleks reaksiyonlar ile dokuz patojenin popülasyondaki miktarlarını belirleyecek kitler başarı ile oluşturulmuştur. Tez kapsamında geliştirilen Konvansiyonel ve Real Time PCR kitleri ile toplanan et, süt ve su örneklerinde uygulanabilirliğı çalışmaları yapılarak bu gıda ürünlerinde patojen kontaminasyon varlıkları ve mikrobiyal yük tasarladığımız moleküler kitler ile tespit edilmiştir. Geliştirilen Real Time PCR kitleri gıda numunelerinde toplam patojen varlığının ve dinamiğinin belirlenmesine alternatif metotlar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gıda Patojenleri, Konvansiyonel PCR, Real Time PCR, Moleküler Tanımlama Kitleri

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Kasım / 2016

Danışman: Doç. Dr. İsmail AKYOL
Sayfa sayısı: 163

DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF DIAGNOSTIC KITS TO DETERMINE THE CONTAMINATION LEVELS OF FOOD-BORNE PATHOGENS WITH REAL TIME PCR

(Ph.D. THESIS)

ESEN TUTAR

ABSTRACT

Food-borne pathogens are an important problem which causes financial detriments, illnesses and deaths all over the world. In order to prevent the food-borne diseases and their adverse effects, it is necessary to identify the casual agents and to quantify their contamination accurately. Conventional PCR method is widely used in identification of pathogens; however, this method needs to be confirmed by Real Time PCR due to the fact that conventional approach is time consuming and the information it provides about the quantity of the pathogen is insufficient. Real Time PCR is a reliable technique used in the diagnosis of food pathogens since it has the advantages of speed, specificity, sensitive quantification, low detection limit, and a dynamic wide-range.

In this thesis, different food pathogens were identified using orthologous genes region (16S rRNA) and the identifications were confirmed with nucleotide sequencing. Four different multiplex PCR reactions were designed and standardized by separating the pathogen microorganisms identified at the species level into various groups depending on their ability to coexist in food samples. The multiplex identification of nine pathogens was successfully accomplished through four standardized multiplex reactions. The methods to individually amplify the reference microorganisms through Real Time PCR were standardized and the correlations between DNA concentration and colony numbers were determined, along with the DNA-colony relationships. Four different Real Time PCR protocols were constituted through the combination of species specific reactions. By virtue of these multiplex reactions, kits to determine the percentage of nine pathogens in a given population were efficiently generated. In the scope of this thesis, not only were the conventional and Real Time PCR kits developed tested on collected meat, milk and water samples, but also their feasibility at determining the presence of the contaminants and their amounts in these samples were demonstrated. Newly-developed Real Time PCR kits offer an alternative method to ascertain the existence of pathogens and their dynamics in food samples.

Key words: Food-borne pathogens, Conventional PCR, Real Time PCR, Molecular identification kits

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Biology, November / 2016

Supervisor: Doç. Dr. İsmail AKYOL
Page numbers: 163

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince katkı, eleştiri ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni cesaretlendiren danışmanım Doç. Dr. İsmail AKYOL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde yer alarak her zaman bilgi, birikim ve yardımlarıyla yanımda olan Prof. Dr. Ekrem KİREÇCİ'ye ve Yrd. Doç. Dr. Yekta GEZGİNÇ'e, çalışmalarım esnasında yardımını esirgemeyen Gıda Mühendisi Sueda AKINCI'ya ve mezbaha örneklerinin alınmasında yardımcı olan Veteriner Hekim Erkan ŞENEL'e teşekkür ederim.

2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Bursu Programı ve 1002 Hızlı Destek Projesi ile bu çalışmaya katkıda bulunan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) ve kısmen katkıda bulunan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni her zaman destekleyen ve bugünlere gelmemde emekleri büyük olan canım annem Güler ÇAKMAK'a ve aileme teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda yardımını esirgemeyen eşim Dr. Lütfi TUTAR'a teşekkür ederim.

Sevgili Babam merhum Muharrem ÇAKMAK'ın anısına...

Esen TUTAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gıda Kaynaklı Hastalıklar.....	1
1.2. Bazı Gıda Kaynaklı Patojenler.....	2
1.2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	2
1.2.2. <i>Bacillus cereus</i>	3
1.2.3. <i>Brucella melitensis</i>	4
1.2.4. <i>Campylobacter jejuni</i>	5
1.2.5. <i>Clostridium perfringens</i>	6
1.2.6. <i>Cronobacter sakazakii</i>	7
1.2.7. <i>Enterococcus faecalis</i>	7
1.2.8. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	8
1.2.9. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.2.10. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2.11. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	11
1.2.12. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.3. Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmaların Tanımlanmaları.....	12
1.3.1. Konvansiyonel tanımlama.....	13
1.3.2. Real Time PCR yaklaşımı.....	17
1.3.2.1. Real Time PCR’da kullanılan belirleme teknolojileri.....	18
Hedef diziye özgü olmayan belirleme teknolojileri.....	19
Hedef diziye özgü belirleme teknolojileri.....	20
Taqman teknolojisi.....	20
Moleküler boncuk teknolojisi.....	20
FRET teknolojisi.....	21
Akrep (<i>Scorpion</i>) primer teknolojisi.....	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL ve METOT.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.2. Referans Bakteri Suşları ve Kültür Ortamları.....	30
3.3. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	30
3.4. Mikroorganizmaların Sayımı.....	31
3.5. Örneklerin Toplanması ve Toplam Mikroorganizma İzolasyonu.....	32
3.6. Mikroorganizmaların Konvansiyonel PCR Tanımlanması ve Nükleotid Dizilime ile Konfirmasyonu.....	33
3.6.1. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	33
3.6.2. Nükleotid dizi analizi.....	33
3.7. TaqMan Metodu ile Eş-Zamanlı PCR.....	35
3.8. Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması ve Data Analizleri.....	35
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
4.1. Konvansiyonel PCR Yaklaşımı ile Hedef Gıda Patojenlerin Tanımlanması.....	39

4.1.1. Unipleks PCR.....	39
4.1.2. Konvansiyonel PCR ile tanımlanan mikroorganizmaların nükleotid dizileme ile teyit edilmesi.....	42
4.1.3. Multipleks PCR.....	45
4.1.3.1. E ^M 1 grubu için multipleks amplifikasyon.....	47
4.1.3.2. E ^M 2 grubu için multipleks amplifikasyon.....	52
4.1.3.3. E ^M 3 grubu için multipleks amplifikasyon.....	55
4.1.3.4. E ^M 4 grubu için multipleks amplifikasyon.....	59
4.2. Eş Zamanlı PCR ile Hedef Gıda Patojenlerin Kantitatif Olarak Belirlenmesi.....	62
4.2.1. Unipleks Real Time PCR şartlarının standardizasyonu ve mikroorganizma sayısına bağlı amplifikasyon kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması.....	64
4.2.1.1. <i>Brucella melitensis</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi.....	65
4.2.1.2. <i>Campylobacter jejuni</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi.....	68
4.2.1.3. <i>Clostridium perfringens</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi..	70
4.2.1.4. <i>Cronobacter sakazakii</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi...	72
4.2.1.5. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi.....	74
4.2.1.6. <i>Enterococcus faecalis</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi....	77
4.2.1.7. <i>Klebsiella pneumomania</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi..	79
4.2.1.8. <i>Listeria monocytogenes</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi..	81
4.2.1.9. <i>Staphylococcus aureus</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi...	83
4.2.1.10. <i>Salmonella enterica</i> miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi.....	85
4.2.2. Multipleks Real Time PCR.....	88
4.2.2.1. E ^R 1 grubu için Multipleks Real Time PCR.....	89
4.2.2.2. E ^R 2 grubu için Multipleks Real Time PCR.....	93
4.2.2.3. E ^R 3 grubu için Multipleks Real Time PCR.....	96
4.2.2.4. E ^R 4 grubu için Multipleks Real Time PCR.....	100
4.3. Oluşturulan Moleküler Metotların Gıda Örneklerinde Uygulanabilirliğinin Araştırılması.....	101
4.3.1. Et ve et ürünlerinde patojen varlığının geliştirilen E ^M 1-2 ve E ^R 1-2 protokolleri ile belirlenmesi.....	102
4.3.1.1. Koyun numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E ^M 1-2 ve E ^R 1-2 protokolleri ile belirlenmesi.....	102
<u>E^M1 ve E^M2 protokolleri ile belirlenmesi</u>	102
<u>E^R1 ve E^R2 protokolleri ile belirlenmesi</u>	106
4.3.1.2. Sığır numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E ^M 1-2 ve E ^R 1-2 protokolleri ile belirlenmesi.....	110
<u>E^M1 ve E^M2 protokolleri ile belirlenmesi</u>	110
<u>E^R1 ve E^R2 protokolleri ile belirlenmesi</u>	113
4.3.1.3. Tavuk numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E ^M 1-2 ve E ^R 1-2 protokolleri ile belirlenmesi.....	118
<u>E^M1 ve E^M2 protokolleri ile belirlenmesi</u>	118
<u>E^R1 ve E^R2 protokolleri ile belirlenmesi</u>	121
4.3.2. Süt ve süt ürünlerinde patojen varlığının geliştirilen E ^M 3 ve E ^R 3 protokolleri ile belirlenmesi.....	124
4.3.2.1. Peynir numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E ^M 3 ve E ^R 3 protokolleri ile belirlenmesi.....	124
<u>E^M3 protokolü ile belirlenmesi</u>	124
<u>E^R3 protokolü ile belirlenmesi</u>	127

4.3.2.2. Süt numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E ^{M3} ve E ^{R3} protokolleri ile belirlenmesi.....	129
<u>E^{M3} protokolü ile belirlenmesi</u>	129
<u>E^{R3} protokolü ile belirlenmesi</u>	131
4.3.3. Su numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E ^{M4} ve E ^{R4} protokolleri ile belirlenmesi.....	133
4.3.3.1. E ^{M4} protokolü ile belirlenmesi.....	133
4.3.3.2. E ^{R4} protokolü ile belirlenmesi.....	134
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	137
KAYNAKLAR.....	142
ÖZGEÇMİŞ.....	161



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 4.1. Referans suşların PCR amplifikasyonu.....	40
Şekil 4.2. E ^{M1} grubu (<i>C. perfringens</i> 279 bç, <i>E. faecalis</i> 310 bç ve <i>S. aureus</i> 791 bç) Multipleks PCR analizi sonucu elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü.....	48
Şekil 4.3. E ^{M1} grubu Cp2R ve Sa2R primerleri kullanılarak modifiye edilmiş Multipleks PCR amplifikasyon görüntüsü.....	49
Şekil 4.4. E ^{M1} grubu çoklu PCR amplifikasyon görüntüsü.....	51
Şekil 4.5. E ^{M2} grubu patojen mikroorganizmaların çoklu amplifikasyon görüntüsü.....	52
Şekil 4.6. E ^{M2} grubu (<i>C. jejuni</i> 857 bç, <i>E. coli</i> O157:H7 625 bç ve <i>S. enterica</i> 403 bç) çoklu amplifikasyon görüntüsü.....	53
Şekil 4.7. E ^{M2} grubu (<i>C. jejuni</i> 857 bç, <i>E. coli</i> O157:H7 625 bç ve <i>S. enterica</i> 403 bç) çoklu amplifikasyon görüntüsü.....	54
Şekil 4.8. E ^{M2} grubu (<i>E. coli</i> O157:H7 625 bç ve <i>S. enterica</i> 403 bç) çoklu amplifikasyon görüntüsü.....	54
Şekil 4.9. <i>C. sakazakii</i> (Cs) ve <i>L. monocytogenes</i> (Lm) mikroorganizmaları için farklı primer kombinasyonları kullanılarak elde edilen amplifikasyon görüntüsü.....	57
Şekil 4.10. E ^{M3} grubu farklı primer kombinasyonları ile amplifikasyon görüntüsü.....	58
Şekil 4.11. E ^{M3} grubu amplifikasyon görüntüsü.....	58
Şekil 4.12. E ^{M3} grubu amplifikasyon görüntüsü.....	59
Şekil 4.13. <i>A. hydrophila</i> , <i>B. cereus</i> ve <i>K. pneumoniae</i> patojenlerinin belirlenmesi.....	60
Şekil 4.14. <i>A. hydrophila</i> , <i>B. cereus</i> ve <i>K. pneumoniae</i> patojenlerinin multipleks (ikili ve üçlü) PCR şartlarında belirlenmesi.....	61
Şekil 4.15. Real Time PCR amplifikasyon grafiğinin şematik gösterimi.....	63
Şekil 4.16. <i>B. melitensis</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	66
Şekil 4.17. <i>B. melitensis</i> BMEH0466 hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	67

Şekil 4.18. <i>B. melitensis</i> BMEII0466 hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	67
Şekil 4.19. <i>C. jejuni</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	68
Şekil 4.20. <i>C. jejuni</i> <i>hipO</i> hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	69
Şekil 4.21. <i>C. jejuni</i> <i>hipO</i> hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	69
Şekil 4.22. <i>C. perfringens</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	70
Şekil 4.23. <i>C. perfringens</i> <i>plc</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	71
Şekil 4.24. <i>C. perfringens</i> <i>plc</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	72
Şekil 4.25. <i>C. sakazakii</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	73
Şekil 4.26. <i>C. sakazakii</i> <i>mms</i> operon geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	74
Şekil 4.27. <i>C. sakazakii</i> <i>mms</i> operon geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	74
Şekil 4.28. <i>E. coli</i> O157:H7 referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	75
Şekil 4.29. <i>E. coli</i> O157:H7 <i>stx2</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	76
Şekil 4.30. <i>E. coli</i> O157:H7 <i>stx2</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	76
Şekil 4.31. <i>E. faecalis</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	77
Şekil 4.32. <i>E. faecalis</i> 16S rRNA geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	78
Şekil 4.33. <i>E. faecalis</i> 16S rRNA geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 4.34. <i>K. pneumannia</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	79
Şekil 4.35. <i>K. pneumannia</i> <i>phoE</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	80
Şekil 4.36. <i>K. pneumannia</i> <i>phoE</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	81
Şekil 4.37. <i>L. monocytogenes</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	82
Şekil 4.38. <i>L. monocytogenes</i> <i>hly</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	83
Şekil 4.39. <i>L. monocytogenes</i> <i>hly</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	83

Şekil 4.40. <i>S. aureus</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	84
Şekil 4.41. <i>S. aureus nuc</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	85
Şekil 4.42. <i>S. aureus nuc</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	85
Şekil 4.43. <i>S. enterica</i> referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği.....	86
Şekil 4.44. <i>S. enterica ttr</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	87
Şekil 4.45. <i>S. enterica ttr</i> geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	87
Şekil 4.46. E ^R 1 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi.....	92
Şekil 4.47. E ^R 1 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi.....	93
Şekil 4.48. E ^R 2 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi.....	95
Şekil 4.49. E ^R 2 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi.....	96
Şekil 4.50. E ^R 3 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi.....	99
Şekil 4.51. E ^R 3 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi.....	100
Şekil 4.52. <i>C. perfringens</i> (934 bç) patojen mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	103
Şekil 4.53. <i>S. aureus</i> (728 bç) patojen mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	103
Şekil 4.54. <i>E. coli</i> O157:H7 (625 bç) mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	104
Şekil 4.55. <i>E. faecalis</i> (310 bç) patojen mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	104
Şekil 4.56. <i>S. enterica</i> (403 bç) mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	105
Şekil 4.57. <i>C. perfringens</i> (934 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	111
Şekil 4.58. <i>E. faecalis</i> (310 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	111
Şekil 4.59. <i>S. aureus</i> (728 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	112
Şekil 4.60. <i>E. coli</i> O157:H7 (625 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	112

Şekil 4.61. <i>S. enterica</i> (403 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	112
Şekil 4.62. <i>C. perfringens</i> (934 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	119
Şekil 4.63. <i>E. faecalis</i> (310 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	119
Şekil 4.64. <i>S. aureus</i> (728 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	120
Şekil 4.65. <i>E. coli</i> O157:H7 (625 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	120
Şekil 4.66. <i>S. enterica</i> (403 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü.....	120
Şekil 4.67. <i>B. melitensis</i> (223 bç) mikroorganizmasının peynir numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	125
Şekil 4.68. <i>C. sakazakii</i> (505 bç) mikroorganizmasının peynir numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	125
Şekil 4.69. <i>L. monocytogenes</i> (803 bç) mikroorganizmasının peynir numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	126
Şekil 4.70. <i>B. melitensis</i> (223 bç) mikroorganizmasının süt numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	130
Şekil 4.71. <i>C. sakazakii</i> (505 bç) mikroorganizmasının süt numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	130
Şekil 4.72. <i>L. monocytogenes</i> (803 bç) mikroorganizmasının süt numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	130
Şekil 4.73. <i>K. pneumoniae</i> (458 bç) patojeninin su numuneleri Unipleks PCR görüntüsü.....	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans suşlar ve büyüme koşulları.....	31
Çizelge 3.2. Patojen mikroorganizmaların gıda numunelerine göre gruplandırılması.....	32
Çizelge 3.3. Konvansiyonel PCR için belirlenen primer listesi.....	34
Çizelge 3.4. Real Time PCR analizinde kullanılacak primerlerin listesi.....	36
Çizelge 4.1. PCR amplifikasyonu ile elde edilen tanımlama fragmentlerinden okunan nükleotid dizileri.....	43
Çizelge 4.2. E ^{M3} grubu patojen mikroorganizmaların multipleks PCR reaksiyonunda belirlenmesinde kullanılan primerler.....	55
Çizelge 4.3. E ^{M3} grubuna ait patojen mikroorganizmalar için farklı primer kombinasyonları.....	56
Çizelge 4.4. <i>B. melitensis</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	66
Çizelge 4.5. <i>C. jejuni</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	68
Çizelge 4.6. <i>C. perfringens</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	71
Çizelge 4.7. <i>C. sakazikii</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	73
Çizelge 4.8. <i>E. coli</i> 157:H7 patojeni için için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	75
Çizelge 4.9. <i>E. faecalis</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	78
Çizelge 4.10. <i>K. pneumannia</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	80
Çizelge 4.11. <i>L. monocytogenes</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	82
Çizelge 4.12. <i>S. aureus</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	84
Çizelge 4.13. <i>S. enterica</i> patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	86
Çizelge 4.14. E ^{R1} grubu için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	90
Çizelge 4.15. E ^{R2} grubu için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	94
Çizelge 4.16. E ^{R3} grubu için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler.....	98

Çizelge 4.17. Koyun eti numunelerinin (boyun bölgeleri) E ^{R1} ve E ^{R2} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	107
Çizelge 4.18. Koyun eti numunelerinin (karaciğer dokusu ve şüpheli doku) E ^{R1} ve E ^{R2} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	108
Çizelge 4.19. Sığır eti numunelerinin (boyun bölgeleri) E ^{R1} ve E ^{R2} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	114
Çizelge 4.20. Sığır eti numunelerinin (karaciğer bölgeleri ve şüpheli doku) E ^{R1} ve E ^{R2} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	115
Çizelge 4.21. Tavuk eti numunelerinin E ^{R1} ve E ^{R2} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	122
Çizelge 4.22. Peynir numunelerinin E ^{R3} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	128
Çizelge 4.23. Süt numunelerinin E ^{R3} Multipleks Real Time PCR sonuçları.....	132
Çizelge 4.24. Su numunelerinin E ^{R4} Real Time PCR sonuçları.....	135

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
Ah	<i>Aeromonas hydrophila</i>
ark	Arkadaşları
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
bç	Baz çifti
BHI	Brain Heart Infusion
Bm	<i>Brucella melitensis</i>
C	Sitozin
Cj	<i>Campylobacter jejuni</i>
Cp	<i>Clostridium perfringens</i>
Cs	<i>Cronobacter sakazakii</i>
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
EcO	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
Et-Br	Etidium Bromür
g	Gravity
G	Guanin
kob	Koloni oluşturma birimi
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMA	Propidiyum Monoazit
rpm	Dakikada devir
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Se	<i>Salmonella enterica</i>
ssp.	Alt tür
T	Timin
Tm	Primer erime sıcaklığı
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth
UV	Ultra viole

1. GİRİŞ

1.1. Gıda Kaynaklı Hastalıklar

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar mikroorganizmalar tarafından kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu ortaya çıkan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hastalık, ölüm ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan gıda kaynaklı mikrobiyal patojenler gıdaların üretilmesi, işlenmesi, taşınması, satışa sunulması ve tüketilmesi gibi herhangi bir aşamada gıdalara bulaşmakta ve insanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. Mikrobiyal patojenlerin genellikle zor ortam koşullarında bile hayatta kalabilecek bir metabolik mekanizmaya sahip olmaları, onların hastalık etkeni olmasındaki en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar genellikle bitki veya hayvan kaynaklı olmaktadır. Hastalık en çok bebekler, çocuklar, yaşlılar ve hastalar gibi bağışıklık sistemi zayıf bireylerde görülmekle beraber ekonomik olarak az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde daha sık rastlanmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar son dönemlerde önemli bir artış göstermektedir. Buna neden olan faktörler arasında gıda endüstrisinin küreselleşmesi insanların yaşam ve yeme alışkanlıklarının değişmesi, çevre kirliliği, uluslararası seyahat, iklim değişiklikleri ve mikroorganizma popülasyonlarındaki değişimler gösterilmektedir (Velusamy ve ark., 2012).

Kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu, patojenin kendisi veya toksinleri sindirim sisteminde bulunan epitel hücrelerden geçerek, genellikle gıdanın tüketilmesinden birkaç saat sonra ishal, bulantı, kusma gibi klinik belirtiler göstermektedir.

Mikrobiyal patojenler gıdalara enfeksiyon, toksikasyon ve toksienfeksiyon olarak bilinen üç farklı yolla bulaşmaktadır. Bu bulaşma yollarında hastalık ajanı ya patojen mikroorganizmanın ya ta kendisi ya da ürettiği toksinlerdir (Bhunia, 2008; Aytaç ve ark., 2014). *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 gibi patojen mikroorganizmalar gıdalara bulaşmakta, gıdanın tüketilmesi ile canlı vücuduna girmekte ve buradaki varlığı veya ürettiği metabolik ürünleri ile enfeksiyon oluşturmaktadır. *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* ve *Staphylococcus aureus* gibi mikrobiyal patojenler ise ürettikleri toksinleri içeren kontamine gıdaların canlı vücuduna alınması sonucu hastalığa neden olmaktadır (Velusamy ve ark., 2012). Toksienfeksiyonda ise gıdalar aracılığı ile vücuda alınan *Clostridium perfringens* gibi canlı patojen mikroorganizmaların tüketilmesi

ve daha sonra bu mikroorganizmaların vücutta sporlanma, kolonizasyon ve toksin üretmesi ile oluşmaktadır (Aytaç ve ark., 2014).

Patojen bir mikroorganizma konakçının mukoza hücrelerine bağlanarak hücreye giriş yapmaktadır. Konakçı hücrede kolonize olmakta, takiben konakçı organizmanın savunma sistemini engelleyebilmekte ve hastalığa yol açma yetisi ile organizmaya zarar verebilmektedir (Naharro ve ark., 2009).

Mikrobiyal patojenler kontamine gıdalarda belirli bir mikrobiyal yüke ulaştığında enfeksiyon oluşturabilirler. Bu sayısal değer enfeksiyon dozu olarak tanımlanmaktadır. Patojen mikroorganizmaların bazılarında enfeksiyon dozu yüksek (*Salmonella* gibi) bazılarında ise düşük (*E. coli* O157:H7 gibi) olabilmektedir. Dolayısıyla enfeksiyon dozu mikroorganizmalar arasında hatta bireyler arasında bile farklılık gösterebilmektedir (Bhunja, 2008).

1.2. Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Mikroorganizmalar

1.2.1. *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila Aeromonadaceae familyası üyeleri arasında yer alan gram negatif bir bakteri türüdür. Genel özellikleri aerobik veya fakültatif anaerobik, çubuk veya kokobasil şeklinde, optimum gelişme sıcaklığı 22-28°C olan, katalaz pozitif, oksidaz pozitif, nitratı nitrite indirgeyen, sporsuz ve kapsülsüzdürler. Tek bir polar flagelluma sahip olmalarından dolayı hareketlidirler.

Bu türün doğal habitatı sucul ekosistemler olmakla birlikte gıdalarda da rastlanmaktadır. Su ve gıdalardan bulaşması ile özellikle bağışıklık sistemi zayıf bireylerde hastalık oluşturabildiği için potansiyel bir hastalık ajanı olarak görülmektedir. İnsanlarda *Aeromonas* enfeksiyonları ilk olarak 1950'li yıllarda insan kas hücrelerinde rapor edilmiştir (Hill ve ark., 1954). *Aeromonas* türleri kendilerine ait hücre ile ilgili ve hücre dışı virülans faktörleri ile insanlarda hastalık oluşturabilmektedir. Lipopolisakkaritler, dış membran proteinleri, kapsüller, flagellalar gibi hücre yüzeyindeki yapılar hücre ile ilgili virülans faktörler arasında yer alırken sitotonik, sitolitik, hemolitik, enterotoksik, lipolitik ve proteolitik proteinler ise hücre dışı virülans faktörler olarak bilinmektedir (Naharro ve ark., 2009).

S-layer proteinleri *A. hydrophila* patojeninde karakterize edilmiş önemli virülans faktörlerden biridir. Dış membranı kuşatan bu proteinlerin bakterisit serum özelliğine karşı koruma sağlaması, proteolizden hücreleri koruması, kolonizasyonda etkin olması gibi görevleri ile virülans özellik göstermektedir. Lipopolisakkaritlerden olan O-antijen ise kolonizasyon ve konakçıya bağlanmada rol oynamaktadır. *Aeromonas* türlerinin ürettikleri hücre dışı enzimlerden biri olan proteazlar patojenitede önemli derecede etkin olan enzimdir (Naharro ve ark., 2009; Casabianca ve ark., 2015). Bunun yanında *Aeromonas* türleri hemolizin, sitotoksik ve sitotonik enterotoksinler gibi birkaç toksin üretmektedirler (Citterio ve Biavasco, 2015). Hemolizin grubunda yer alan ‘aerolysin (AerA)’ toksinini kodlayan gen moleküler düzeyde sıklıkla çalışılmaktadır. Aerolysin kodlayan gen bütün *Aeromonas* türlerde bulunmakta ve çevre koşullarına göre genin ifade düzeyi değişebilmektedir (Naharro ve ark., 2009).

Bu patojen akut gastroenterit, septisemi, menenjit, klora benzeri hastalık, hemolitik üremik sendrom gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Enfeksiyon kaynağı su ve toprak ile temas yoluyla gerçekleşmektedir (Casabianca ve ark., 2015). Bu patojenin hastalık oluşturabilmesi için mikrobiyal yükünün (enfeksiyon dozu 10^{10} kob/g) fazla olması gerekmektedir (Naharro ve ark., 2009).

1.2.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus türü Bacillaceae familyasında yer alan, gram pozitif, aerobik bir bakteridir. Çubuk şeklinde, spor oluşturan, mezofilik, flagellumları sayesinde hareketlidir. Doğal habitatları toprak olan bu patojen en önemli kaynağı bitkiler olup et ve et ürünleri ile süt ve süt ürünlerinde de rastlanmaktadır.

Bu mikroorganizmanın iki patojenite mekanizması ve dolayısıyla iki farklı hastalık tipi bulunmaktadır. Birinci hastalık tipi kontamine olmuş gıda maddesinde bulunan, emetik (kusturucu) suşlar tarafından üretilmiş emetik toksinin gıdalar aracılığıyla sindirilmesinden 1-6 saat sonra klinik belirtiler göstermektedir. Diğer hastalık tipi ise gıdalar aracılığıyla canlı hücrelerin veya sporların sindirilmesinden 8-16 saat sonra *B. cereus* suşlarının oluşturduğu bir veya birden çok toksinin neden olduğu mide bağırsak enfeksiyonlarıdır (Yamaguchi ve ark., 2013; Forghani ve ark., 2015).

Emetik toksin, emetik *B. cereus* suşlarında bulunan, non-ribozomal peptid sentetaz sistemi (*ces* geni ile) tarafından üretilen düşük bir moleküler ağırlığa sahip (1,2 kDa)

nonribozomal dodecadepsipeptitdir. Bu toksin yüksek ısı, asit ve proteaza dirençlidir. Toksinin gıdalar aracılığıyla vücuda alınmasından sonra kusma başta olmak üzere karın ağrısı ishal gibi semptomlar göstermekte, bazı durumlarda ise karaciğer yetmezliği ve ölüm gibi ciddi intoksikasyonlara neden olmaktadır (Okstad ve Kolsto, 2011; Yamaguchi ve ark., 2013).

B. cereus patojeninin enterotoksin aktivitesi tam olarak çözümlenmemesine rağmen hemolizin BL (Hbl, üç komponentli toksin), hemolitik olmayan enterotoksin (Nhe, üç komponentli toksin) ve cytotoxin K (CytK, β -varil por oluşturucu toksin ailesinin tek komponentli toksini) gibi yüksek moleküler ağırlıklı sitotoksinler *B. cereus*'un diyare sendromunun nedeni olarak düşünülmektedir. Bu hastalık tipinin semptomları ise ishal başta olmak üzere karın ağrısı bulantı ve nadir olarak ise kusma şeklindedir (Okstad ve Kolsto, 2011).

Hastalığa neden olan gıdalar sebze, pirinç ve makarna gibi nişastalı gıdalar, su, et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri olarak belirtilmektedir. Bu mikroorganizmanın virülans özelliklerini gösterebilmesi için mikrobiyal yükünün fazla olması gereklidir. Enfeksiyon dozu ise 10^5 - 10^8 kob canlı hücre veya spor olarak bilinmektedir (Bhunja, 2008; Yamaguchi ve ark., 2013).

1.2.3. *Brucella melitensis*

Brucella türleri gram negatif bakteriler olup hareketsiz, spor oluşturmeyen, tercihen hücre içi kokobasillerdir. % 10 karbondioksit gereksinimi ile mikroaerofilik bir bakteridir. *Brucella* cinsi konak özgüllüğüne ve biyokimyasal özelliklere göre altı tür ve kendi içlerinde farklı sayıda biyotipler içermekle birlikte *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* bu cinse ait en yaygın olarak bilinen patojen bakterilerdir. Bu bakteriler koyun, keçi, sığır ve köpek gibi hayvan türlerinde ve insanlarda zoonotik bir enfeksiyon olan Bruselloz hastalığına neden olmaktadır (De Santis ve ark., 2011; Capuano ve ark., 2013).

Patojen *Brucella* türleri güçlü doku yönelmesi gösterirler ve makrofajların vakuollerinde, dendritik hücrelerde ve plasental trofoblastlarda replike olmaktadır. Bununla birlikte, patojen mikrogliyal, fibroblastlar ve endotel hücreleri dahil çok çeşitli memeli hücre tiplerinde replike olma yeteneğine sahiptirler. *Brucella*'nın hücre içi yaşamı, konak tabiatına maruz kalmayı ve adaptif bağışıklık cevaplarını sınırlamakta, organizmayı bazı antibiyotiklerin etkilerinden mahrum bırakmaktadır. Enfekte olmuş konak hücrelerde

genellikle üç farklı fazda patolojik özelliklerini göstermektedirler. Bu fazlar ise klinik semptomlar belirgin olmadan önceki inkübasyon fazı, patojenin konak dokusunu istila edip yayıldığı akut fazı ve er ya da geç şiddetli organ hasarı ile konak organizmanın ölümüyle sonuçlanabilen kronik fazdır. Ateşlenme, terleme, bitkinlik, iştahsızlık, adale ağrısı ve eklem ağrısını gibi grip benzeri semptomlar insanlarda gözlenmemektedir (Figueiredo ve ark., 2015).

Brucella türleri genellikle insanlara enfekte olmuş hayvanlar ile direk temas yoluyla, bu hayvanların vücut sıvıları ile dolaylı olarak veya özellikle çiğ süt ve pastörize olmamış günlük ürünler ile dolaylı olarak kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi ile bulaşabilmektedir. Enfeksiyon genellikle insanlarda iştahsızlık, halsizlik, ateş, yaygın kas ve eklem ağrıları gibi klinik semptomlar göstermektedir (Capuano ve ark., 2013). Malta humması veya Akdeniz humması olarak da bilinen Bruselloz tüm dünyada rastlanmakla birlikte özellikle Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir.

1.2.4. *Campylobacter jejuni*

Campylobacteraceae familyasına ait *Campylobacter jejuni* gram negatif, mikroaerofilik (% 85 nitrojen, % 10 karbondioksit ve % 5 oksijen), optimum büyüme sıcaklığı 42°C olan, sarmal şeklinde ve hareketli bir zoonotik patojendir. *Campylobacter* türleri evcil ve yabani hayvanların normal bağırsak florasında bulunduğu için dolaylı olarak hayvanlardan bulaşarak enfeksiyon oluşturma ihtimali yüksektir.

C. jejuni'nin virülans mekanizmasının anlaşılmasındaki yetersizlik ve kısmen de olsa hastalık için elverişli hayvan modelinin bulunmamasından dolayı tam olarak anlaşılabilmemiştir. Bununla birlikte, *C. jejuni* patojeninin virülans moleküler mekanizması ile ilgili son gelişmeler, kolonileşme, tutunma ve istilayla ilişkili 30'dan fazla proteinin N-bağlı glikozilasyonu yürütme yeteneğinde olan eşsiz bir patojen olduğunu açığa çıkarmıştır. *C. jejuni*'nin sahip olduğu kamçılar sadece hareketliliği kolaylaştırmadan sorumlu değil, aynı zamanda istilacı *Campylobacter* antijenlerinin (Cia) salgılanmasında da görev almaktadır. *C. jejuni* patojeni tek toksini olan sitoletal toksini hücre döngüsü kontrolü ile konak hücresi apoptozisinin tetiklenmesi için önemli görülmektedir ve en önemli virülans faktörlerden biri olarak tanımlanmıştır. Diyare yapan diğer bakterilerin tersine, henüz *C. jejuni*'de başka bir virülans faktör tanımlanmamıştır. Bunun yerine, konakçı kaynaklı faktörlerin insanda *Campylobacter* patojenitesi için önemli bir görev aldığı görülmektedir (Dasti ve ark., 2010).

Campylobacter türleri arasında insanlarda hastalıktan sorumlu *C. jejuni* ve *C. coli* olmak üzere iki tür tanımlanmıştır. Ama Campylobakteriyosiz hastalığına % 85 oranla *C. jejuni* neden olmakta, *C. coli* ise sadece % 10 oranla ondan sonra gelmektedir. Hastalığın sulu ve sık sık kanlı ishal, karın ağrıları, kusma ateş gibi klinik belirtiler yanında bazı durumlarda Guillain Barre sendromu gibi ciddi kronik hastalıklara yol açtığı belirtilmiştir (He ve Chen, 2010; Gardner ve ark., 2011; Kay ve ark., 2011).

Hastalık genellikle süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri gibi gıdalar ile bulaşmaktadır. Bu patojenin enfeksiyon dozu 500-10,000 hücre olduğu düşünülmekte ve enfeksiyon dozu patojen saldırısının yoğunluğu ile ilişkilendirilmektedir (Bhunja, 2008).

1.2.5. *Clostridium perfringens*

Bacillaceae familyasına ait, gram pozitif, anaerobik, hareketsiz, sporlu ve çubuk şeklinde mezofilik bir bakteridir. *Clostridium* türleri spor oluşturma özelliklerinden dolayı insan ve hayvanların sindirim sistemlerinde ve çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Ürettikleri toksinler nedeniyle insan ve hayvanlarda diğer bakterileri göre daha ölümcül olabilmektedir. *Clostridium* türleri arasında özellikle *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum* gıda kaynaklı hastalıklardan sorumlu bakterilerdir (Jacobson ve ark., 2011).

C. perfringens suşları ürettikleri toksinlere göre A, B, C, D ve E olarak 5 toksin tipine ayrılmış ve toksinler ise kendi içinde alfa, beta, epsilon ve ioata olarak 4 gruba ayrılmışlardır. Bu toksin tipleri bir veya birkaç toksin içermektedir. Patojen özelliği taşıyan, alfa toksini içeren genellikle A grubu türler olmakla birlikte alfa ve beta toksinleri taşıyan C grubu türlerde de nadir de olsa hastalık görülebilmektedir. A ve C tipleri fenotipik olarak ayırt edilememekte, sadece beta toksin varlığından ayırım yapılabilmektedir. A toksin tiplerinde hastalık karın ağrısı ve ishal gibi belirtiler gösterirken C toksin tiplerinde enterit nekrotikan gibi ölüme neden olabilen ciddi hastalıklara yol açabilmektedir (Baums ve ark., 2004; Songer, 2010).

Hastalığa neden olan gıdalar özellikle tavuk eti ve diğer et ürünleridir. Kontamine gıdaların tüketilmesi ile bağırsaklarda spor oluşumu ve toksin oluşumu ile hastalık patojenitesini göstermektedir (Songer, 2010). Enfeksiyon dozu ise yaklaşık 10^7 - 10^9 kob/g olarak belirtilmiştir (Bhunja, 2008).

1.2.6. *Cronobacter sakazakii*

Enterobacteriaceae familyası üyeleri arasında, gram negatif, fakültatif anaerobik, çubuk şekilli ve hareketli fırsatçı bir patojen bakteridir. Önceleri sarı pigmentli *Enterobacter cloacae* olarak bilinen bu tür 1980 yılında *Enterobacter sakazakii* olarak yeniden tanımlanmış (Farmer ve ark., 1980) ve Iverson ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada yeni bir cins (*Cronobacter*) üyesi olarak yeniden sınıflandırılmıştır.

C. sakazakii patojenite mekanizması tam anlamıyla açıklanamamıştır. Bununla birlikte, yenidoğan konak dokuya yapışmasını ve işgalini kolaylaştıran yüzey proteinlerinin tanımlanması bu alana katkıda bulunmuştur. Fibronektin bağlama proteini olan OmpA proteinin mide bağırsak sisteminin konakçı hücre istilasında önemli görevler üstlendiği ve aynı zamanda istilayı kolaylaştırmadan sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Feeney ve ark., 2014).

Bu patojenin kaynağı tam olarak bilinmemesine rağmen bitki materyallerinin önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (Healy ve ark., 2010). Bebek mamaları başta olmak üzere süt, peynir, et, su ve sebze gibi birçok gıdadan izole edilmiştir (Seo ve Brackett, 2005; Cawthorn ve ark., 2008; Baumgartner ve ark., 2009; Chen ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012). *C. sakazakii* özellikle yeni doğan ve bebeklerde menenjit, bakteriyemi, nekrotizan enterokolit, septisemi ve beyin apsisi gibi farklı enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmektedir (Gentil ve ark., 2005; Strydom ve ark., 2012). Bu patojenin enfeksiyon dozu ise 10^3 kob7g olarak belirtilmiştir (Strydom ve ark., 2012).

1.2.7. *Enterococcus faecalis*

Enterococcaceae familyası üyesi olan, gram pozitif, hareketsiz, aerobik, katalaz negatif, mezofilik bir bakteri olan *Enterococcus faecalis* doğal habitatları olan insan ve hayvan sindirim sisteminde ortakçı bir bakteridir ve zor çevre koşullarında bile uzun süre yaşamını sürdürebilmektedir. Toprak, su, bitki ve hayvan orjinli gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Jamet ve ark., 2012; Arris ve Murray, 2012). Bu patojen bakteri toplum ve hastane enfeksiyonlarına neden olan önemli patojen mikroorganizmalar arasında yer alır. Güçlü bir antimikrobiyal direnç mekanizmasına sahip olması ve virülans özellikleri ile enfeksiyona yakalanmış hastalarda ciddi problem oluşturabilmektedirler (Medeiros ve ark., 2014; Vidana ve ark., 2016).

E. faecalis virülans faktörlerinin konakçının hücre zarına ve çevresel yüzeye bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Böylece hem besin kaynağı elde edebilmekte hem de konakçının savunma sisteminden kurtulabilmektedir. Virülans faktörlerden biri olan hücre dışı yüzey proteinleri (Esp) hücre duvarı proteinleri ile ilişkilendirilmiş, konakçıda kolonizasyon ve direnme amaçlı görevler üstlendiği belirtilmiştir. Adhezyon hücre yüzey proteini olan kollajen (Ace) konakçı hücre matriks proteinleri ile bakterinin ilişkisinde aracılık etmekte, aynı zamanda endokarditisde patojeniteye katkıda bulunmaktadır. Jelatinaz ve sitolizin hücre dışı proteinler olup virülans özellik göstermektedir. Feromon tarafından uyarılan yüzey proteinleri olan Agregasyon maddeleri de ökaryotik hücrelere yapışma ve konjugasyon esnasında hücreler arası iletişimde görev almaktadır (Medeiros ve ark., 2014).

İnsanlarda endokarditis, septisemi, idrar yolları enfeksiyonu, yara enfeksiyonları, yeni doğan enfeksiyonları, bakteriyemi ve menenjit gibi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Jamet ve ark., 2012; Medeiros ve ark., 2014; Anderson ve ark., 2016; Vidana ve ark., 2016). Hastalığa neden olan kontamine gıdalar ise et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri olarak belirtilebilir. Mikroorganizmanın enfeksiyon dozu ise yüksek olup 10^7 kob/g'dir.

1.2.8. *Escherichia coli* O157:H7

Enterobacteriaceae familyası üyesi olmakla birlikte gram negatif, aerobik, hareketli, sporsuz, sorbitali fermente edemeyen, çubuksu, oksidaz negatif katalaz pozitif ve mezofilik bir organizma olarak tanımlanmaktadır. *E. coli* normalde memeli hayvanların kalın bağırsağında bulunan faydalı bir bakteri olup dış ortamlarda bulunması hastalık indikatörü olarak kabul edilmektedir. Bağırsak hastalıklarından izole edilen *E. coli* suşları spesifik virülans faktör ve fenotipik özelliklerine göre enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), entero invazif *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), difüz aderans *E. coli* (DAEC) ve verotoksin üreten *E. coli* (VTEC) olarak 6 gruba ayrılmaktadır. Bu altı grup arasında enterohemorajik *E. coli* (EHEC) veya shiga benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak da tanımlanan ve verotoksin üreten *E. coli* grubu diğer gruplara göre gıda kaynaklı hastalıklarla daha çok ilişkilendirilmiştir (Newell ve ark., 2010).

Verotoksin üreten bu grubun en önemli patojen serotipi *E. coli* O157:H7 olmasına rağmen *E. coli* O26:H11, *E. coli* O103:H2, *E. coli* O145:H28 ve *E. coli* O111:H8 serotipleri de insanlarda virülans etkiye yol açmaktadır (Lin ve ark., 2011). *E. coli* O157:H7 patojeni aside dirençli olduğu için mideden direk geçerek ince bağırsağa uzanır ve küçük bir

enfeksiyon dozu (50-100 hücre) ile patojenitesini gösterebilmektedir (Bhunia, 2008). Kontamine olmuş et ve taze sebzelerin tüketimi ile insanlarda ciddi enterohemorajik hastalıklara neden olmaktadır. Sığır ve diğer ruminant hayvanlar birincil kaynak olarak tanımlanmakla birlikte, çeşitli gıda ve çevresel etmenlerde uzun süre yaşayabilme kabiliyetine sahiptir (Islam ve ark., 2016).

Shiga toksini bu patojen tarafından salgılanmakta olup birincil virülans faktör olarak bilinmekle, shiga toksini tip 1 (stx1) ve shiga toksini tip 2 (stx2) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Bu toksinlerin endoplazmik retikuluma iletilmesi ile konak hücredeki protein sentezi inhibe edilmekte, ribotoksik stres yanıtı aktive edilmekte, endoplazmik retikulum stres yanıtı oluşmakta ve bazı durumlarda ise apoptoz ile sonuçlanmaktadır. Takiben ise intoksikasyon ve hücre ölümü gerçekleşebilmektedir (Lee ve ark., 2010).

Et, süt ürünleri ve sebzeler gibi kontamine olmuş gıdalarla bulaşan *E. coli* O157:H7 patojeni insanlarda hemorajik kolit veya hemolitik üremik sendrom gibi ciddi hastalıklara neden olabilmektedir (Yoshitomi ve ark., 2012). *E. coli* O157:H7 için enfeksiyon dozu ise 10^1 - 10^2 kob/g'dır (Bhunia, 2008).

1.2.9. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae bakterisi Enterobacteriaceae familyasında, gram negatif, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz pozitif, oksidaz negatif, aerobik, 37 °C'de optimum gelişme gösteren bir fırsatçı patojendir. Doğal habitatları insan bağırsakları olmakla birlikte su ve toprak gibi ekolojik çevrede de rastlanmaktadır.

Klebsiella kaynaklı hastalık sıklıkla insandan insana bulaşan nozokomiyal (hastane kökenli) enfeksiyonların nedenlerinden biridir. *Klebsiella* patojeni idrar yolu enfeksiyonları, pnemoni, menenjit, yara enfeksiyonları, bakteriyemi ve iltihaplı apse gibi geniş bir enfeksiyon spektrumuna sahiptir (Siu ve ark., 2012).

En az 78 kapsül (K antijeni) serotip *K. pneumoniae* patojeni için tanımlanmıştır. K1 ve K2 serotipleri başta olmak üzere bu serotiplerden birkaçı kapsül polisakkarit üretiminin artması (CPS) nedeniyle eşsiz bir hipervirülant özellik göstermektedir (Compain ve ark., 2014; Li ve ark., 2014). CPS, *K. pneumoniae*'nin en önemli virülans faktörüdür ve fagositoz direncinde, erken iltihap cevabının baskılanmasında, antimikrobiyal peptidlere dirençte, hücre olgunlaşmasının inhibisyonunda önemli görevler üstlenmektedir. İlâveten, *K. pneumoniae* lipopolisakkaritler, fimbria, dış zar proteinleri gibi virülans faktörler

içermektedir (Li ve ark., 2014). Su ve su ürünleri başta olmak üzere taze sebzeler ve ekimi yapılan gıda ürünleri hastalık kaynağı olan gıdalar arasında yer almakta ve enfeksiyon dozu ise 10^8 kob/g'dır.

1.2.10. *Listeria monocytogenes*

Listeria familyasında bulunan *Listeria monocytogenes* gram pozitif, fakültatif anaerobik, sporsuz ve psikotrof olmasına rağmen 37 °C'de gelişebilen bir bakteridir. İlk olarak *Listerella* olarak bilinen ve *Listeria* olarak tekrar tanımlanan cins *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeria*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* alttür *ivanovii*, *L. ivanovii* alttür *londoniensis*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* ve *L. grayi* olmak üzere 10 tür içermektedir. Bu türlerden sadece *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* virülans özellik taşımakta diğer türler ise patojenite göstermemektedir (Mraheil ve ark., 2013).

İnsanlarda Listeriozis hastalığına neden olan en önemli tür *L. monocytogenes* türü olup bu patojenin etkili virülans faktörü listeriolizin O'dur. Listeriolizin O, β -hemoliz üreten bir hemolizindir. Patojen suşlar ramnozdan asit oluşturarak ve kanlı agarda β -hemoliz üreterek belirlenebilir (Jay ve ark., 2000).

Bu organizmanın konak hücrenin bariyerlerini geçerek internalin ve çeşitli salgı sistemlerini kullanarak hücre yüzeyinin ilerisine doğru proteinleri salgılama yeteneği vardır. Internalin ailesi virülans özellik taşıyan önemli proteinlerden oluşmaktadır. Internalin A (InlA) ve B (InlB) konakçıyı işgal etme durumunda temel bir göreve sahiptir. *L. monocytogenes* önemli görevleri olan *Listeria* patojenite adaları (LIPI) ve *Listeria* genomik adaları (LGI) gibi genomik adalar içermektedir. *hly*, *plcAB* ve *actA* gibi en önemli virülans genler LIPI-1 adasında bulunmaktadır (Zhang ve ark., 2016).

Menenjit, sepsitesi ve diğer merkezi sinir sistemi enfeksiyonları yaygın olarak Listeriozis hastalarında görülmektedir. Özellikle yaşlı, hamile, yenidoğan ve bağışıklık sistemi zayıf bireylerin hastalığa yakalanma riski daha fazladır. Hamile kadınlarda bu patojen ani düşüklere hatta ölü doğumlara bile neden olduğu belirtilmektedir. *L. monocytogenes* süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, taze sebzeler gibi birçok çiğ ve işlenmiş gıdalarda bulunabilmektedir (Gandhi ve Chikindas, 2007). Bu patojenin enfeksiyon dozu bilinmemekte fakat konağın bağışıklık sistemine bağlı olarak 10^1 - 10^6 kob/g arasında olduğu tahmin edilmektedir (Bhunja, 2008).

1.2.11. *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* gram negatif, aerobik veya fakültatif anaerobik, sporsuz, kapsülsüz, hareketli ve 20-40 °C'ler arasında üreyebilen bir bakteridir. *Salmonella*, Kaufmann-White şemasındaki kamçı (H-antijen) ve lipopolisakkaritlerde (O-antijen) bulunan antijenik varyasyonlara göre 2500 serotipe ayrılmaktadır. Bu cins biyokimyasal ve serolojik özellikleri ile farklılık gösteren *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki türe ayrılmaktadır. *Salmonella enterica* türü ise *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *indica* (IV), ve *S. enterica* subsp. *houtenae* (VI) olmak üzere altı alt tür içermektedir. Bu alt türlerden *S. enterica* subsp. *enterica* % 99 oranla hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalıklardan sorumludur (Canals ve ark., 2011).

Salmonella enfeksiyonları kompleks bir patojenite göstermektedir. Patojen kontamine olmuş gıdalar ile vücuda alınmakta, çeşitli saçaklı adezinler aracılığıyla konakçı hücre ile etkileşime geçmektedir. Konakçı-patojen etkileşimi ilk olarak epitel hücreler gibi fagositoz olmayan hücrelerin saldırısı ile başlamaktadır. Hücre içi bir patojen olduğu için fagositoz ile parçalanmaz ve konak hücrede çoğalabilmektedir (Hensel, 2004). Bu organizmanın virülans genleri kromozom üzerinde, patojen adaları olarak isimlendirilen bölgede lokalize olmuşlardır. Toplamda 12 patojen ada belirlenmiş, *S. enterica*'nın virülans faktörlerinin birçoğu bu adalarda bulunan genler tarafından kodlanmaktadır (Hensel, 2004; Canals ve ark., 2011).

Salmonella'nın neden olduğu Salmonellosis hastalığının en önemli etken serotipleri olarak *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis sayılabilir. (Mukhopadhyay ve Ramaswamy, 2012; Lungu ve ark., 2012). Bu patojenin enfeksiyon dozu $1-10^9$ kob/g gibi geniş bir aralığa sahiptir. Gönüllü yetişkin bireylerde yapılan çalışmalarda 10^5-10^{10} kob/g organizma aralığındaki enfeksiyon dozunun hastalık oluşturmada yeterli olduğu bildirilmiştir. Sıvı gıdalar veya mide asidini nötralize eden süt ve peynir gibi gıdalar tüketildiğinde enfeksiyon dozu azalmaktadır (Bhunia, 2008).

Yüksek ateş, halsizlik ve karın ağrısı gibi klinik belirtiler gösteren serotipler *Salmonella enterica* serovar Typhi ve *Salmonella enterica* serovar Paratyphi olarak bilinirken gastroenterit bulgular gösteren serotipler ise *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *Salmonella enterica* serovar Enteritidis'dir. Bu patojenler başta çiftlik

hayvanları olmak üzere et, yumurta ve süt gibi hayvan orjinli kontamine gıdalardan izole edilmiştir (Porwollik ve ark., 2004; Hadjinicolaou ve ark., 2009; Liu ve ark., 2012; Wong ve ark., 2013).

1.2.12. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcaceae familyasında, gram pozitif, fakültatif anaerobik, mezofil, sporsuz, hareketsiz, katalaz pozitif bir bakteri olup optimum 37 °C'de gelişme göstermektedir. *Staphylococcus* cinsi 30'dan fazla tür içermekte ve bunlar genellikle doğal habitatları olan memelilerin deri ve mukozası üzerinde bulunmaktadır. Bu türlerin hepsi insanlarda hastalık yapabilme özelliğine sahip olmasına rağmen sadece *S. aureus* en saldırgan ve gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan patojen tür olarak tanımlanmıştır.

Organizmanın sahip olduğu hücre yüzeyinde bulunan ve salgılanan virülans faktörler hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Yüzey virülans faktörleri mukozal yüzeye yapışarak ve fagositozise karşı direnç göstererek konak organizmada kolonize olmaktadır. Salgılanan virülans faktörler ise ekzoenzim ve ekzotoksinler ile birlikte konak organizmanın immun sistemini engelleyerek çevre dokulara yayılır ve konakçı hücreye hasar vererek besin ihtiyacını karşılamaktadır. Salgılanan faktörler toksik şok sendrom toksin-1, enterotoksin serotipleri (A, B, Cn, D gibi) ve enterotoksin benzeri serotipleri (J, K, L, M, N gibi) içermektedir (Elazhari ve ark., 2011).

Gıda zehirlenmesi patojenin ürettiği bu enterotoksinlerden kaynaklanmaktadır. Yaklaşık 19 tane enterotoksin protein ve genleri belirlenmiş ve bu enterotoksinler arasında en çok rastlanan ise enterotoksin A olduğu belirtilmiştir (Lindsay, 2011). Patojen mikroorganizma özellikle hemolizin ve lökotoksin üretmekte ve ürettiği toksinlerin çoğu biyolojik membrana zarar vererek hücre ölümüne neden olmaktadır (Otto, 2013).

Bu patojenin hastalık oluşturabilmesi için 10^5 - 10^8 kob/g enfeksiyon dozu yeterli olmaktadır (Bhunja, 2008). Hastalık belirtileri bulantı, kusma ve ishal şeklinde olmakta ve hastalığa neden olan gıdalar ise özellikle kırmızı et ve et ürünleridir.

1.3. Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmaların Tanımlanmaları

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların teşhisinde en önemli adım hastalık etkeni olan mikroorganizmaların tür olarak doğru tanımlanması ve mikrobiyal popülasyonlardaki düşük miktarlarının bile doğru belirlenmesidir. Gıda güvenliği ve insan

sağlığı açısından önem taşıyan mikrobiyal patojenlerin önüne geçebilmek ve potansiyellerinin belirlenebilmesi için iyi tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla birçok yöntem geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Gıda kaynaklı mikrobiyal patojenlerin tanımlamada kullanılan moleküler yöntemlerden PCR yaklaşımı konvansiyonel ve Real Time metodu olarak iki grupta toplanabilir.

1.3.1. Konvansiyonel tanımlama

Gıda kaynaklı mikrobiyal patojenlerin konvansiyonel yöntemler ile tanımlanması yıllardan beri uygulanan yöntemlerdir. İnsanlarda hastalık yapan bakterilerin tanımlanması 19. yüzyılın ortalarından itibaren başlamış ve tanımlamada bakterilerin büyüme şartları, koloni morfolojileri, boyama, metabolik karakterler ve serolojik testler gibi yöntemler kullanmıştır. Patojen mikroorganizmaları tanımlamada kullanılan konvansiyonel yöntemler kültür ve koloni morfolojisi bazlı yöntemler, immünolojik yöntemler ve moleküler yöntemler olarak sınıflandırılabilir.

Kültür ve koloni bazlı yöntemler mikrobiyolojik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan, ekonomik olmasına rağmen zaman ve emek isteyen yöntemlerdir. Kültür bazlı yöntemlerde hedef patojenin izolasyonu ve tanımlanması ilk aşamayı oluşturmaktadır. Takiben, seçici olmayan sıvı besiyerinde ön zenginleştirme, seçici sıvı besiyerinde zenginleştirme, ekim, teşhis, sayım ve doğrulama gibi aşamalardan oluşmaktadır. Kültürel yöntemlerde hedef mikroorganizma popülasyonu artırılır, ardından saf kültür elde edilerek kültürlerin fenotipik ve metabolik karakterlerine göre tanımlama yapılmaktadır (Bai ve ark., 2010).

Mikroorganizmalar en basit seviyede *in vitro* koşullarda büyüme şartlarına göre sınıflandırılmaktadır. Atmosferik koşullar ve ortam sıcaklığı sınıflandırmada önem taşımaktadır. Patojen mikroorganizmaların çoğu fakültatif anaerobik ve ortam sıcaklığı 20-40 °C arasında değişen büyüme özelliğindedir. Bu nedenle mikroorganizma tanımlamada farklı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Mikroorganizmaların koloni oluşturma yöntemleri de onları ayırt etmekte kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Agar besiyerinde oluşan kolonilerin ayrı veya grup halinde görülmesi, yuvarlak, çubuk veya virgül gibi görünüşleri veya gram boyama gibi teknikler mikroorganizma hakkında bilgi sunmaktadır. İlaveten oksidaz testi, şeker fermentasyon testi, indol testi, katalaz testi gibi basit biyokimyasal testler ile mikroorganizma hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilebilmektedir (Boer ve Beumer, 1999; Velusamy ve ark., 2010; Nannapaneni, 2012).

Kültür ve koloni bazlı yöntemler uzun zaman almakta ve bakteriler her durumda aynı fenotipik özellikleri göstermemektedir. Fenotipik özelliklere göre tanımlama ve sınıflandırma yapmakta oluşan sorunlar ve canlı hücrelerin kültüre alınamaması gibi olumsuzluklardan dolayı alternatif tanı yöntemleri geliştirilmiştir (Malorny ve ark., 2004). Bu tanı yöntemlerinden birisi de antijen antikor ilişkisine dayanan immunolojik bazlı yöntemlerdir. İmmunolojik bazlı yöntemler antijene spesifik antikor ya da antikora spesifik antijen aranması prensibine dayalı kalitatif ve kantitatif testleri içermektedir. Presipitasyon, aglutinasyon ve kompleman testleri çökelme ve bulanıklık oluşturarak antijen antikor birleşmesinin tespit edildiği, genellikle kalitatif olan analizlerdir. İmmunofloresans testler (IFA), Enzim Bağlı Immunosorbent testler (ELISA) ve Radioimmun testleri ise floresans, radyoaktif bir madde veya bir enzimle işaretlenmiş ikinci bir antikor kullanılarak antijen antikor birleşmesini kantitatif olarak analiz edebilmektedir. Bu testler arasında ELISA hızlı, güvenilir, hassas, insan ve çevreye zararlı radyoaktif madde kullanılmaması ve kantitatif analiz yapabilme özelliklerinden dolayı diğer testlere göre daha çok kullanım alanı bulmuştur. ELISA testi immünolojik ve enzimatik analizlerinin kombine edilmesi ile oluşan biyokimyasal bir tekniktir. Bu teknikte antikor antijen birleşmesi ve ardından ikinci bir enzim bağlı antikorun bu yapıya bağlanması ile ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrik ölçüm sonucu ile örneklerdeki antijen varlığı kantitatif olarak tespit edilebilmektedir (Lopez-Campos ve ark., 2012). İmmunolojik testlerde analizin hassasiyeti ve güvenilirliği açısından antikorların özgüllüğü ve antijene olan ilgisi önem taşımaktadır. Antikorların antijene olan ilgilerinin az olması, kontaminasyon riskinin fazla olması, düşük miktarlardaki patojenleri tespit edememesi (tespit etme limiti antikorun tipine ve antijene ilgisine bağlı olarak değişmekle birlikte yaklaşık 10^4 - 10^5 kob/g) gibi dezavantajlarından dolayı yeni tekniklerin gerekliliği ortaya çıkmıştır (Jasson ve ark., 2010; Velusamy ve ark., 2010).

Kültür ve koloni bazlı yöntemler ve immünolojik yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve hassas, özgül ve güvenilir bir şekilde gıda patojenlerini tespit etmek amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) bazlı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. PCR bazlı yöntemler nükleik asit hibridizasyonuna dayalı yöntemler olmakla birlikte diğer yöntemlere göre hızlı, güvenilir, hassas, özgül ve tekrarlanabilir olması gibi avantajları ile mikrobiyal patojenlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu teknik bakteriyel sınıflandırmada özellikle de fenotipik açıdan atipik bakteri suşlarının tanımlanmasında son derece güvenilir bir tekniktir.

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların PCR yöntemi ile tanımlanmasında saf kültürler veya ön zenginleştirme ya da seçici besiyerinde geliştirilen gıda örnekleri kullanılmaktadır. PCR yönteminde saf kültürler kullanıldığında kontaminasyon riski düşükken ön zenginleştirme besiyerinden alınan örneklerin analizinde kontaminasyon riski daha yüksek olmaktadır. Santrifüjleme, filtrasyon ve yıkama aşamaları gibi basit bir örnek hazırlama işlemi kontaminasyonları elemine edebilir. Ayrıca saf bir DNA elde etmek için örneklerin seyreltilmesi ve daha sonra mikroorganizmanın uygun koşullarda büyütülmesi gibi bazı ön hazırlıklar yapılabilmektedir. Böylelikle sadece canlı hücreler kopyalanabilmekte, düşük sayıdaki mikroorganizmaların seviyesi artırılabilen ve gıda matriksinden kaynaklı inhibe edici faktörler elemine edilebilmektedir (Hill, 1996). Örnek hazırlama aşamasında etidyum monoazit ve propidyum monoazit gibi kimyasal maddeler kullanılarak ölü ve canlı hücreler ayırt edilmekte ve yanlış pozitif sonuçlar engellenebilmektedir (He ve Chen, 2010). PCR bazlı yöntemler kültürel bazlı yöntemlerin son aşaması veya doğrulaması olarak kabul edilebilmekte ve kısa sürede sonuç elde edilebilmektedir. Patojen mikroorganizmaların PCR bazlı yöntemler ile tanımlanabilmesi için amplifiye edilmesi öngörülen, aynı tür içinde değişmeyen korunmuş gen bölgesinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Genellikle 16S rRNA geni patojenlerin tanımlanmasında hedef gen bölgesi olarak kullanılmaktadır. Yüksek derecede korunmuş olması, bütün bakterilerde çok sayıda kopyasının bulunması ve farklı bakteriler arasında önemli ölçüde dizi çeşitliliği ile 9 hiper değişken bölge içermesi (V1-V9) gibi özellikleri hedef gen bölgesi olmasının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (Beneduce ve ark., 2007). 16S rRNA bölgesi cins ve tür seviyesinde ayırım yapabilmek için hedef gen bölgesi olarak kullanılabilirle birlikte değişken gen bölgelerinin yüksek derecede benzerlik göstermesi nedeniyle bazı bakterilerin suş ve serotiplerini ayırmak için yeterli olmamaktadır. Dolayısıyla tür altı seviyede ayırım yapabilmek için kullanılan hedef gen bölgesi ise intergenik RNA boşluk bölgeleri olarak seçilmiştir. Bu kodlanmayan bölgeler evrim sürecinde daha az baskıya maruz kaldıklarından dolayı değişkenlik göstermekte ve tür altı seviyede taksonomik sınıflandırma yapabilmek için sunmaktadır (Rijpens ve ark., 2002).

PCR tekniğinin gelişmesi ile RT-PCR, Nested PCR, PCR-RAPD, Ligaz PCR, PCR-RFLP ve PCR-Ribotiplendirme, AFLP ve Multipleks PCR gibi PCR bazlı yöntemler geliştirilmiştir. Ters (Reverse) transkriptaz PCR (RT-PCR) teknolojisinde kalıp olarak DNA yerine mRNA kullanılmakta ve çoğaltılması istenen mRNA öncelikle ters transkriptaz enzimleri kullanılarak tamamlayıcı DNA'ya (complementary DNA, cDNA) çevrilmekte,

takiben PCR yöntemi ile amplifiye edilmektedir. Bu tekniğin ortaya çıkması PCR tekniğinin ölü ve canlı hücreleri ayırt etmekteki yetersizliğine dayanmaktadır. Başka bir ifade ile DNA bazlı yöntemler yerine RNA bazlı yöntemler tercih edilmiştir. RT-PCR'da tüm RNA'lar arasında (rRNA, tRNA ve mRNA) mRNA'nın tercih edilmesinin nedeni ise rRNA ve tRNA'nın yarılanma ömrünün kısa olmaması ve mRNA'ya göre daha kararlı bir yapıda olması gibi karakteristik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. DNA bazlı yöntemlerde hedef gen bölgesi olarak seçilen 16S rRNA bölgesi bakterilerin canlılığını belirleyememekte, ancak mRNA'nın canlı ve ölü hücre ayırımında etkin olduğu belirtilmiştir. Ancak yöntem canlı bakterilerde hedef genin ifade olmaması yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca ortam pH'sı ve sıcaklığından etkilenen çeşitli genlerin aniden ifade olması da bu yöntemin diğer sınırlamalarıdır (Rijpens ve ark., 2002).

PCR bazlı diğer bir teknik, çoğaltılan parçalarının uzunluk polimorfizmi (AFLP) tekniği, genomik DNA'nın endonükleaz enzimleri ile kesilmesini, takiben bu parçacıkların bir adaptör ile ligasyonu ve seçici PCR amplifikasyonuna dayalı bir yöntemdir. Jelde yürütülen amplifikasyon ürünlerinin oluşturdukları polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir. AFLP tekniğinde kromozal DNA'nın tamamen parçalanması ve dolayısıyla anormal bir AFLP analizine neden olması önemli bir sorun oluşturmaktadır (Prasad ve ark., 2009).

Multipleks PCR yöntemi ise aynı ya da ayrı hedef gen bölgesi için, aynı reaksiyonda birden çok primer çifti kullanılarak hedef bölge ya da bölgelerin amplifikasyonu prensibine dayalı geliştirilen bir yaklaşımdır. Multiplex PCR aynı anda birden fazla patojen mikroorganizma yarı kantitatif olarak tanımlanabilmektedir. Aynı reaksiyonda birden fazla primer çiftinin bulunması, primerlerin yanlış bağlanmasına neden olabilmekte ve dolayısıyla yöntemi sınırlamaktadır. Bununla birlikte istenilen bazı bölgelerin amplifiye olmaması, sonuçların tekrarlanabilirliğinde oluşan sorunlar bu yöntemin dezavantajlarıdır (Mothershed ve Whitney, 2006).

Tüm PCR bazlı yöntemler PCR tekniğinin modifiye edilmesi ile oluşturulmuş yöntemlerdir. Buradaki amaç PCR'ın sınırlamaları ortadan kaldırmak ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında daha hassas, daha spesifik, tekrarlanabilirliği olan, daha düşük limitlere inebilmek gibi etmenlerdir. PCR bazlı yöntemler mikrobiyal patojenleri tanımlamada önemli bir araç olmasına rağmen genel olarak bazı sınırlamalara sahiptir. Primerin kendi içinde eşleşerek saç tokası olarak isimlendirilen bir yapı oluşturması,

iki primerin kendi içinde eşleşerek primer dimer yapı oluşturması ve dolayısıyla yanlış eşleşme ile yanlış pozitif sonuçlar elde edilmesi bu sınırlamalara örnek verilebilir. İlâveten amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için Etidyum Bromür ile boya işlemi hem kontaminasyona neden olabilmekte hem de emek isteyen bir uygulama özelliği taşımaktadır (Fratamico ve ark., 2008). Sonuç olarak tüm bu konvansiyonel yöntemler sahip oldukları avantajlar ve dezavantajlar ile beraber en önemli sınırlaması miktar ile ilgili yeterli bilgi vermemesidir.

1.3.2. Real Time PCR yaklaşımı

Real Time PCR teknoloji ilk olarak Higuchi ve ark. (1992) yaptıkları bir çalışmada amplifikasyon ürünlerini Etidyum Bromür ile görüntülemek için oluşturdukları bir sistem olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji amplifikasyon ürünlerinin lineer olarak logaritmik artışını izleyebilme ve buna bağlı olarak kantitatif analiz yapabilme imkanı sunmaktadır. Real Time PCR, floresan özellikli boya veya probaların hedef bölgeye bağlanarak oluşturdukları amplifikasyon ürünlerinin, ışık kaynağından gelen ışımalar ile uyarılması sonucu ışımaya yayması ve optik bir modül tarafından algılanan bu ışımalar ile izlenebilir hale gelmesi prensibine dayanmaktadır. PCR sırasında oluşan amplifikasyon ürünlerine bağlı olarak artan floresan ışımalar algılanarak bilgisayar yazılımı ile kaydedilmektedir. Yine yazılım sayesinde, PCR döngüleri ve döngülere bağlı olarak artan floresan ışımalar bir amplifikasyon grafiği ile eş zamanlı görüntülenebilmektedir. Aynı zamanda kantitatif analizler için floresan ışımaya şiddetini sayısal değerlere dönüştürmektedir. Real Time PCR teknoloji PCR tekniğinin kinetik kazanması ile gelişmiş bir teknoloji olmakla birlikte PCR sonrası boyama görüntüleme gibi uygulamalara gerek kalmaması, kontaminasyon riskinin azalması gibi avantajlara sahiptir (Hanna ve ark., 2005).

Real Time PCR cihazı temel olarak ısı döngü cihazı, eksitasyon ışık kaynağı, bir floresan algılama sistemi ve yazılım ünitelerinden oluşmaktadır. Eksitasyon ışık kaynağı argon-iyon lazerler, ışık yayan diyot lazerler (LED), kuartz halojen tungsten lambalar ve ksenon lambalar olarak dört farklı çeşit içermekte ve en çok kullanılan ışık kaynağı ise lambalardır (Valasek ve ark., 2005; Shipley, 2007). İşaretlenmiş amplifikasyon ürünlerinin yaydığı floresan ışımalar floresan sistemi ile algılamakta, yazılım aracılığı ile veriler kaydedilmektedir. CCD kamera, fotomultiplikator tüpleri veya fotodedektörlerin diğer türlerini içeren bu sistem belirli sayılarda kanal içererek dalga boylarını sınırlayıp sadece tercih edilen dalga boylarının ölçülmesine izin vermektedir (Valasek ve ark., 2005).

Bu teknolojide floresan moleküllerin ışık kaynağından aynalar aracılığı ile üzerine gelen belirli dalga boyundaki ışınları absorbe ederek enerji kazanıp, buldukları temel düzeyden uyarılmış düzeye geçmektedirler. Uyarılmış bu moleküller kararsız haldeki bu durumdan temel düzeye geçme eğiliminde oldukları için fazla enerjilerini farklı dalga boylarında ışımlar halinde yaymaktadır. Böylelikle floresan moleküllerin hem uyarıldıkları hem de yayıldıkları iki farklı dalga boyu aralıklarındaki ışımlar floresan algılama sistemi tarafından belirlenmektedir (Shiple, 2007; Navarro ve ark., 2015). Real Time PCR teknolojisinde kullanılan bu moleküllerin her birine özgü tanımlanmış farklı uyarılma ve yayılma dalga boyu aralıkları mevcuttur (Shiple, 2007). Günümüzdeki Real Time PCR cihazlarında floresan sinyaller farklı kanallar aracılığıyla floresan algılama sistemine iletilmektedir. Kanal sayısı özellikle çoklu PCR çalışmalarında farklı bölgeleri tanımlamak için önem taşımaktadır (Navarro ve ark., 2015).

Real Time PCR'da kantitatif analiz yapabilmek için genellikle mutlak (absolute) kantitasyon ve bağıl (relative) kantitasyon olmak üzere iki metot kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005). Mutlak kantitasyonda bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmakta ve miktar tayini yapılabilmektedir. Kalibrasyon eğrisini oluşturan kalibrasyon noktaları miktarı bilinen ve seyreltilerek farklı konsantrasyonlar oluşturulan amplifikasyon ürünleri, DNA molekülleri, RNA molekülleri, rekombinant plazmit DNA'sı veya ticari olarak sentezlenmiş oligonükleotitler olabilir (Pfaffl ve ark., 2001; Rasmussen 2001; Muska ve ark., 2007). Bağıl kantitasyon (relative) veya karşılaştırmalı (comparative) kantitasyon ise genellikle gen ifade analizlerinde kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005; Pfaffl, 2007). Bağıl kantitasyon analizlerinde referans kontrol veya kalibratörlerin ifade seviyeleri hedef genin ifade seviyesi ile karşılaştırılarak kantitatif analiz yapılmaktadır. Kalibratör olarak tedavi görmemiş örnek veya normal dokudan elde edilen RNA kullanılabilir (Pfaffl, 2007). Referans kontrol olarak ise beta aktin, gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz ve ribozomal RNA gibi korunmuş genler kullanılmaktadır (Huggett ve ark., 2006).

1.3.2.1. Real Time PCR'da kullanılan belirleme teknolojileri

Real Time PCR teknolojisinde kullanılan belirleme yöntemleri floresan sinyal oluşturan floresan işaretli moleküllerin biyokimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Bu moleküller öncelikle hedef diziyeye özgü floresan işaretli oligonükleotitler ve hedef diziyeye özgü olmayan boyalar olarak iki grupta toplanabilir. Nükleik asit boyaları hedef diziyeye özgü olmayan grupta yer alırken Taqman proplar, moleküler boncuk, akrep primerleri gibi

teknolojiler ise hedef diziye özgü olan grupta bulunmaktadır. SYBR-Green boyalar ve Taqman teknolojisi bu teknolojiler arasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hedef diziye özgü olmayan belirleme teknolojileri

Hedef diziye özgü olmayan nükleik asit boyaları, amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanmakta ve böylelikle floresan sinyal oluşturmaktadır. Oluşan floresan sinyal ise floresan algılama sistemi ile algılanmakta, yazılım ile de sayısal verilere dönüşmektedir. Ayrıca bu boyaların yaydığı floresan sinyaller amplifikasyon sırasında her döngünün uzama safhasında eş zamanlı olarak ölçülebilmektedir. Böylece amplifiye olan ürünler kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmektedir. SYTO boyalar, EvaGreen ve SYBR-Green boyalar hedef diziye özgü olmayan nükleik asit boyaları olmakla birlikte SYBR-Green en yaygın olarak kullanılan boyadır (Fratamico ve Kawasaki, 2008). Çift zincirli DNA'nın küçük oyduğuna (grove) bağlanan SYBR-Green (2- [N- (3-dimethylaminopropyl)- N- propylamino]-4- [2,3-dihydro-3-methyl- (benzo-1,3-thiazol-2-yl) -methylidene]-1- phenylquinolinium) bir asimetric siyanin boyadır.

SYBR-Green teknolojinin en önemli sınırlaması, hedef diziye özgü olmamasından dolayı primer dimer oluşturabilmesi veya yanlış eşleşmiş amplifikasyon ürünlerine bağlanabilmesidir. Bu sınırlamada yanlış pozitif sonuçlara sebep olabilmektedir. Bu sınırlamayı ortadan kaldırmak amacıyla Erime Eğrisi (Melting curve) olarak tanımlanan bir uygulama eklenmiştir. Bu uygulamada amplifikasyon tamamlandıktan sonra ortamdaki tüm çift zincirli DNA'lar için yüksek sıcaklık uygulanmakta ve bu DNA'ların erime noktaları belirlenmektedir. Böylece daha uzun ve G/C oranı daha fazla olan DNA'ların erime noktaları daha yüksek olmasından dolayı primer dimer ve yanlış eşleşmiş DNA'lar tespit edilebilmektedir (Buh Gasparic ve ark., 2010; Eischeid, 2011).

Tekniğin daha az maliyetli olması, daha güçlü floresan sinyal oluşturması avantajları arasında yer alırken dar dinamik aralığa sahip olması, PCR reaksiyonlarında yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etki oluşturması ve daha düşük tekrar üretilebilirlik göstermesi gibi sınırlamaları da bulunmaktadır. İlaveten erime eğrisi analizlerinin yorumlanması da her zaman kolay olmamaktadır (Giglio ve ark., 2003; Eischeid, 2011). Son zamanlarda SYBR-Green boyalara alternatif olarak üçüncü nesil boya olarak tanımlanan Eva Green boyalar geliştirilmiştir. Eva Green boyalar SYBR-Green boyalardan daha stabil, daha hassas, daha az inhibitör etkisi sunmakta ve erime eğrisi analizlerine daha uygun olması ile daha çok tercih edilmektedir (Wang ve ark., 2006).

Hedef diziye özgü belirleme teknolojileri

Taqman teknolojisi

Hedef diziye özgü belirleme teknolojilerinden en çok bilinen Taqman prob teknoloji 90'lı yıllarda tanımlanmıştır. Taqman teknolojisinde 3. bir primer olarak da görülebilen, primerlere yakın bölgede bulunun nükleik asit dizilerinin komplementeri olan, yaklaşık 20-30 nükleotit (nt) uzunluğunda, floresan işaretli oligonükleotitler (prob) kullanılmaktadır. Bu problemler Taqman teknolojisinin temelini oluşturmaktadır. DNA polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesinden dolayı hidroliz prob olarak da bilinmektedir. Floresan işaretli oligonükleotitler amplifikasyon sırasında hedef dizilerine bağlandıkları zaman oluşan floresan sinyalin algılanması ve yazılım ile verilere dönüşmesi ile Real Time PCR analizi gerçekleşmektedir.

Taqman problemleri yapısal olarak yaklaşık 20-30 nt uzunluğunda nükleik asit dizisi, 5' ucunda muhbir olarak adlandırılan floresan boyalı bir molekül ve 3' ucunda ise 5' ucundaki molekülün floresan ışımaya yaymasını baskılayan, söndürücü olarak adlandırılan floresan özellikli bir molekülden oluşmaktadır. Amplifikasyon sırasında probun kendi komplement bölgesine bağlanması ile DNA polimeraz 5' ekzonükleaz aktivitesini göstererek probu kırmaktadır. Böylece 3' ucundaki baskılayıcı molekülden uzaklaşan floresan işaretli 5' floresan molekül ışımaya yaparak sinyal oluşturmaktadır (Mckillip ve Drake, 2004; Espy ve ark., 2006). Bununla beraber söndürücü olarak kullanılan moleküller her zaman belirlenebilir aralıkta floresan özellik taşımayabilir. DABSYL (4-(dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonyl chloride) veya BHQs (black hole quenchers) gibi söndürücü moleküller muhbir floroforları baskılayıp floroforun yaydığı ışımaya absorbe etmekte ama kendisi floresan ışımaya yayma özelliği göstermemektedir. İdeal bir söndürücü molekülden aranan özellik söndürücünün absorpsiyon spektrumunun floroforun yayılma spektrumu ile örtüşmesidir. Bununla beraber söndürücü molekül en iyi absorpsiyon özelliğini maksimum absorpsiyona en yakın olduğu durumlarda göstermektedir. SYBR-Green teknoloji ile karşılaştırıldığında Taqman prob teknolojisi daha pahalı ve hedef bölgeye özgü olduğundan daha hassas bir metottur (Espy ve ark., 2006).

Moleküler boncuk teknolojisi

Bu teknolojiye Taqman prob teknoloji gibi 5' ucunda floresan ışımaya yapan bir muhbir molekül ve 3' ucunda ise bu ışımaya baskılayan söndürücü bir molekül bulundurmaktadır. 5' ve 3' uçların birbirinin eşleniği olması 5' ucundaki molekülün ışımaya yaymasını engellemektedir.

Taqman problemleri ile moleküler boncuk problemleri arasında yapısal olarak farklılıklar bulunmaktadır. Bu teknolojiye kullanılan problemler 25-30 nt uzunluğunda, tek zincirli oligonükleotitlerdir ve dizisinin 5' ve 3' ucu yaklaşık 5-8 nt birbirinin prob üzerinde eşleniği olmakla birlikte probun orta kısmındaki dizi ise hedef DNA dizinin eşleniğidir. Moleküler boncuk probu kendine özgü DNA dizisine yapıştığında saç tokası şekli açılarak tek zincirli hale gelmekte ve 5' ucundaki muhbir floresan ışımaya yayılmaktadır. Böylece yayılan floresan ışımaya ile kalitatif ve kantitatif analiz yapılabilmektedir.

Moleküler Boncuk teknolojisinin bazı avantajları ve sınırlamaları bulunmaktadır. En önemli avantajı amplifikasyon sırasında moleküler boncukların yapısının bozulmaması ve dolayısıyla aynı probun her döngüde hedef diziyeye tekrar bağlanabilmesidir (Arya ve ark., 2005; Tyagi ve ark., 2012). Bu teknolojiye moleküler boncuklar tek bir nükleotid farklılığında bile hedef DNA dizisine bağlanmayabilir. Hem avantaj hem de dezavantaj olarak kabul edilebilen bu özelliği ile SYBR-Green ve Taqman prob teknolojilerinden daha hassas bir teknolojidir ve özellikle nokta mutasyonu çalışmalarında tercih edilmektedir (Abravaya ve ark., 2003).

FRET teknolojisi

Hedef diziyeye özgü belirleme teknolojilerinden bir diğeri de Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) problemleri teknolojileridir. Light Cycler cihazlarına özgü olan bu teknolojiye problemler hibridizasyon problemleri ve Light Cycler olarak da adlandırılmaktadır. FRET teknolojisinde hedef diziyeye özgü ve birbirlerine yakın olan iki prob kullanılmaktadır. Bir probun (verici prob) 3' ucunda floresan boya (genellikle FAM) diğeri probun (alıcı prob) 5' ucunda ise başka bir floresan boya (genellikle siyanin boyalar, Cy3 ve Cy5 gibi) bulunmaktadır (Wilhelm ve ark., 2003). Problemler hedef dizilere bağlandıklarında 3' boyanın floresan ışınması 5' ucundaki boya tarafından baskılanmaktadır. İkinci probun uyarılması ile üçüncü bir dalga boyunda ışımaya yayılmakta ve bu ışımaya algılanarak ölçülebilir değerler haline dönüşmektedir. Bu teknolojiye iki prob kullanıldığından hassas bir teknoloji olmakla birlikte özellikle mutasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Moleküler boncuk problemlerinde olduğu gibi FRET problemlerinde kararlı bir yapıya sahip olup, PCR döngülerinde tekrar tekrar hedef diziyeye bağlanabilmektedirler (Espy ve ark., 2006).

Akrep (Scorpien) primer teknolojisi

Akrep (Scorpien) primer teknolojisi; tek bir molekülde hem primer hem de probtan oluşan, boncuk teknolojisine benzer, saç tokası şeklinde geliştirilmiş bir teknolojidir

(Whitcombe ve ark., 1999). Yapısal olarak sırasıyla 5' ucunda muhbir bir floresan molekül, probun 5' sap kısmı, ilmek bölgesi, 3' sap kısmı, 3' ucunda söndürücü bir floresan molekül, engelleyici molekül (genellikle hekzilen glikol) ve primer bulunmaktadır. 5' ve 3' ucu birbirine ve ilmek bölgesi ise hedef bölgeye komplementer özelliktedir (Arya ve ark., 2005). Bu teknolojiye primer bağlandıktan sonra, yani uzama safhasında prob hedef diziye bağlanmaktadır. Böylelikle muhbir ve baskılayıcı molekül birbirinden ayrılmakta ve floresan ışımaya oluşmaktadır. Akrep primerlerde önemli noktalardan biri primer ve saç tokası yapısı arasında bulunan PCR engelleyici bir hekzilen glikol grup içermesidir. Bu engelleyici molekülün görevi akrep primerlerin saç tokası dizisinin uzamasını engellemektir (Kaltenboeck ve ark., 2005). Akrep primerleri hem primer hem saç tokası şeklinde prob içermelerinden dolayı daha hassas ve daha etkili analiz imkanı sunmaktadırlar. Genellikle de mutasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tanımlanması ve mikrobiyal potansiyellerinin belirlenmesi için günümüze kadar yeni teknikler geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Kültürel bazlı, immünolojik bazlı ve PCR bazlı gibi konvansiyonel metotların yanı sıra son zamanlarda bir ivme kazanan Real Time PCR teknolojisi mikrobiyal patojenleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmakta ve bununla ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan önemli olan bazıları aşağıda derlenmiştir.

Klebsiella pneumoniae, yenidoğan ve immün sistemi baskılanmış kişiler arasında şiddetli morbidite ve mortaliteye neden olan fırsatçı bir patojendir. Bebek mamasının yeni doğan yoğun bakım ünitesinde *K. pneumoniae* ile ilgili salgınlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla Sun ve ark. (2010) bebek mamalarında *K. pneumoniae* patojenini hızlı bir şekilde tespit edebilmek için yeni bir SYBR-Green Real Time PCR yaklaşımı geliştirmişlerdir. Bu çalışmada 142 bç uzunluğunda *phoE* geni hedef bölge olarak seçilmiş, 2 *K. pneumoniae* suşu ve 15 *K. pneumoniae* olmayan suş bu metotla değerlendirilmiştir. Test edilen bütün suşlar Real Time PCR analizlerinde *phoE* geni pozitif olarak belirlenmiştir ve *K. pneumoniae* dışındaki suşlar çapraz reaksiyona neden olmamıştır. Metodun belirlenme limiti 1 kob/25 g olarak bulunmuştur. Sonuçlar bu yeni metot ile bebek mamalarında hassas bir şekilde *K. pneumoniae* mikroorganizmasının belirlenebileceğini göstermiştir.

Tomaso ve ark. (2010) Real Time PCR teknoloji ile klinik örneklerde farklı ticari DNA izolasyon kitleri kullanılarak *Brucella* türleri tespit etmeye çalışmışlardır. Genellikle düşük bir mikrobiyal yüke sahip olan *Brucella* türleri *IS711* hedef gen bölgesinin amplifikasyonu ile tanımlanmıştır. *Brucella* türleri tanımlanırken izolasyon kitlerinin örnek hacmi, elusyon hacmi ve işlem süresi gibi kriterleri dikkate alınarak değerlendirme yapılmış ve elde edilen DNA'ların verimi ve miktarında önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Wu ve ark. (2011) *C. perfringens* patojenini tanımlamak için Real Time PCR ve kültürel metotlar ile elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır. Nekrotik enteris hastalığına yakalanmış broiler tavuklarda iki yöntemle de tespit edilen *C. perfringens* patojeni tanımlamada Real Time PCR metodu oluşturmuş ve kültürel yöntemlere göre daha hassas olduğu bulunmuştur. Doğrusal regresyon analizlerinde iki metodun mikrobiyal yük hesaplamada $r^2=0,84$ katsayısı ile yüksek bir ilişki saptandığı belirtilmiştir. Real Time PCR

metodunun tavukların bağırsak sistemlerindeki *C. perfringens* miktarını belirlemede kültür yöntemlerin yerini alabileceği tespit edilmiştir.

Elizaquível ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada Real Time PCR teknolojisi ile beraber örnek hazırlama işleminde kullandıkları bileşikler ile canlı *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* patojenlerini karakterize etmeye çalışmışlardır. Real Time PCR teknolojinin sınırlamalarından biri olan ölü ve canlı hücre ayıramama sorununu örnek hazırlama işlemin sırasında propidyum monoazit (PMA) ve reaktif D gibi DNA'ya bağlanan moleküller kullanarak potansiyel bir strateji geliştirmişlerdir. Hücre süspansiyonunda iki bileşik içinde optimum konsantrasyonlar belirlenmiş ve bileşikler hedef patojenler için benzer azalmalar göstermiştir. Ancak reaktif D bileşiği *L. monocytogenes* ve *Salmonella* patojenleri için toksik etkide bulunmuştur. Bu nedenle bu bileşiklerin gıdalarda uygulanabilirliği PMA ile sınırlı kalmıştır. 50 mM PMA ile yapay olarak kontamine edilmiş salata ve ıspanak örnekleri Real Time PCR ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek konsantrasyon *L. monocytogenes*'de belirlenmiş, inokule edilmiş karışık salatalar dışındaki tüm ölü hücre ile inokule edilmiş örnekler beklenildiği gibi negatif sonuçlar oluşturmuştur. PMA-Real Time PCR kombine uygulamasının sebze örneklerinde normal seviyelerde bulunan canlı patojenlerin var/yok ve miktar belirlemede uygun bir metot olduğu düşünülmüştür.

Minami ve ark. (2012) bebek mamalarında yaptıkları bir araştırmada canlı *C. sakazakii* patojeni etidyum monoazit-Real Time PCR kombinasyonu ile tanımlanmaya çalışılmıştır. Örnekler canlı ve ölü hücre ayırımı için analiz öncesinde etidyum monoazit ile muamele edilmiştir. Bununla birlikte örnekler 2012 yılında Bakteriyolojik Analitik Kılavuzunda yayınlanan yeni ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) yöntemi ile de analiz edilerek iki metotun karşılaştırılması yapılmıştır. Toplam 17 örnek her iki metot ile analiz edilmiş ve negatif sonuç vermiştir. Ama etidyum monoazit işlemi uygulanmayan 5 örnekte Real Time PCR analizlerinde *C. sakazakii* patojeni tespit edilmiştir. Sonuç olarak canlı *C. sakazakii* patojenlerini kısa bir sürede teşhis edebilen hızlı ve spesifik bir kombine metot (Etidyum monoazit-Real Time PCR) oluşturulmuş, ilaveten FDA yöntemi ile kıyaslandığında çok iyi bir korelasyon sunduğu bildirilmiştir.

Singh ve ark. (2012) günlük süt ürünlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* türlerini eş zamanlı olarak belirlemek için Real Time PCR yaklaşımı ve sonrası erime eğrisi analizlerinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. SYBR-Green boyasının optimal konsantrasyonu *L. monocytogenes* için $79,90 \pm 0,39$ °C ve *Salmonella* için $86,29 \pm 0,13$ °C

erime sıcaklığında (T_m) iki spesifik pik ile 1,6 µM olarak tespit edilmiştir. Metodun yapay kontaminasyon ile yağsız sütlerdeki belirleme limiti 10³ kob/mL ve 6 saatlik bir ön zenginleştirme ile de 10¹ kob/mL'e kadar düşebilmiştir. Marketlerden alınan 60 süt ve dondurma numunesinde metot uygulanmış ve sadece 1 örnek her iki patojen içinde pozitif sonuç oluşturmuştur. Geliştirilen metodun mikrobiyal kalite ve gıda güvenliği açısından hedef patojenlerin belirlenebilmesi için günlük ürünlerin izlenebilmesinde değerli bir uygulama olduğu belirtilmiştir.

C. jejuni insanlarda hastalık oluşturan önemli bir zoonotik patojendir. Fenotipik benzerlikleri ve kendilerine özgü büyüme koşulları *Campylobacter* türlerinin izolasyon ve tanımlanmasında zorluklar oluşturabilmektedir. Bu amaçla Toplak ve ark. (2012) Multipleks Real Time PCR teknoloji ile *C. jejuni* ve *C. coli* mikroorganizmalarını ayırmak, tanımlamak ve gıda örneklerinde uygulamak amacıyla yeni bir metot geliştirmişlerdir. Metotta amplifikasyon etkinliği % 108-116 aralığında bulunmuştur. Metodun hassasiyeti tavuk suyu ve musluk suyu örneklerini yapay olarak *C. jejuni* ile kontamine ederek belirlenmiş, 10²-10³ kob/mL olarak belirleme limiti tespit edilmiştir.

Wang ve ark. (2012) fırsatçı bir patojen olan *Cronobacter sakazakii*'nin gıda örneklerinde Real Time PCR ile karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Yenidoğanlarda riskli enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiş bu patojenin Real Time PCR ile tanımlanması *MMS operon* geninin amplifikasyonu ile gerçekleşmiştir. Metodun spesifikliğini test etmek amacıyla toplamda 67 adet bakteri suşu (sadece 4 tanesi *C. sakazakii* suşu) analiz edilmiş ve bütün *Cronobacter* suşları başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Toplam 92 gıda numunesinin analizinde ise sadece 2 örnek *MMS operon* geninin amplifiye olmasıyla pozitif sonuç vermiştir. Oysaki aynı numuneler ISO standart metodu ile analiz edildiğinde sadece bir örnekte amplifikasyon gözlenmiştir. Geliştirilen metodun yüksek özgüllüğe ve hassasiyete sahip olduğu düşünülmüştür.

Garrido ve ark. (2013) çevresel ve gıda örneklerindeki *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* patojenlerini tespit etmek amacıyla geliştirdikleri Multipleks Real Time PCR yaklaşımı ile iki DNA ekstraksiyon protokolünü karşılaştırılmışlardır. İlâveten, her iki patojen için yeni bir zenginleştirme besiyeri kullanmışlardır. Metodun amplifikasyon etkinliği ve bütün kalite parametreleri % 90'ın üzerinde bulunmuş ve en düşük belirleme limiti ise 5 kob/25 g olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 95 çeşitli gıda örneğinde hedef patojenlerin mikrobiyal potansiyelleri belirlenmiştir.

Garrido ve ark. (2013) *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 ve *Listeria monocytogenes* mikrobiyal patojenleri için Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirmişlerdir. Kantitatif analizler için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayıları hedef patojenler için $r^2=0,99$ değerinin üstünde bulunmuştur. Doğal ve yapay olarak kontamine edilmiş toplam 152 gıda ve çevre örnekleri bu metot ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde *Salmonella* için 6 negatif sapma, *L. monocytogenes* için 3 pozitif ve 6 negatif sapma tespit edilmiştir. *E. coli* O157:H7 için ise farklı sonuçlara rastlanmamıştır.

Kotzekidou (2013) ticari Real Time PCR kitleri kullanarak tüketime hazır ve çiğ gıdalarda yine aynı hedef patojenlerin varlığını araştırmıştır. Analizlerin doğruluğu doğal olarak kontamine olan tüketime hazır gıdaların ve ham maddelerinin kültürel metotlar ile birlikte değerlendirilmesiyle belirlenmiştir. Hedef patojenlerin var yok analizleri 25 g gıda numunesinde uygulanmıştır. *L. monocytogenes* Real Time PCR yöntemi ile 39 örnekte pozitif bulunmuş ve kültürel yöntemler ile 37 örnek doğrulanmıştır. İki metot arasındaki fark ise McNemar testine göre önemsiz bulunmuştur. Kültürel yöntemler ile pozitif bulunan hiçbir örnek Real Time PCR uygulamalarında negatif olarak belirlenmemiştir. İncelenen 343 örnekten biri her iki metotta da *Salmonella* için pozitif sonuç vermiştir. *E. coli* O157:H7 patojeni ise analiz edilen 333 örneğin hiçbirinde tespit edilememiştir.

Jamali ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada yine tüketime hazır gıdalarda özellikle *L. monocytogenes* olmak üzere *Listeria* türlerinin varlığını belirlemeyi ve farklı seçici kültür besiyerlerinin patojeni belirlemedeki etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Toplam 396 gıda örnek toplanarak biyokimyasal olarak analiz edilmiş ve PCR ile doğrulanmıştır. Analiz edilen gıda örneklerinin 71 tanesinde (% 17,9) *Listeria* türleri ve 45 tanesinde (% 11,4) ise *L. monocytogenes* patojeni tespit edilmiştir. İncelenen gıda örnekleri arasında salatalar ve sebzeler *L. monocytogenes* varlığı en yüksek (% 14,7) bulunan gıdalar olup, tavuk ve tavuk ürünleri (% 13,2), içecekler (% 10), yumurta ve yumurta ürünleri (% 9,5) ve sığır ve sığır eti ürünleri (% 6,7) onlardan sonra gelen gıda örnekleridir.

Barbau-Piednoir ve ark. (2013) *Listeria* türleri ve *L. monocytogenes* ayırımı ve tanımlaması amacıyla SYBR-Green belirleme teknoloji kullanarak Real Time PCR ile yeni bir metot geliştirilmiş ve valide etmişlerdir. Metotta amplifiye edilecek gen bölgeleri *iap*, *prs* ve *hlyA* genleri olarak belirlenmiştir. Ayrıca primerler *iap*, *prs* ve *hlyA* genleri için kısa bölgeleri (60-103 bp) amplifiye edebilecek şekilde tasarlanmıştır. Metodun doğruluğu *Listeria* türleri için % 98,08 ve *L. monocytogenes* için ise % 100 olarak tespit edilmiştir.

Hu ve ark. (2014) Real Time PCR teknoloji ile sekiz farklı gıda kaynaklı patojeni tek bir analizde eş zamanlı olarak tanımlamak için yeni bir Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirmişlerdir. Modifiye edilmiş moleküler boncuk belirleme teknoloji ile klinik örneklerde metodun dedeksiyon limiti $1,3 \times 10^3$ kob/g - $1,6 \times 10^4$ kob/g aralığında bulunmuştur. Geliştirilen metot % 100 hassasiyet ve % 99 spesifiklik ile gıda örneklerinde bile patojen mikroorganizmaları teşhis etmek için hızlı ve güvenilir bir metot olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

Ma ve ark. (2014) halk sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturan *Salmonella*, *Shigella* ve *Staphylococcus aureus* patojenlerini immuno manyetik ayırma dayanan teknik ve Multipleks Real Time PCR teknolojisi ile kombine şekilde kullanarak taze et örneklerinde karakterize etmişlerdir. DNA ekstraksiyon işleminden sonra spesifik antikorlar ile kaplı manyetik boncuklar örneklerden patojenleri yakalamak ve saflaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Ardından spesifik primer ve problarla Multipleks Real Time PCR analizleri uygulanmıştır. Örnekler aynı zamanda kültürel metotlar ile analiz edilip sonuçlar karşılaştırıldığında Multipleks Real Time PCR kombine metodun hedef patojenler için potansiyel olarak hızlı ve güvenilir bir metot olduğu bildirilmiştir.

Wang ve ark. (2014) immuno manyetik ayırma, propidyum monoazit, sodyum deoksikolat ve Real Time PCR tekniklerinden oluşan bir kombine metot kullanarak canlı *E. coli* O157:H7 mikrobiyal patojenini süt örneklerinde tanımlamaya çalışmışlardır. Propidyum monoazit ve sodyum deoksikolat reaktifleri ölü ve zarar görmüş bakteri hücrelerini elemine etmek amacıyla kullanılmıştır. Hücre süspansiyonları ısı ile muamele gördükten veya -20°C 'de saklanarak dondurulduktan sonra hayatta kalan bakterilerin sayımı plaka sayımı, Real Time PCR, propidyum monoazit-Real Time PCR ve propidyum monoazit-sodyum deoksikolat-Real Time PCR testleri ayrı ayrı uygulanarak karşılaştırılmıştır. Sodyum deoksikolat ile işlem görmüş hücre süspansiyonlarında diğer uygulamalara göre daha düşük sayıda canlı bakteri hücresi belirlenmiş ve sodyum deoksikolat reaktifinin ölü hücre DNA'larını elemine ettiği tespit edilmiştir. İlaveten propidyum monoazit-sodyum deoksikolat-Real Time PCR ve plaka sayımı metotları arasında doğrudan bir ilişki gözlemlendiği belirtilmiştir.

Singh ve Mustapha (2014) yaptıkları bir araştırmada virülans ve antibiyotik direnç özelliklerine bağlı olarak ciddi enfeksiyonlara neden olan *Salmonella* suşlarını tanımlamak için bir multipleks erime eğrisi Real Time PCR protokolü geliştirmişlerdir. İki set olarak geliştirilen metotta ilk set *invasin* (*invA*) virülans geni ve *tetracycline* (*tetG*), *streptomycin*

(*aadA2*) ve *sulphonamide* (*sulI*) antibiyotik direnç genlerinin ikinci set ise *ampicillin* (*blaPSE*, *blaTEM*) ve *chloramphenicol* (*floR*) direnç genlerinin amplifikasyonuna bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Floresan boya olarak ise yüksek çözünürlüklü erime eğrisi pikleri oluşturan SYTO9 boyası kullanılmıştır. Geliştirilen metot etkili bir şekilde sonuçlar vermiş ve yapay olarak kontamine edilen örneklerde zenginleştirme olmadan 10^4 kob/g ve 6 saatlik bir zenginleştirme ile 10 kob/g en düşük belirleme limiti olarak tespit edilmiştir.

Xiao ve ark. (2015) zenginleştirme uygulaması olmadan canlı *Salmonella* türlerini Real Time PCR teknoloji ile belirleyen bir protokole saf kültür için 36 kob/mL ve gıda örneklerinde 100 kob/g limitine kadar canlı *Salmonella* türlerini teşhis etmişlerdir. Canlı ve ölü hücre ayırımı Propidiyum monoazit reaktifi ile gerçekleştirilmiş ve örneklerdeki bakteri sayımı aynı zamanda plaka sayımı yöntemi ile de karşılaştırılmıştır. İki metodun canlı *Salmonella* türlerinin kantitatif analizinde uyumlu sonuç oluşturduğu bildirilmiştir.

Brusa ve ark. (2015) SYBR-Green ve Taqman prob belirleme tekniği olmak üzere iki farklı Multipleks Real Time PCR uygulaması ile Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) patojenini *stx1* ve *stx2* virülans genlerinin amplifikasyonuna bağlı olarak tanımlamışlardır. Metodun validasyonunda 50 STEC ve 30 STEC olmayan toplam 80 suş kullanılmış ve doğal olarak kontamine olan 103 sığır eti örneğinde *stx* geni taraması yapılmıştır. Geliştirilen Multipleks Real Time PCR protokolleri ile 1×10^2 kob/mL belirleme limitine kadar inilebilmiştir. Bununla birlikte sığır eti örneklerinde *stx* geni pozitif olarak tanımlanan 35 örnekten sadece 11 STEC suşu izole edilebilmiştir. Bu nedenle STEC patojen suşların moleküler identifikasyonunda izolasyon aşamasının geliştirilmesinin dikkate alınması gerektiği düşünülmüştür.

Singh ve Mustapha (2015) kanlı diare ve böbrek yetmezliği gibi hastalıklara neden olan STEC suşların tanımlanması için SYBR-Green yöntemi ile iki farklı Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirmişlerdir. Birinci grup O145, O121, O104 ve O157 serotiplerini ve ikinci grup ise O26, O45, O103 ve O111 serotiplerini tanımlamak için uygulanmıştır. Geliştirilen protokoller ile hedef serotiplerin tanımlanması verimli bir şekilde gerçekleşmiştir. Floresan prob, immuno manyetik boncuk gibi teknikler kullanılmayan bu protokollerde 11 saatten daha az sürede 8 STEC serotipi belirlenebileceği bildirilmiştir. Protokollerin hedef serotipler için şüpheli görünen numunelerde alternatif bir metot olarak kullanılabilir özellikte olduğu rapor edilmiştir.

Alves ve ark. (2016) yaptıkları bir araştırmada tavuk eti örneklerinde Multipleks Real Time PCR ile *Campylobacter* ve *Salmonella* türlerini tanımlamışlardır. DNA ekstraksiyon işlemi için kaynama ve fenol-kloroform yöntemi kullanmışlardır. Protokol % 100 özgülük ile zenginleştirme işlemi uygulanmadan *Campylobacter* için 10^3 kob/mL ve *Salmonella* için ise 10^6 kob/mL limitine kadar belirleyebilmiştir. 24 saatlik bir zenginleştirme uygulaması ile de her iki patojen içinde 1 kob/mL'ye kadar tanımlama yapılabilmifitir.

Forghani ve ark. (2016) toksijenik *B. cereus* mikrobiyal patojen için farklı tanısall yollarla yeni bir Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirilmişlerdir. Protokolde eş zamanlı olarak 4 enterotoksin geni (*cytK*, *entFM*, *hblD*, *nheA*) ve bir emetik geni (*ces*) yüksek çözünürlüklü erime eğrisi tekniği ile tanımlanmıştır. PCR ürünlerinin ortalama erime sıcaklıkları $72,2$ °C (*ces*), $74,23$ °C (*cytK*), $76,55$ °C (*nheA*), $78,42$ °C (*entFM*) ve $81,9$ °C (*hblD*) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada toplamda 71 bakteri suşu değerlendirilmiş ve ayrıca SYBR-Green boyası değil yüksek çözünürlükte erime eğrisi pikleri oluşturan SYT09 boyası kullanılmıştır. Geliştirilen protokolün enterotoksin ve emetik *B. cereus* suşlarını tanımlamada güvenilir bir araç olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmanın amacı gıda kaynaklı hastalıklara neden olan mikrobiyal patojenlerin kalitatif ve kantitatif olarak tanımlanması için moleküler yaklaşımlar ile yeni yöntemler geliştirmektir. Ayrıca Konvansiyonel PCR ve Real Time PCR teknolojileri kullanılarak standardize edilen yöntemlerin gıda örneklerinde uygulanabilirliğini test etmek ve gıda örneklerindeki hedef patojenlerin kontaminasyon derecelerini belirlemek bu çalışmanın hedefleri arasında yer almaktadır. Gıda güvenliği açısından gıda kaynaklı potansiyel tehlikelerin önlenmesi ve kontrol altına alınabilmesi için etkin bir yöntem sunulması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmanın temel kimyasalları farklı firma belirtilmedikçe, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Vivantis (Malezya) ve Thermo Scientific (Massachusetts, ABD) grubundan temin edilmiştir.

3.2. Referans Bakteri Suşları ve Kültür Ortamları

Bu çalışmada kullanılan *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii* ve *Escherichia coli* O157:H7 referans bakteri suşları ticari firmadan (Kwik-Stik™, MicroBioLogics, A.Ş.) ve diğer tüm referans suşlar ise Refik Saydam Ulusal Tip Kültür Koleksiyonundan (Ankara) temin edilmiştir. Referans suşlar Çizelge 3.1’de belirtilen kültür ortamları ve büyüme koşullarında geliştirilmiştir.

3.3. Kromozomal DNA İzolasyonu

Sıvı besiyerlerine ekimleri yapılmış ve gece boyunca inkube edilmiş bakteri kültürlerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Referans suşlarının DNA izolasyonu için Bakteriyel DNA izolasyon kiti (Vivantis) kullanılmıştır. İnkube edilmiş bakteri kültürlerinden 1 mL alınıp 6000 g’de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Supernatant tamamen atılmış, pelet Buffer R1 ile hücreler suspanse edilmiştir. Gram negatif bakteriler için 10 µL, gram pozitif bakteriler için ise 20 µL lizozim (50 mg/mL) eklenmiş, iyice karıştırılmış ve 20 dk. boyunca 37 °C’de ısıtıcı tablada inkübe edilmiştir. Süre sonunda 10000 g’de 3 dk. santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır. Protein denaturasyon aşamasında 180 µL Buffer R2 ile suspanse edilmiş, 20 µL Proteinaz K eklenmiş ve karıştırılarak 65 °C’de 20 dk. ısıtıcı tablada inkübasyona bırakılmıştır. Buffer BG’den 2 hacim ilave edilmiş ve homojen bir çözelti elde edilene karıştırılmış, 65 °C’de 10 dk. inkube edilmiştir. Ardından 200 µL saf etanol (% 99) eklenip hemen karıştırmış, kolonlara aktarılmıştır ve 1 dk. boyunca 10000 g’de santrifüj edilmiştir. Örnekler 750 µL yıkama solusyonu eklenerek tekrar 10000 g’de 1 dk. santrifüj edilmiş, kolondaki sıvı atılmıştır. Tekrar 10000 g’de 1 dk. santrifüj edilmiş, filtreler temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmış, 100 µL nükleaz içermeyen steril H₂O eklenerek 2 dk.

bekletilmiştir. Süre sonunda 1 dk. boyunca 10000 g'de son santrifüj yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların kalitesi ve miktarlarını belirlemek amacıyla 3 tekrarlı olarak Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) cihazında spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans suşlar ve büyüme koşulları

Referans suş	Referans Suş Numarası	Kültür Ortamı	Büyüme Koşulu
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 19570	NB NA	Aerobik ortamda 30 °C de 24-48 saat
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	TSB TSA	Aerobik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Brucella melitensis</i>	ATCC 23456	TSB TSA	Mikroaerofilik ortamda 37 °C'de 48 saat
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	TSB TSA	Mikroaerofilik ortamda 37 °C'de 48 saat
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	TSB TSA	Anaerobik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	NB NA	Anaerobik ortamda 37 °C de 48 saat
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	TSB TSA	Mikroaerofilik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ATCC35130	TSB TSA	Aerobik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	TSB TSA	Aerobik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	BHI Broth BHI Agar	Aerobik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	NCTC 13	NB NA	Aerobik ortamda 37 °C de 24-48 saat
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	TSB TSA	Aerobik ortamda 37 °C de 24 saat

TSB: Triptik Soy Broth, TSA: Triptik Soy Agar, NB: Nutrient Broth, NA: Nutrient Agar, BHI: Brain Heart Infusion besiyerleri

3.4. Mikroorganizmaların Sayımı

Referans kültürlerin kromozomal DNA miktarı (ng/μL) ile bu DNA'nın izole edildiği besiyerinde bulunan mikroorganizma sayısı (kob/μL) arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla besi ortamında gelişen kültürden 1 mL alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Aynı paralelde alınan 1 mL hacimdeki kültürün de mikroorganizma sayısı belirlenmiştir. Mikroorganizma sayısı spektrofotometrik (OD₆₀₀ nm) koloni sayısı olarak belirlenmiştir. Koloni sayımı için seri dilüsyonlar (10⁻⁷'e kadar) yapılarak katı besiyerlerine 100 μL eklenmiş ve yayma yöntemi ile ekimleri üç farklı petriye yapılmıştır. Elde edilen koloni sayısı ve OD₆₀₀ nm

okumada elde edilen değer ile bunlara ait 1 mL kültürden izole edilen DNA miktarları ilişkilendirilerek birbirlerinden tahmin yapabilecek regresyon denklemleri oluşturulmuştur.

3.5. rneklerinin Toplanması ve Toplam Mikroorganizma İzolasyonu

Tez alışmasında Sığır eti örnekleri toplamda 40 adet (16 adet karaciğer dokusu, 20 adet boyun bölgesi ve 4 adet ise şüpheli bulunan doku) koyun eti örnekleri ise 41 adet olup (14 adet karaciğer dokusu, 26 adet boyun bölgesi ve 1 adet ise şüpheli bulunan doku) veteriner kontrolünde Kahramanmaraş Büyükşehir hayvan mezbahasından temin edilmiştir. Tavuk eti (30 adet) ve süt (25 adet) rnekleri ise Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Hayvansal retim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (HAYMER) toplanmıştır. Tulum peyniri (20 adet) ve Su (20 adet) rnekleri lokal pazarlardan toplanmıştır.

Toplanan rnekler steril plastik numune poşetlere alınmış ve soğuk zincir takip edilerek laboratuvara getirilip buzdolabı şartlarında analiz edilinceye kadar çok kısa süreli saklanmıştır. Parçalanmayı gerektiren örnekler, steril şartlarda kesilerek, her birinden 10 g (sıvılarda 10 mL) rnek 90 mL ringer solusyonu ile steril stomacher plastik torbalarda 2 dk. homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra 1 mL homojenat 90 mL triptik soy broth n zenginleştirme besiyerine inoküle edilmiştir. Bir gece boyunca 37 °C'de inkube edilen örneklerden 1 mL alınarak DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Ayrıca her bir örnek için 2 adet 10 mL homojenize edilmiş örnek zenginleştirilmeden öncede diğer çalışmalarda kullanılmak üzere B numunesi olarak -20 °C'de saklanmıştır. Toplanan örneklerde mikrobiyal analiz izelge 3.2'de belirtilen mikroorganizma grubuna göre yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Patojen mikroorganizmaların gıda numunelerine göre gruplandırılması

Gıda	Patojen Mikroorganizma	Enfeksiyon Dozu	Gıda Numunesi
Et ve Et rnleri	<i>C. perfringens</i>	10^7-10^9 kob/g	Koyun eti
	<i>E. faecalis</i>	$> 10^7$ kob/g	Sığır eti
	<i>S. aureus</i>	10^5-10^8 kob/g	Tavuk eti
Et ve Et rnleri	<i>C. jejuni</i>	10^2-10^4 kob/g	Koyun eti
	<i>E. coli</i> O157:H7	10^1-10^2 kob/g	Sığır eti
	<i>S. enterica</i>	10^0-10^9 kob /g	Tavuk eti
Süt ve Süt rnleri	<i>B. melitensis</i>	10^1-10^2 kob/g	Tulum Peyniri
	<i>C. sakazakii</i>	10^3 kob/g	Süt
	<i>L. monocytogenes</i>	10^2-10^3 kob/g	
Su	<i>A. hydrophila</i>	10^{10} kob/g	
	<i>B. cereus</i>	10^5-10^9 kob/g	Su
	<i>K. pneumoniae</i>	10^8 kob/g	

3.6. Mikroorganizmaların Konvansiyonel PCR Tanımlanması ve Nükleotid Dizilime ile Konfirmasyonu

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların konvansiyonel PCR ile tanısı ve Nükleotid Dizileme ile de tanımlamanın teyidi yapılmıştır. Tez çalışmasında konvansiyonel PCR analizleri için 16S rRNA geni hedef bölge olarak seçilmiştir. *E. coli* O157:H7 için tanımlama *fliC* gen bölgesi hedef bölge olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.3’de konvansiyonel PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin dizilimleri, bant uzunlukları, hedef dizi erişim numaraları ve primerlerin alındığı kaynaklar belirtilmiştir.

3.6.1. Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR işleminde kit ile izole edilen kromozomal DNA (50 ng/μL) ve koloniler (100 μL ddH₂O içerisinde çözülmüş) kalıp olarak (1 μL) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu toplam 40 μL hacimde (32 μL ddH₂O, 1 μL (10 μM) ileri primer, 1 μL (10 μM) geri primer, 4 μL 10X tampon, 1 μL dNTP (2 mM) ve 0,5 μL Taq DNA polimeraz (5 U/mL) hazırlanmıştır. Primerlerin ideal yapışma sıcaklıkları Gradient PCR yapılarak belirlenmiştir. Genel PCR amplifikasyonu 94 °C’de 2 dk. ilk ayrıştırma, 35 döngü olmak üzere 94 °C’de 30 sn. denaturasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığında 30 sn. ve 72 °C’de 45 sn. ardından 72 °C’de 4 dk. son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. Farklı olan reaksiyonlar sonuçlar kısmında belirtilmiştir. PCR amplifikasyon ürünleri % 1’lik agaroz jel hazırlanarak elektroforeze yüklenmiş ve Et-Br ile boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.6.2. Nükleotid dizi analizi

PCR amplifikasyon ürünlerinin nükleotid dizileri Üniversitemiz Merkez Laboratuvarından (ÜSKİM) ve ticari firmadan (İontek, İstanbul) hizmet alımı yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen diziler Clone Manager programı ile analiz edilmiştir. Oluşturulan konsensüs dizi sonuçları; Blast programı ile Gen-Bank veri tabanındaki dizilerle benzerlikleri karşılaştırılmış ve türlerin doğruluğu teyit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Konvansiyonel PCR için belirlenen primer listesi

Kit	Bakteri	F: iler ve R: geri primer dizisi (5'=>3')	Bant uzunluğu	Dizi Erişim No	Kaynak
E ^{M1}	<i>C. perfringens</i>	F: AAAGATGGCATCATCATTCAAC R: TTTGGGGAAGATAATGACGGTA	279 bç	M59103	Wang ve ark., 1994
	<i>E. faecalis</i>	F: GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG R: CCGTCAGGGGACGTTTCAG	310 bç	Y18293	Zoletti ve ark., 2006
	<i>S. aureus</i>	F: CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG R: CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	791 bç	DQ630753	Mason ve ark., 2001
E ^{M2}	<i>C. jejuni</i>	F: AATCTAATGGCTTAACCATTA R: GTAAGTAGTTTAGTATTCCGG	852 bç	L14630	Linton ve ark., 1997
	<i>E. coli</i> O157:H7	F: GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC R: CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625 bç	AE005195	Cagney ve ark., 2004
	<i>S. enterica</i>	F: ACGGTAACAGGAAGCAG R: TATTAACCACAACACCT	403 bç	AF276989	Trkov ve Avgustin 2003
E ^{M3}	<i>B. melitensis</i>	F: TGGCTCGGTTGCCAATATCAA R: CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	223 bç	M26034	Baily ve ark., 1992
	<i>C. sakazakii</i>	F: GCTCTGCTGACGAGTGGCGG R: ATCTCTGCAGGATTCTCTGG	929 bç	AB004746	Lehner ve ark., 2004
	<i>L. monocytogenes</i>	F: TAAGAGTAACTGCTTGTCCCT R: GAGTTGCAGCCTACAATCCGA	863 bç	M58822	Koo ve Jaykus, 2002
E ^{M4}	<i>A. hydrophila</i>	F: GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA R: CGTGCT GGCAACAAAGGACAG	686 bç	M59148	Chu ve Lu, 2005
	<i>B. cereus</i>	F: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC* R: GGCAACTAAGATCAAGGGTTG*	784 bç	NR074540	Haitao ve ark., 2011
	<i>K. pneumoniae</i>	F: AGGGTGCAAGCGTTAATCGG R: TGTCTCACAGTTCCCGAAGG	508 bç	AF453251	Gierczynski ve ark., 2007

*: Altı çizili nükleotidler spesifikliğı yükseltmek amacı ile bu çalışmada primerlere eklenerek modifiye edilmiştir.

3.7. TaqMan Metodu ile Eş-Zamanlı PCR

Patojen mikroorganizmaların tanısı konvansiyonel metot ve nükleotid dizileme ile teyit edildikten sonra Real Time PCR çalışmaları yapılmıştır. TaqMan Real Time PCR metodunda, ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerine ek olarak PCR ürünüde spesifik bölgenin komplementeri olacak floresan özelliğe sahip prob lar literatür bilgileri ile belirlenmiş ve nükleotid dizi analizi ile teyit edilmiştir. TaqMan prob larının 5' ve 3' uçlarına muhbir (reporter) ve söndürücü (quencher) olarak adlandırılan floresan özellikli boyalar grup içerisinde birbirlerinin ışımalarını engellemeyecek dalga boyları dikkate alınarak seçilmiştir. Real Time PCR çalışmalarında kullanılan primer ve prob lar; mikroorganizma bilgisi, hedef amplifikasyon bölgeleri ve primerlerin dizileri, amplifikasyon uzunlukları, dizi erişim numaraları ve referans bilgileri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Real Time PCR analizlerinde bütün reaksiyonlarda güvenilirliği kontrol etmek için hedef DNA (mikrobiyal) içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olduğunu göstermek amacıyla analizler en az 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Reaksiyonlarda toplam mikroorganizma varlığının göstergesi olarak iç (internal) kontrol (universal 16S rRNA geni) prob ve primerleri eklenmiştir. Eş zamanlı PCR amplifikasyonu 3 µL buffer (10X), 3 µL dNTP (2mM), 1 µL ileri primeri (10 µM), 1 µL geri primeri (10 µM), 1 µL prob (10 µM), 0,5 µL universal ileri primeri (10 µM), 0,5 µL universal geri primeri (10 µM), 0,5 µL universal prob (10 µM), 1 µL DNA, 0,3 µL Taq DNA Polimeraz (5 U/µL) eklenmiş ve toplam hacim nükleaz içermeyen steril H₂O ile 30 µL tamamlanarak yapılmıştır. Real time PCR şartları; 95 °C'de 5 dakika ve 40 döngü, 95 °C 30 saniye ve 55 °C'de 1 dakika şeklinde yapılmıştır. Farklı olan reaksiyonlar sonuçlar kısmında belirtilmiştir.

3.8. Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması ve Data Analizleri

İzole edilen ve konsantrasyonları ölçülen (Materyal Metot 3.3'de belirtildiği gibi) kromozomal DNA'ların 8 kat seyreltilmesi ile standart DNA dilusyonları hazırlanmıştır. Bu DNA standartlarının 3 tekrarlı Real Time PCR analizi gerçekleştirilmiş ve Ct değerleri elde edilmiştir. DNA standartlarının DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayılarının kalibrasyon eğrisi oluşturmak için logaritmik değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. Real Time PCR analizinde kullanılacak primerlerin listesi

Kit	Bakteri	F: ileri ve R: geri primer dizisi 5'=>3' P: prob dizisi' 5'=>3'	Hedef Gen	Dizi Erişim No	Kaynak
E ^{R1}	<i>C. perfringens</i>	F:TTCTATCTTGGAGAGGCTATGCACTATTTT R: TTTCAAACCTAACATGTCCTGCGC P: FAM-TCCATATCATCCTGCTAATGTTACTGCCGTTGA-Q1	<i>plc</i>	BA000016	Skanseng ve ark., 2006
	<i>E. faecalis</i>	F: CGCTTCTTTTCCCTCCCGAGT R: GCCATGCGGCATAAACTG P: HEX- CAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACG-Q1	16S rRNA	AF335185	Shannon ve ark., 2007
	<i>S. aureus</i>	F: CGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTG R: TGCATATATACTGTTGGATCTTCAGAA P: Texas Red- TGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAAAG -Q2	<i>nuc</i>	NC_002951	Elizaquivel ve Aznar, 2008
E ^{R2}	<i>C. jejuni</i>	F: TGCTAGTGAGGTTGCAAAAAGAATT R: TCATTTTCGCAAAAAAATCCAAA P: FAM-ACGATGATTAAATTCACAATTTTTTTTCGCCAAA-Q1	<i>hipO</i>	Z36940	LaGier ve ark., 2004
	<i>E. coli</i> O157:H7	F: AGCCAAAAGCCAGACAGAGT R: CATGACGACCAAAGCCAGTA P: HEX-CGCTATGCATCCGGTCAGTGGCAGTATAGCG-Q1	<i>stx2</i>	X07865	Fratamico ve ark., 2010
	<i>S. enterica</i>	F: CTCACCAGGAGATTACAACATGG R: AGCTCAGACCAAAGTGACCATC P: Texas Red-CACCGACGGCGAGACCGACT- Q2	<i>ttr</i>	AF282268	Malorny ve ark., 2004

Çizelge 3.4'ün devamı

Kit	Bakteri	F: ileri ve R: geri primer dizisi 5'=>3' P: prob dizisi' 5'=>3'	Hedef Gen	Dizi Erişim No	Kaynak
E ^{R3}	<i>B. melitensis</i>	F: CCAGCTTTTGGCCTTTTCC R: TCGCATCGGCAGTTTCAA P: FAM-CCTCGGCATGGCCCCGCAA-Q1	<i>BMEII0466</i>	NC_003318	Hinic ve ark., 2008
	<i>C. sakazakii</i>	F: GGGATATTGTCCCCTGAAACAG R: CGAGAATAAGCCGCGCATT P: Texas Red-GTAGTAGTTGTAGAGGCCGTGCTTCCGAG-Q2	<i>mms</i>	L01755	Seo ve Brackett, 2005
	<i>L. monocytogenes</i>	F: CATGGCACCACCAGCATCT R: ATCCGCGTGTTCCTT TTCGA P: HEX-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-Q1	<i>hly</i>	M24199	Rodriguez-Lazaro ve ark., 2004
E ^{R4}	<i>A. hydrophila</i>	F: GGCCTTGCGCGATTGTATAT R: GTGGCGGATCATCTTCTCAGA P: HEX-CAGGTGGGATTATCTAGTTG-Q1	<i>aerA</i>	DQ455052	Trakhna ve ark., 2009
	<i>B. cereus</i>	F: CGCCGAAAGTGATTATACCAA R: TATGCCCCGTTCTCAAACCTG P: FAM-GGGAAAATAACGAGAAATGCA-Q1	<i>ces</i>	DQ360825	Fricker ve ark., 2007
	<i>K.pneumoniae</i>	F: CCTGGATCTGACCCTGCAGTA R: CCGTCGCCGTTCTGTTC P: Texas Red-CAGGGTAAAAACGAAGGC-Q2	<i>phoE</i>	AF064793	Shannon ve ark., 2007
	Universal Primerler ve prob	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT P: Cy5-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-Q2	16S rRNA		Nadkarni ve ark., 2002

Kalibrasyon eğrileri basit regresyon analizi ile ortalama Ct değerine karşı logaritmik DNA konsantrasyonu (ng/ μ L) veya logaritmik mikroorganizma sayısı (kob/mL) kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca basit regresyon analizi ile korelasyon katsayı (r^2) değerleri ve regresyon denklemleri de ($y=ax+b$) hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısının değeri kalibrasyon eğrisinin hassasiyetini belirlemektedir. Regresyon denklemleri ise gıda numunelerinin analizinde elde edilen Ct değerlerine (y) karşılık gelen DNA konsantrasyonu veya mikroorganizma sayısını (x) belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Data analizleri Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System software ve Microsoft Excel kullanılarak yapılmıştır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Konvansiyonel PCR Yaklaşımı ile Hedef Gıda Patojenlerin Tanımlanması

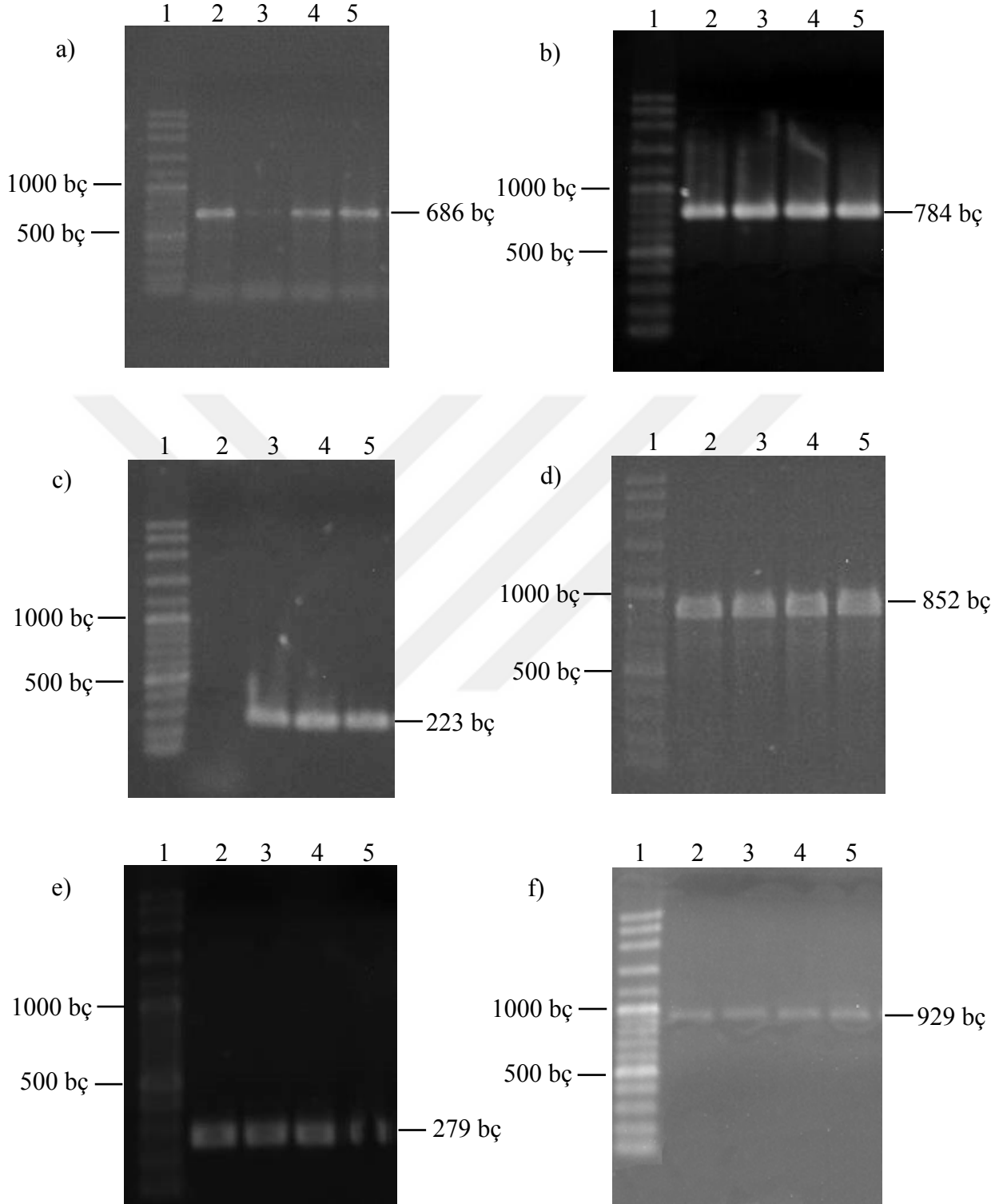
Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar gıda zehirlenmesi ve gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en önemli etmenlerin başında gelmektedir. Patojen mikroorganizmalar gıdaların üretimden tüketime kadar olan sürecinin her aşamasında gıdalara bulaşabilmektedir. Dolayısı ile gıdalarda hızla çoğalan patojenler ürettikleri metabolit ve toksin gibi sağlık açısından potansiyel tehlike oluşturan etmenler ile gıdaların bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları doğru tanımlamak, potansiyellerini belirlemek ve önlem alabilmek önem taşımaktadır. Moleküler teknikler gıdalarda hastalık etkeni olan mikroorganizmaların taksonomik seviyede teşhis etmek ve mikrobiyal yüklerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin hibridasyonuna dayalı olan bu metotlar içinde en yaygın kullanılan teknik ise yüksek duyarlılığı ve çok yönlülüğü ile konvansiyonel PCR tekniğidir. Teknik ayrıca bir sonraki adım olarak nükleotid dizileme teknolojinin uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Böylelikle genom ile ilgili daha çok ve daha güvenilir bilgi elde edilebilmektedir.

Çalışmamızın bu bölümünde gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bazı gıda patojenlerinin (Çizelge 3.1) konvansiyonel PCR metodu ile tanımlanabilmesi için yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Çalışma için gerekli referans bakteri suşları temin edilmiş ve her bir referans bakteri suşu uygun koşullarda sıvı ve katı besiyerlerinde (Çizelge 3.1) inkube edilmiş, gelişme gösteren referans suşlar proje ve daha sonraki çalışmalar için laboratuvarında stokları alınmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca PCR çalışmalarında kullanılmak üzere referans suşlardan kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu kapsamda hedef gıda patojenlerinin herbirinin spesifik PCR amplifikasyonları tekli ve multipleks reaksiyonlarda gerçekleştirilmiştir. Nükleotid dizi analizi ile valide edilmiş ve çoklu PCR amplifikasyonları ile de hedef gıda patojenlerini kalitatif olarak belirleyebilen yeni tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

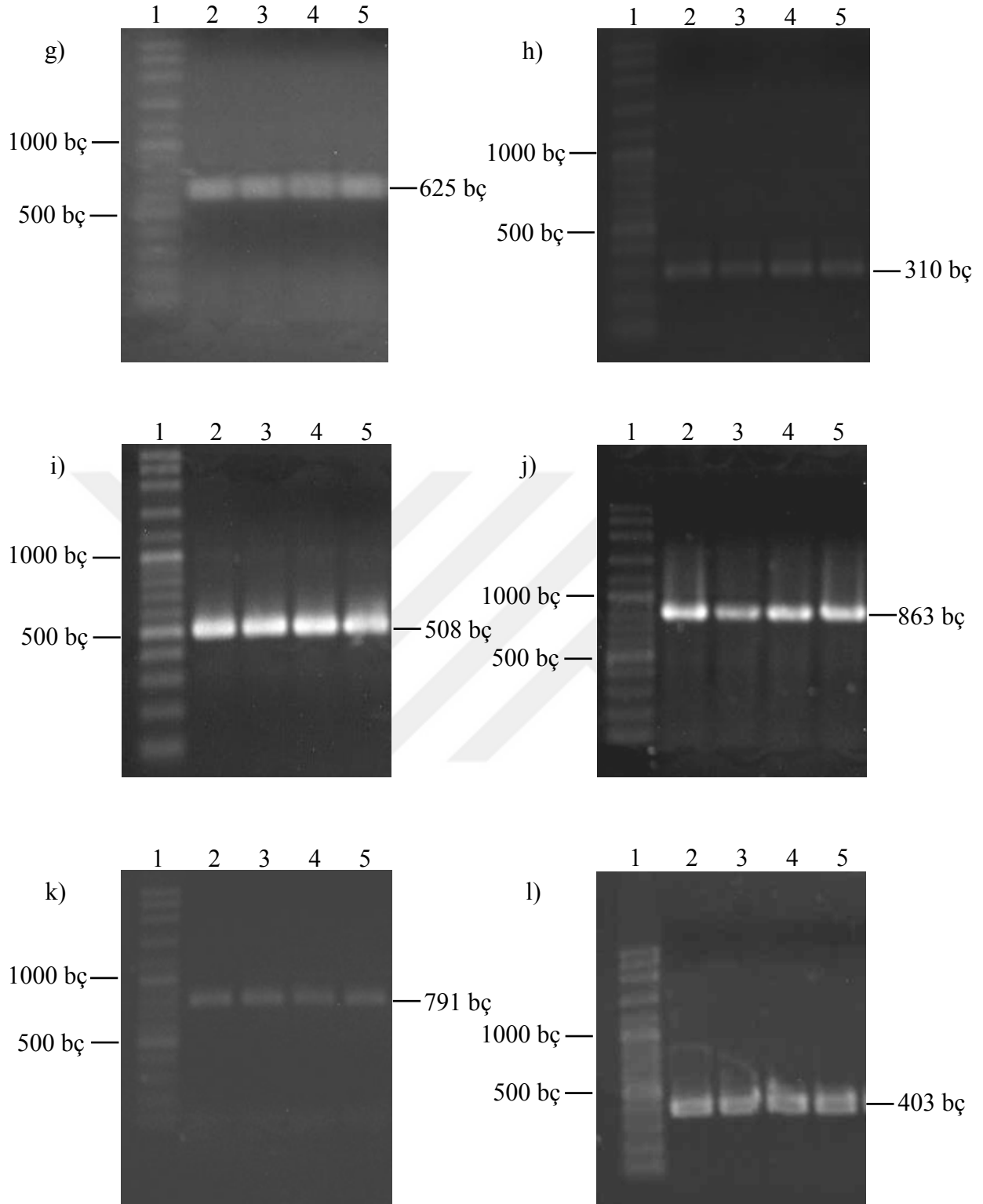
4.1.1. Unipleks PCR

Referans bakteri suşlarının Konvansiyonel PCR yöntemi ile tanımlanabilmesi için Materyal ve Metot bölümünde belirtildiği gibi hedef gen bölgeleri seçilmiş ve o bölgelere özgü primerler (Çizelge 3.3) ile amplifikasyon yapılmıştır. PCR amplifikasyonları Materyal

ve Metot bölümünde belirtilen PCR koşullarında gerçekleştirilmiş ve her patojen için tekli amplifikasyonların %1'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. (a-f) Referans suşların PCR amplifikasyonu. 1: Markır (100 bç), 2-5: Yapışma sıcaklığı 55-58 °C'de uygulanmış amplifikasyon sonucu. a: *A. hydrophila* (686 bç), b: *B. cereus* (784 bç), c: *B. melitensis* (223 bç), d: *C. jejuni* (852 bç), e: *C. perfringens* (279 bç), f: *C. sakazakii* (929 bç)



Şekil 4.1. (g-l) Referans suşların PCR amplifikasyonu. 1: Markır (100 bç), 2-5: Yapışma sıcaklığı 55-58 °C’de uygulanmış amplifikasyon sonucu. g: *E. coli* O157:H7 (625 bç), h: *E. faecalis* (310 bç), i: *K. pneumoniae* (508 bç), j: *L. monocytogenes* (863 bç), k: *S. aureus* (791 bç), l: *S. enterica* (403 bç)

PCR teknolojisi gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları tespit edebilmek için mikrobiyal tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknoloji ile taksonomik seviyede ayırım yapabilmek için takson içerisindeki heterojenite ve filogenetik mesafe amplifiye edilecek hedef bölge seçiminde önem taşımaktadır. Yüksek derecede korunmuş 16S rRNA bölgesi taksonlar arasındaki ilişkiyi belirlemek ve cins ve tür bazında ayırım yapabilmek için tercih edilen gen bölgeleri arasında yer almaktadır (Rijpens ve Herman, 2002). 16S rRNA bölgesinin uzunluğu (yaklaşık 1500 bp), bütün bakterilerde bulunan çoklu kopya sayısı, bakteriler arasında korunmuş ve değişken bölgelere sahip olmasından dolayı uygun hedef bölge olarak düşünülmektedir (Beneduce ve ark., 2007). Bu çalışmada da referans suşların tür bazında identifikasyon için 16S rRNA bölgesi seçilmiş ve bu bölgenin amplifikasyonu ile mikrobiyal tanımlama yapılmıştır. Sadece *E. coli* O157:H7 referans suşunun tanımlaması *flic* genin amplifikasyonu ile yapılmıştır. Çalışmamızda bütün referans suşların moleküler tanımlaması başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.1).

Konvansiyonel PCR teknoloji birçok gıda kaynaklı patojenlerin mikrobiyal identifikasyonunda kullanılmaktadır (Baily ve ark., 1992; Cagney ve ark., 2004; Hassan ve ark., 2007; Gierczynski ve ark., 2007; Haitao ve ark., 2011). Bu teknolojinin en önemli özelliklerinden biri patojen mikroorganizmaya özgü DNA veya RNA'nın varlığı ile taksonomik seviyede aynı türe ait iki bakteri suşunu bile ayırt edebilecek hassasiyete sahip olmasıdır (Nannapaneni, 2012). Ayrıca hızlı, tekrarlanabilirliği, spesifikliği ve ucuz olması gibi avantajlarından dolayı diğer metotlara (kültür ve koloni bazlı metotlar, immünojenik metotlar gibi) göre daha avantajlı bir tekniktir. Ancak çapraz kontaminasyon riskinin yüksek olması, primer kaynaklı sorunlar ve en önemlisi ise miktar ile ilgili tam anlamıyla bilgi vermemesi gibi sınırlamalara sahiptir.

4.1.2. Konvansiyonel PCR ile tanımlanan mikroorganizmaların nükleotid dizileme ile teyit edilmesi

Tekli konvansiyonel PCR amplifikasyonu ile başarılı bir şekilde tanımlanan referans mikroorganizmaların identifikasyonunun doğruluğunu teyit etmek amacıyla elde edilen PCR ürünlerinin nükleotid dizileri belirlenmiştir. PCR'ın bir sonraki adımı olan nükleotid dizilemede sanger zincir sonlandırma yöntemi (Sanger ve ark., 1977) olarak adlandırılan teknik kullanılmıştır. Dizileme ileri ve geri yönde olmak üzere 3 tekrarlı olarak okunmuş ve elde edilen nükleotid dizilerinden konsensus diziler oluşturulmuştur (Çizelge 4.1). Konsensus diziler Blast programı kullanılarak Genbank veri tabanındaki diziler ile

benzerlikleri karşılaştırılmış ve türlerin doğruluğu teyit edilmiştir. Patojen mikroorganizmalara ait konsensus dizilerinin veri tabanındaki referans türler ile benzerlikleri % 99-100 arasında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. PCR amplifikasyonu ile elde edilen tanımlama fragmentlerinden okunan nükleotid dizileri

Referans suş	Nükleotid dizilim (5'=>3')
<i>A. hydrophila</i> (686 bç)	GCACAGTAATTCTCTGCRAGAGCCGGCTACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGG GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCCGTTGGATAAGTTAG ATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTTG TAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG GTGGCGAAGGCCGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCC TTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGYAGAGATRCGG GAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTGSSCAGCACGA
<i>B. cereus</i> (784 bç)	GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA GTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAA TAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGT GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCAAGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC TAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTGTGAAAGTAAACGCATTAAGCACTCCGCCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAA AACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTGTCGATGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGT TGCC
<i>B. melitensis</i> (223 bç)	GAAGGGGGGGGGGTGAGAGTCCGGCTTTTTCCGAGTCAGACGTTGCCTAATTGGGCCTATA ACGGCACCGCCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGC TTTACCCGGAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAAACATCAAATCGGTGCGAG ACCTGAAAGGCAAGCGCGA
<i>C. jejuni</i> (852 bç)	AATCTAATGGCTTAACCATTAAGTGTCTGGGAAACTGATAGTCNAGAGTGAGGGAGAGG CAGATGGAANTGGTGGTGTAGGGGTAATAATCCGTAGATATCACCAAGAATACCCATTGCG AAGGCGATCTGCTGGAACCTCAACTGACGCTAAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTNACGATGTACACTAGTTGTTGGGGTGTAGCCA TCTCAGTAATGCAGCTAACGCATTAAGTGTACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAA AACTCAAAGGAATAGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGN TACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGATATCCTAAGAACCTTATAGAGATATGAGGGTGC TAGCTTGCTAGAACCTTAGAGACAGGTGCTGCACGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGAT GTTGGGTTNAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCACGTATTTAGTTGCTAACGGTTCGGCCGA GCACTCTAAATAGACTGCCTTCGTNAGGAGGAGGAAGGTGTGGACGACGTCAAGTCATCA TGGCCCTTATGCCCAGGGCGACACACGTGCTACAATGGCATATACAATGAGACGCAATAC CGCGAGGTGGAGCAAATCTATAAAATATGTCCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAG AGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCCATGCTACGGTGAATACGTTCCC GGGTCTTGTACTCACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGATTTCACTCGAAGCCGGAATAC TAAACTAGTTAC

Çizelge 4.1'in devamı

Referans suş	Nükleotid dizilim (5'=>3')
<i>C. perfringens</i> (279 bç)	AAAGATGGCATCATCATTCAACCAAAGGAGCAATCCGCTATGAGATGGACCCACGGCGCA TTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCNNAACTNNNNCGGGAGGCAGCAGTNGGGA ATATTGCACAATGGGGGAAACCTTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG GATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAAGATAATGACGGTA
<i>C. sakazakii</i> (929 bç)	GCTCTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGG ATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCT TCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCT CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGAC ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGA GGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCGGCT AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG CGTAAAGCGCACGAGCGGTTGATTAAGTCAGATGTGAAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG AACTGCATTTGAAACTGGTCAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAG CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACGAAG ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG TCTTGACATCCAGAGAATCCTGCAGAGAT
<i>E. coli</i> O157:H7 (625 bç)	CTTTTCTTTTACAGCGCGAGGATGACGCCGAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACTT CTAACATTAAGGCCTGACTCAGGCGGCCGTAACGCCAACGACGGTATTTCTGTTGCGC AGACCACCGAAGGCGCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTTACAGCGTATTCGTGAACTGA CGGTTACGGCCACTACAGGGACTAACTCCGATTTCTGACCTGGACTCCATCCAGGACGAAA TCAAATCTCGTCTTGATGAAATTGACCGCGTATCCGGCCAGACCCAGTTCAACGGCGTGA ACGTGCTGGCGAAAGACGGTTCAATGAAAATTCAGGTTGGTGCGAATGACGGCGAAACCA TCACGATCGACCTGAAAAAATCGATTCTGATACTCTGGGTCTGAATGGCTTTAACGTAA ATGGTAAAGGTACTATTACCAACAAGCTGCAACGGTAAGTGATTTAACTTCTGCTGGCG CGAAGTTAAACACCACGACAGGTCTTTATGATCTGAAAACCGAAAAATACCTTGTAACTA CCGATGCTGCATTCGATAAATTAGGGAATGGCGATAG
<i>E. faecalis</i> (310 bç)	TWCCATTSATAKTCGCTGATGGATGGACCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG CTCACCAAGGCCACSATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTC TGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGA GAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCGACGG
<i>K. pneumoniae</i> (508 bç)	GCCCCGGGGTCCCTGCCTTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCT GGTAGTCCACCGCGTAAACGATGTGCAATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG GAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGA ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA CCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTACCAGAGATGCCTTGGTGCCTTCGGGATGT GTGTAAGAAAAA
<i>L. monocytogenes</i> (863 bç)	GGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG GCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT CTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACCGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTAGTG CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAA GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCTTCGGGG ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGT CCCCGAACGAGCGCAACCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTG ACTGCCGGTGAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGC

Çizelge 4.1'in devamı

Referans suş	Nükleotid dizilim (5'=>3')
<i>S. aureus</i> (791 bç)	CGGCATATATTTTGACCGCATGGTTCAAAGTGAAGACGGTCTTGCTGTCACCTTATAGATG GATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAGC CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGGCAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTG ATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTG TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTT TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAA CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT GTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAAGTGAAGTGAAG TGTTAGGTGCGCCCCCTATAAGAATGGCCCTCTCTCTGTGTTACGGGCGTGGACCTAC AGGGTTTCTCAATCCTGGTTTGTATCCCACCGCTTTCGCCCATCAGCGTAAAGTGCAGACA GAAAGTGCATCCCCTGATGTTCTCATATCCTGGCATAACGCTACACATGTATCACTTC TCTCGAACTAAGTCCAGTCAATGACCTCCACGATTGAGACGGTG
<i>S. enterica</i> (403 bç)	TAAAAGGGCCGGAAGGGTGATTATGTCTGGCAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTG GAACGGTGGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTT GCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGTGGTAAACGGCTCACCAAGGCGA CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG CCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTG TGGGTTAATAA

Zincir sonlandırma yaklaşımı ile nükleotid dizileme teknoloji moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmış ve ilk insan genom projesi bu metot ile tamamlanarak referans oluşturmuştur. Bu teknoloji sayesinde genom ile ilgili daha çok ve daha güvenilir bilgi elde edilebilmektedir. Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar bu yaklaşım ile analiz edilerek patojenlerin genetik farklılıklarının ortaya çıkması, virülans ve patojenik özelliklerin evrimleşmesi ve patojenlerin zor koşullarda bile hayatta kalabilme ve büyüme yetilerinin altında yatan genetik faktörler ortaya çıkabilmektedir (Gilmour ve ark., 2010). Bu çalışmada ise genetik farklılıklar baz alınarak türlerin teyidi yapılmıştır.

4.1.3. Multipleks PCR

Çoklu PCR (Multipleks PCR) aynı PCR amplifikasyonunda bir ya da birden çok kalıp DNA ve primer çifti kullanılarak hedeflenmiş bölgenin çoğaltılabildiği, PCR'dan türevlendirilmiş moleküler bir yöntemdir. Multipleks PCR analizlerinde kısa sürede ve daha az maliyet ile istenilen PCR tepkimeleri gerçekleştirilebilmekte ve birden fazla hedef DNA bölgesi çoğaltılabilmektedir. Bu avantajları ile birlikte multipleks PCR yöntemi gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tanımlanması da dahil olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Multipleks PCR tekniğinde en kritik noktalardan biri aynı reaksiyonda kullanılacak primerlerin uyumlu tasarlanmasıdır. Spesifik PCR

amplifikasyonları için primer tasarlarken primerin uzunluğu, hedef bölgenin uzunluğu, primerlerin erime sıcaklıkları, ileri ve geri primer arasındaki erime sıcaklığı farkı, primerlerin G/C nükleotid oranı ve primerlerin 3' ucundaki bazların özellikleri gibi parametreler dikkate alınmaktadır (Markoulatos ve ark., 2002). Multipleks PCR'da bunlara ilaveten kullanılan bütün primerler arasındaki erime sıcaklığının birbirlerine uyumlu olması, bütün primerler arasındaki olası primer dimerizasyonu, primerlerin özgülüğü ve jel elektroforezinde amplifikasyon ürünlerinin birbirinden ayrılabilmesi önem taşımaktadır (Shen ve ark., 2010). Multipleks PCR amplifikasyonlarının optimizasyonu zor olmakla beraber kullanılan primer sayısının artması optimizasyonu daha da güç hale getirebilmektedir (Markoulatos ve ark., 2002; Shen ve ark., 2010; Perkel, 2012).

Multipleks PCR validasyon aşamasında PCR bileşenleri ve PCR şartları çeşitli rollere sahip faktörlerdir. Multipleks PCR reaksiyonlarında PCR bileşeni olarak kalıp DNA, primer, dNTP, tampon çözelti ve DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Tek primer çiftinin kullanıldığı PCR reaksiyonunda primer konsantrasyonu 0,05 μ M ve 0,4 μ M arasında değişmekte ancak çoklu PCR reaksiyonlarında primer konsantrasyonunun daha az olması gerekmektedir (Perkel, 2012). Metot validasyonu aşamasında primerlerin konsantrasyonunun başlangıçta eşit kullanılmış daha sonra PCR ürününün varlığı ve yoğunluğuna göre değişiklik yapılmıştır. Eğer PCR amplifikasyonu zayıf bant oluşturmuş ise primer miktarı artırılmış, yoğun ise azaltılmıştır. Kullanılan kalıp DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu da PCR reaksiyonlarında önem taşımaktadır. İzole edilen toplam DNA'nın saf olmaması ya da konsantrasyonunun yüksek olması amplifikasyon reaksiyonlarında inhibitör etki oluşturmakta ve jel görüntüsü incelendiğinde çok fazla miktarda eklenen kalıp DNA'lar jel üzerinde kirlilik oluşturmaktadır. Primer konsantrasyonunun aksine DNA polimeraz, MgCl₂ ve dNTP miktarları çoklu PCR amplifikasyonlarında daha fazla kullanılmıştır. dNTP oranı 0,2 mM yerine 1 mM, MgCl₂ 1,2 ve 2 mM yerine 2,5 mM ve toplam hacmi 40 μ L olan bir reaksiyon için 1,25 Unite yerine 5 Unite DNA polimeraz kullanılmıştır. Ayrıca Hot Start DNA polimeraz gibi özel olarak tasarlanmış DNA polimerazlar, özellikle çoklu PCR amplifikasyonlarında diğer polimerazlara oranla hedef bölgenin çoğaltılmasında daha karakteristik özellik taşımakta ve tercih edilmektedir. Reaksiyonda MgCl₂ miktarı DNA polimeraz enzimine bağlı olarak artırılmış ve tepkimelerde zayıf PCR ürünlerinin daha yoğun olarak görüntülenmesi sağlanmıştır. Çok sayıda primer çiftinin kullanılması primerlerin özgül olmayan bölgelere bağlanmasına neden olmaktadır (Shen ve ark., 2010). dNTP özellikle çoklu PCR amplifikasyonlarında valide

edilmesi gereken parametreler arasında yer almaktadır (Markoulatos ve ark., 2002). PCR'in temel bileşenleri dışında dimetil sülfoksit (DMSO), Bovin Serum Albumin (BSA), formamit ve gliserol gibi kimyasallar özellikle G/C bakımından zengin hedef bölgelerin çoğaltılması ve Multipleks PCR gibi zor tepkimelerde PCR etkinliğini artırmak amacıyla kullanılmıştır. Uygun primer yapışma sıcaklıklarının tespit edilmesinde gradient yapışma sıcaklıkları denenerek tespit edilmiştir.

Multipleks PCR yöntemi ile gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tanımlanması aynı PCR amplifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda aynı amplifikasyon ile farklı patojen mikroorganizmaların varlığını tespit edecek yeni Multipleks PCR protokolleri geliştirilmiştir. Her bir Multipleks PCR gruplarına özel hedef patojenlerin en uygun PCR koşullarını belirleyebilmek için öncelikle türe özel PCR protokolü oluşturulmuş daha sonra protokoller birleştirilerek çoklu PCR amplifikasyon protokolü oluşturulmuştur. Multipleks protokoller oluşturulurken patojenlerin enfeksiyon dozları ve en çok bulunduğu gıda numuneleri dikkate alınarak gruplandırma yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Yapılan Multipleks PCR amplifikasyonlarında primerler ve konsantrasyonları başta olmak üzere PCR bileşenlerinin konsantrasyonlarında ve PCR koşullarında çeşitli değişiklikler yapılmıştır. Kalıp DNA olarak steril suda çözülmüş koloniler ve kit kullanılarak izole edilen kromozomal DNA'lar kullanılmış ve metot optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tezin bu bölümünde E^{M1}, E^{M2}, E^{M3} ve E^{M4} olarak adlandırılan ve her birinde üç farklı patojen kullanılan Multipleks PCR koşulları denenmiştir.

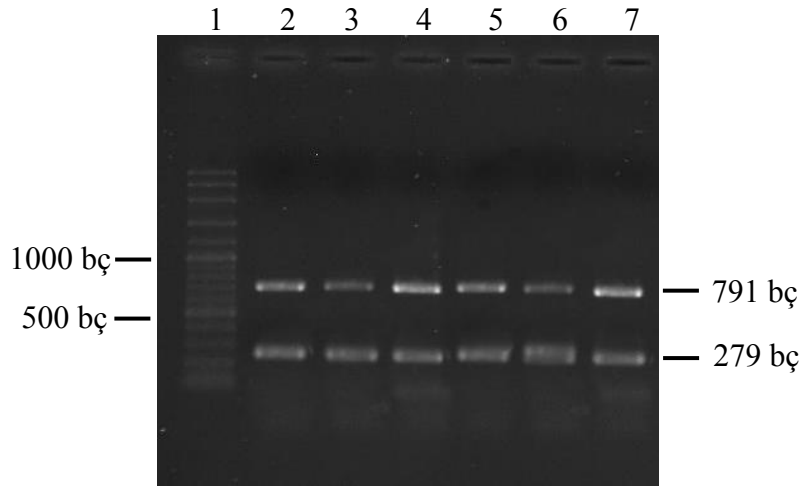
4.1.3.1. E^{M1} grubu için multipleks amplifikasyon

E^{M1} olarak planlanan multipleks PCR amplifikasyonunda; *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerin birlikte farklı baz çifti uzunlukta amplifikasyonları hedeflenmiştir. Bu multipleks amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. E^{M1} grubu için yapılan optimizasyonda öncelikle primerlerin grup içerisindeki özgünlüğü grup içindeki türlerin 16S rRNA dizilimleri ile primerleri Clone Manager ve Clustal W programı kullanılarak biyoinformatik açıdan kontrol edilmiştir. Literatürde verilen *C. perfringens* ve *S. aureus* patojenlerine ait geri (R) primerlerinin grup içerisinde sadece kendi türüne özgü olmadığı deneysel çalışmalar ile belirlenmiş, dolayısı ile Cp2R:TCAACTTAATGGTAGTAACTAACGAC ve Sa2R:CTAAGGGGCGGAAACC

CCCTAAC primerleri tez kapsamında tarafımızdan tasarlanarak kullanılmıştır. Cp2R primeri ile *C. perfringens* için hedeflenen bölge uzunluğu 934 bç ve Sa2R primeri ile *S. aureus* patojeni için ise 728 bç olarak belirlenmiştir.

E^M1 grubu PCR işlemi optimizasyon çalışmalarında kalıp DNA olarak 100 µL steril suda çözdürülmüş koloniler ve kit ile izolasyonu yapılan DNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. Koloni PCR amplifikasyonları ilk olarak kalıp DNA ve primer (10 µM) miktarları 1 µL olarak toplam 40 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları ise 94 °C'de 2 dk. ilk ayrıştırma, 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 sn. denatürasyon, 50-55-60 °C'de 30 sn. yapışma ve 72 °C'de 45 sn. uzamanın ardından 72 °C'de 4 dk. son uzama olarak düzenlenmiştir. PCR amplifikasyonları % 1'lik agaroz jel koşturulmuş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir (Şekil 4.2).

PCR amplifikasyonu *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenleri için yapışma sıcaklığı 50→60 °C gradient olarak test edilmiştir. Ancak amplifikasyonda *C. perfringens* (279 bç) ve *S. aureus* (791 bç) özgü PCR amplifikasyonu görülmesine rağmen *E. faecalis* patojeni için beklenen 310 bç amplifikasyon görülmemiştir. Buna neden olarak *C. perfringens* (279 bç) ve *E. faecalis* (310 bç) patojen mikroorganizmalara ait bant uzunluklarının birbirine yakın olması ve %1'lik agaroz jelde PCR bantların birbirlerini gölgeleyebileceği düşünülmüştür.

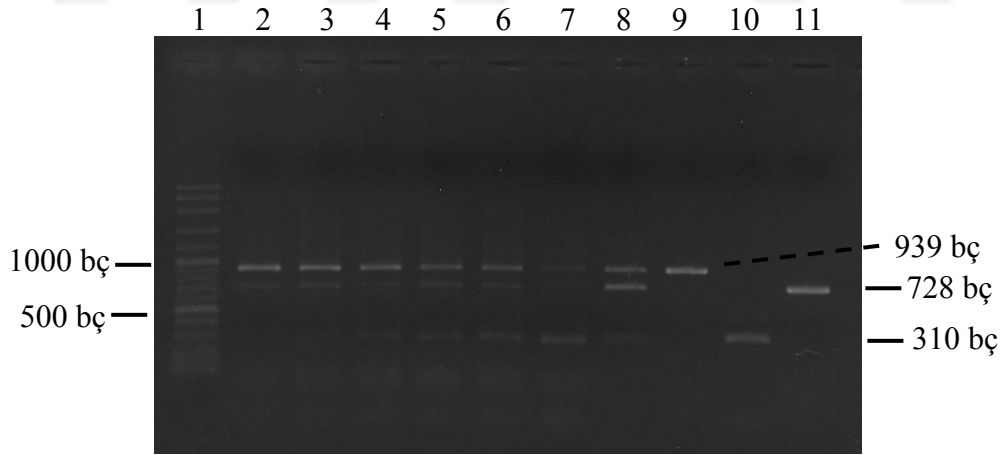


Şekil 4.2. E^M1 grubu (*C. perfringens* 279 bç, *E. faecalis* 310 bç ve *S. aureus* 791 bç) Multipleks PCR analizi sonucu elde edilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü. 1: Markır, 2-3: Yapışma sıcaklığı 50 °C, 4-5: Yapışma sıcaklığı 55 °C 6-7: Yapışma sıcaklığı 60 °C

C. perfringens patojen mikroorganizması için geri primeri tekrar tasarlanarak (Cp2R:TCAACTTAATGGTAGTAACTAACGAC) hem daha spesifik bir primer elde edilmiş hem de üç patojen mikroorganizmanın bant uzunlukları arasındaki mesafe

birbirlerinden etkilenmemesi açısından daha geniş tutulmuştur. *C. perfringens* patojen mikroorganizma için yeniden tasarlanan Cp2R geri primeri ile hedeflenen amplifikasyon 279 bç yerine hedef bölge 934 bç uzunluğunda ve Sa2R geri primeri (CTAAGGGGCGGAAACCCCTAAC) ile *S. aureus* patojeni için ise 791 bç yerine 728 bç uzunluğunda olacağı tahmin edilmiştir.

C. perfringens, *E. faecalis* ve *S. aureus* için kalıp DNA, ileri primer ve geri primer oranları farklı miktarlarda uygulanarak 55 °C'de 45 sn. yapışma sıcaklığında yeni PCR amplifikasyonu ile 3 patojeni belirleyebilen 3 bant (310, 728 ve 934 bç) elde edilmiştir (Şekil 4.3). Aynı PCR koşullarında hedef patojen mikroorganizmalar için tekli amplifikasyon (Şekil 4.3, Line 9-10-11) gerçekleştirilmiş, ayrıca tekli amplifikasyon ürünleri jele yükleme esnasında karıştırılarak çoklu amplifikasyon görüntüsü (Şekil 4.3, Line 8) elde edilmiştir. Böylece gerçekleşen amplifikasyonların doğruluğu teyit edilmiştir. Şekil 4.3, Line 2-3'de *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* için DNA ve primer oranları patojenler için eşit olmak üzere sırasıyla 0,5 µL ve 5 µM olarak uygulandığında sadece *E. faecalis* patojeni için amplifikasyonun gerçekleşmediği görülmüştür. *E. faecalis* (DNA:1-1,5 µL ve primer: 10-15 µM) ve *S. aureus* (DNA:1 µL ve primer: 10 µM) için DNA ve primer oranları artırıldığında ise çoklu amplifikasyon olumsuz etkilenmiştir.



Şekil 4.3. E^{M1} grubu Cp2R ve Sa2R primerleri kullanılarak modifiye edilmiş Multipleks PCR amplifikasyon görüntüsü. 1: Marker, 2-7: E^{M1} grubu patojenlerin farklı koşullarda çoklu PCR amplifikasyonu, 8: Mutipleks PCR amplifikasyonunun jel görüntüsü, 9: *C. perfringens* (939 bç) patojenin tekli amplifikasyon görüntüsü, 10: *E. faecalis* (310 bç) patojenin tekli amplifikasyon görüntüsü, 11: *S. aureus* (728 bç) patojenin tekli amplifikasyon görüntüsü

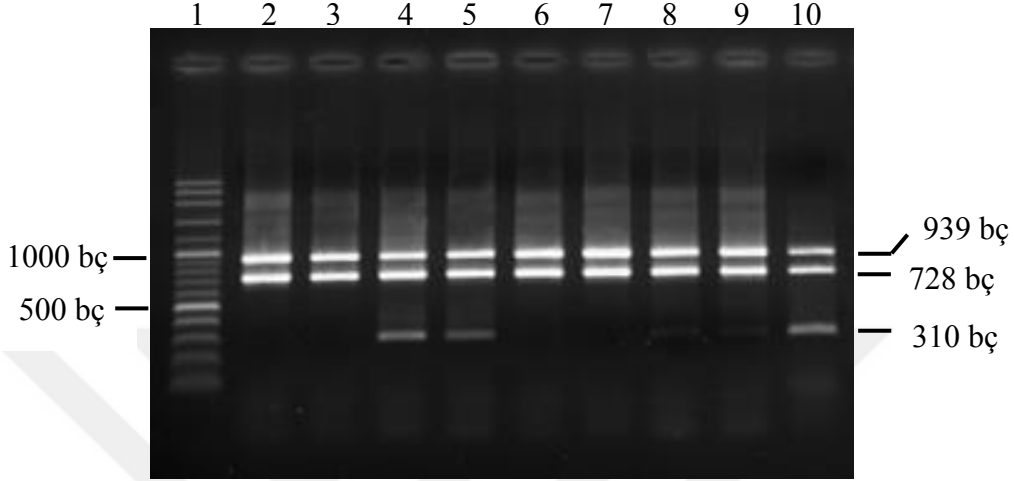
Suda çözündürülmüş koloniler Kalıp DNA olarak kullanıldığında çoklu PCR amplifikasyonu için en uygun PCR koşulları (94 °C'de 2 dk. ilk ayrıştırma, 35 döngü olmak

üzere 94 °C'de 30 sn. denatürasyon, 55 °C'de 45 sn. yapışma sıcaklığı ve 72 °C'de 45 sn. uzama ardından 72 °C'de 4 dk. son uzama) belirlenmiştir.

Kalıp DNA olarak kit kullanarak izole edilen genomik DNA kullanıldığında ise sadece DNA ve primer konsantrasyonlarında değişiklikler uygulanarak *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerinin çoklu PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). *C. perfringens* (DNA konsantrasyonu 514 ng/uL ve primer konsantrasyonu 10 uM), *E. faecalis* (DNA konsantrasyonu 239 ng/uL ve primer konsantrasyonu 10 uM) ve *S. aureus* (DNA konsantrasyonu 303 ng/uL ve primer konsantrasyonu 5 uM) çoklu amplifikasyonunda *C. perfringens* ve *S. aureus* patojenleri başarılı bir şekilde amplifiye olmuşken *E. faecalis* patojenine özgü bant elde edilememiştir (Şekil 4.4, Line 2-3). *E. faecalis* (DNA konsantrasyonu 358,5 ng/uL ve primer konsantrasyonu 15 uM) ve *S. aureus* (DNA konsantrasyonu 606 ng/uL ve primer konsantrasyonu 15 uM) patojenlerinin DNA ve primer konsantrasyonları artırıldığında (Şekil 4.4, Line 6-7) ise yine beklenen çoklu amplifikasyon gerçekleşmemiştir. DNA ve primer konsantrasyonu *C. perfringens* (DNA konsantrasyonu 257 ng/uL ve primer konsantrasyonu 5 uM) için azaltılıp *E. faecalis* (DNA konsantrasyonu 358,5 ng/uL ve primer konsantrasyonu 15 uM) için artırılmış, hedef patojenlerinin çoklu amplifikasyonunun gerçekleştiği görülmüş ancak *E. faecalis* patojeninin varlığı zayıf bir bant şeklinde tespit edilmiştir (Şekil 4.4, Line 8-9). Sadece *E. faecalis* patojeninin (DNA konsantrasyonu 358,5 ng/uL ve primer konsantrasyonu 15 uM) DNA ve primer konsantrasyonu artırılarak gerçekleşen amplifikasyon ile beklenen bant uzunlukları elde edilmiş ve çoklu PCR amplifikasyonu başarı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.4, Line 4-5). Şekil 4.4, Line 10'da bulunan çoklu bantlar amplifikasyonların doğruluğunu teyit etmek amacıyla patojenlere ait tekli amplifikasyonların çoklu PCR görüntüsüdür.

C. perfringens, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojen mikroorganizmalarını tek bir reaksiyonda belirleyebilen Multipleks PCR protokolü daha önce tanımlanmamıştır. Böylece E^M1 protokolü bu üç patojen mikroorganizmayı tek bir reaksiyonda tanımlayabilen özgün Multipleks PCR protokolü niteliği taşımaktadır. *C. perfringens* patojeni için yapılan Multipleks PCR çalışmaları genellikle toksin genlerini (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* ve *cpb2*) belirlemek amacıyla yapılmıştır (Meer ve Songer, 1997; Yoo ve ark., 1997; Kanakaraj ve ark., 1998; Garmory ve ark., 2000; Baums ve ark., 2004). *E. faecalis* patojen mikroorganizması çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilen olağanüstü yeteneği ile dikkat çeken önemli bir mikroorganizmadır. Bu karakteristik özelliği ile Multipleks PCR analizlerinde vankomisine direnç genleri (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* gibi) hedef bölge

olarak belirlenmiş ve diğer enterokok mikroorganizmalar ile beraber identifikasyonu yapılmıştır (Patel ve ark., 1997; Kariyama ve ark., 2000; Depardieu ve ark., 2004). İlâveten, bu patojen için 16S rRNA geni cinse özgü ve süperoksit dismutaz geni (*sodA*) türe özgü Multipleks PCR ile tanımlamalarda kullanılan hedef bölgeler arasında yer almaktadır (Jackson ve ark., 2004; Layton ve ark., 2010).



Şekil 4.4. E^{M1} grubu çoklu PCR amplifikasyon görüntüsü. 1: Marker, 2-9: E^{M1} grubu patojenlerin (*C. perfringens* 939 bç, *E. faecalis* 310 bç ve *S. aureus* 728 bç) farklı DNA ve primer konsatrasyonu ile gerçekleşen çoklu amplifikasyonları, 4-5: E^{M1} grubu patojenlerin üçlü amplifikasyonu, 10: E^{M1} grubu patojenlerin tekli amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünlerinin karıştırılarak jelin tek kuyucuğuna yüklenip elde edilen çoklu amplifikasyon görüntüsü

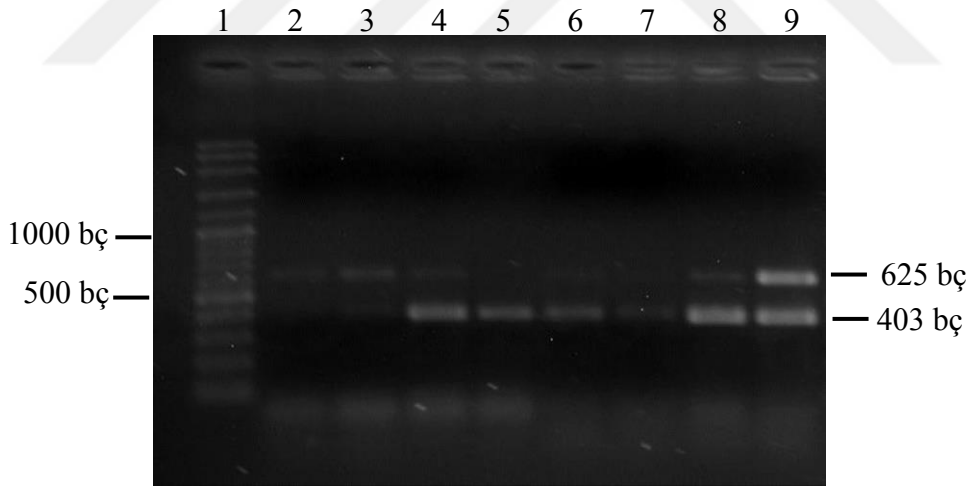
Ayrıca *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerine özgü hedef genler ile eş zamanlı yeni bir Multipleks PCR protokolü geliştirilmiştir (Ramos-Trujillo ve ark., 2003). *S. aureus* patojen mikroorganizması en çok bilinen gıda kaynaklı patojenler arasındadır ve birçok Multipleks PCR uygulamalarında yer almaktadır.

C. perfringens ve *E. faecalis* patojen mikroorganizmalarında olduğu gibi bu patojende de genellikle Multipleks çalışmalar tek bir türde ve birden fazla hedef gen seçilerek uygulanmıştır. Seçilen hedef genler ise yine türe özgü, virülans özelliği taşıyan ve antibiyotik direnç genleri gibi genler olup 16S rRNA geni ise pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır (Mehrotra ve ark., 2000; Pérez-Roth ve ark., 2001; Strommenger ve ark., 2003). Bu çalışmada ise E^{M1} grubunda yer alan patojenlerin tür bazında ayırımı için yeterli özgünlüğe sahip 16S rRNA bölgesi hedef bölge olarak amplifiye edilmiştir.

4.1.3.2. E^{M2} grubu için multipleks amplifikasyon

E^{M2} reaksiyonu için hedeflenen patojen mikroorganizmalar ve bunları tanımlamada kullanılan primer detayları Çizelge 3.3’de verilmiştir. *C. jejuni* patojen mikroorganizması için kullanılan primer çifti ile multipleks reaksiyonlarda beklenen amplifikasyonlar elde edilemediği için Dennis ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada kullanılan primer çifti (F:ATCTAATGGCTTAACCATTAAC- R:GGACGGAACTAGTTAGTATT) kullanılmış ve Cj2F-R olarak isimlendirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA bölgesi için tanımlanan referans primerler ile *C. jejuni* ve *S. enterica* amplifikasyonu gerçekleştirilmiş, *E. coli* O157:H7 patojeni ise *fliC* geninin amplifikasyonu ile tanımlanmıştır.

C. jejuni, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenlerinin Multipleks PCR amplifikasyonları için PCR şartları (kalıp DNA, 10 µM F ve R primer, 4 µL 10X tampon, 4 µL 2 mM dNTP, 0,3 µL Taq DNA polimeraz (5 U/mL) ve steril su ile 40 µL’ye tamamlama) belirlenmiştir. PCR koşulları ise 94 °C’de 2 dk. ilk ayrıştırma, 35 döngü olmak üzere 94 °C’de 30 sn. ayrıştırma, 55 °C’de 30 sn. yapışma ve 72 °C’de 45 sn. uzama ardından 72 °C’de 4 dk. son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenlerinin koloni süspansiyonları kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Şekil 4.5).



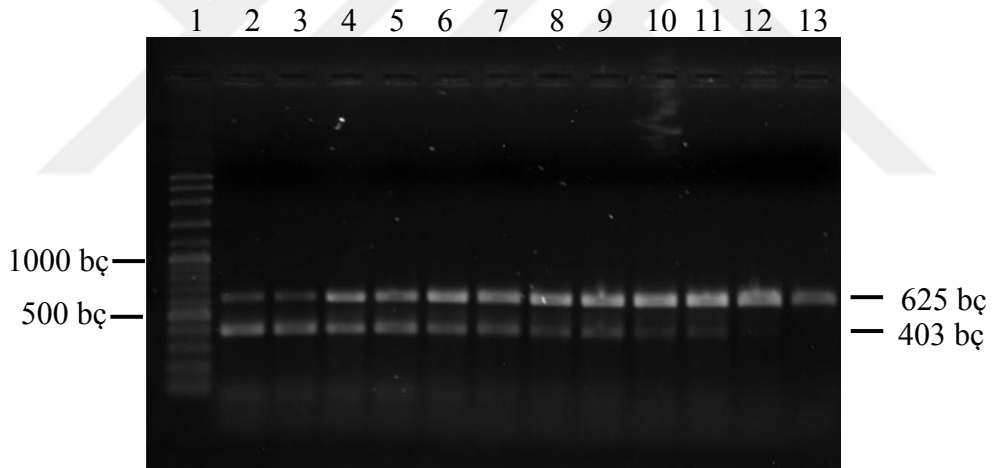
Şekil 4.5. E^{M2} grubu patojen mikroorganizmaların çoklu amplifikasyon görüntüsü.1: Markır, 2-3: *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenleri için DNA miktarları (1 µL) ve primer konsantrasyonları (10 µM) eşit, 4-5: *C. jejuni* için DNA (1 µL) ve primer miktarı (20 µM) artırılmış, 6-7: DNA ve primer miktarı *C. jejuni* için artırılmış (2 µL-20 µM) ve *E. coli* O157:H7 için azaltılmış (0,5 µL-5 µM), 8-9: DNA ve primer miktarı *C. jejuni* için artırılmış (2 µL-20 µM), *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için ise azaltılmış (0,5 µL-5 µM)

Ayrıca 10 µM primer konsantrasyonunda ve yapışma sıcaklığı 55 °C’de 30 sn. olarak uygulandığı PCR amplifikasyonlarında; *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojen

mikroorganizmalarına ait beklenen (625 ve 403 bç) PCR ürünleri görülürken *C. jejuni* için beklenen bant (878 bç) tespit edilememiştir. Reaksiyon *C. jejuni* kalıp DNA ve primer miktarı artırılarak tekrar aynı koşullarda tekrarlanmış ancak beklenen sonuçlar alınamamıştır.

C. jejuni patojen mikroorganizmasının belirlenmesi için diğer koşullar aynı kalmak şartı ile Cj2 primerleri kullanılarak ve yapışma sıcaklığı gradient olarak (49→60 °C arasında 45 sn.) kullanıldığında *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için amplifikasyon ürünleri gözlenirken *C. jejuni* patojeni için beklenen amplifikasyon gerçekleşmemiştir (Şekil 4.6).

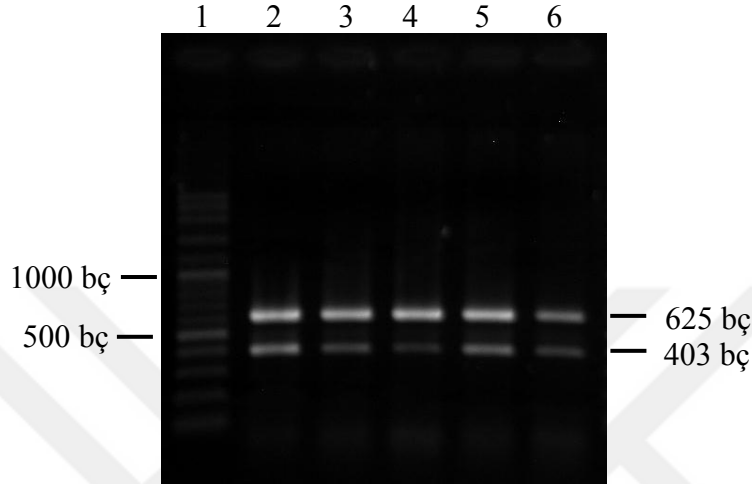
Referans patojenlerden izole edilen kromozomal DNA'lar ile yapılan PCR amplifikasyonlarında aynı PCR şartları uygulanmış ama hedeflenen üçlü amplifikasyon elde edilememiştir. Öncelikle kalıp DNA ve primer miktarları, yapışma sıcaklıkları, yapışma süreleri, uzama süreleri değiştirilmiş, *C. jejuni* için farklı DNA konsantrasyonları ve primerler kullanılmış olmasına rağmen *C. jejuni*'den multipleks reaksiyonda amplifikasyon yapılamamıştır (Şekil 4.7).



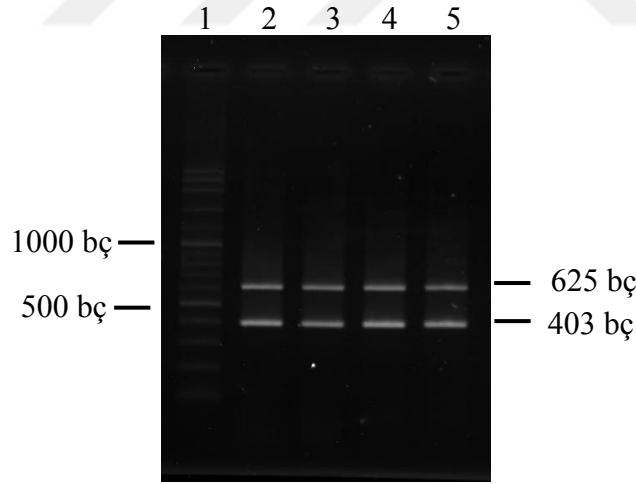
Şekil 4.6. E^M2 grubu (*C. jejuni* 857 bç, *E. coli* O157:H7 625 bç ve *S. enterica* 403 bç) çoklu amplifikasyon görüntüsü. 1: Markır, 2-13: 49-60 °C arasında değişen farklı yapışma sıcaklıkları

Hedeflenen üçlü amplifikasyon kalıp DNA olarak koloni suspansiyonu ve kromozomal DNA kullanıldığında gerçekleştirilememiş ve dolayısı ile E^M2 multipleks manuel kitinden *C. jejuni* patojen mikroorganizması çıkarılmış, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* varlığını yarı kantitatif olarak tanımlayabilecek ikili PCR amplifikasyonu yapılmıştır (Şekil 4.8). *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için DNA konsantrasyonu 552,3 ng/μL ve 156,9 ng/μL, primer konsantrasyonu 10 μM olarak test edilmiş ve ikili amplifikasyondan başarılı sonuç alınmıştır (Şekil 4.8, Line 2-3). Ayrıca *E. coli* O157:H7

patojeninin DNA ve primer konsantrasyonu azaltıldığı PCR şartlarında yine aynı başarılı amplifikasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.8, Line 4-5). İkili amplifikasyonun diğer PCR şartları; 4 µL 10X tampon, 4 µL 2 mM dNTP, 0,3 µL Taq DNA polimeraz (5 U/mL) ve steril su ile 40 µL'ye tamamlama ve 94 °C'de 2 dk. ilk ayrıştırma, 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 sn. denatürasyon, 50 °C'de 45 sn. ve 72 °C'de 45 sn. ardından 72 °C'de 4 dk. son uzama olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. E^{M2} grubu (*C. jejuni* 857 bç, *E. coli* O157:H7 625 bç ve *S. enterica* 403 bç) çoklu amplifikasyon görüntüsü. 1: Markır, 2-6: *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için farklı DNA ve primer konsantrasyonları



Şekil 4.8. E^{M2} grubu (*E. coli* O157:H7 625 bç ve *S. enterica* 403 bç) çoklu amplifikasyon görüntüsü. 1: Markır, 2-3: *E. coli* O157:H7 için 552,3 ng/µL ve 10 µM ve *S. enterica* için ise 156,9 ng/µL ve 10 µM DNA ve primer konsantrasyonu, 4-5: *E. coli* O157:H7 için 276,15 ng/µL ve 5 µM ve *S. enterica* için ise 156,9 ng/µL ve 10 µM DNA ve primer konsantrasyonu

E^{M2} grubu içerisinde bulunan *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojen mikroorganizmaların Multipleks PCR ile tanımlanması için yeni ve güncel bir protokol oluşturulmuştur. *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* mikroorganizmaları eş zamanlı

olarak farklı araştırmacılar tarafından Multipleks PCR ile tanımlanmıştır (Gilbert ve ark., 2003; Park ve ark., 2011; Sjöling ve ark., 2015). E^{M2} Multipleks PCR protokolünden farklı olarak bu Multipleks PCR uygulamalarında ya hedef genler farklıdır ya da bu patojenler dışında yer alan mikroorganizma tanımlamasıda yapılmıştır.

4.1.3.3. E^{M3} grubu için multipleks amplifikasyon

E^{M3} grubu içerisinde yer alan *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmaları tanımlamak için belirlenen referans primerler Çizelge 4.2’de belirtilmiştir. *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen suşlar için Multipleks çalışmalarda istenilen özgünlüğü elde etmek amacıyla birden fazla primer çifti (3 çift) test edilmiştir.

Çizelge 4.2. E^{M3} grubu patojen mikroorganizmaların multipleks PCR reaksiyonunda belirlenmesinde kullanılan primerler

Bakteri Suşu		5’=>3’ dizisi	Eriye Sıcaklığı (T _m) °C	Bant Uzunluğu (bç)	Kaynak
<i>B. melitensis</i>	BmF	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	57,9	223	Baily ve ark., 1992
	BmR	CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	63,7		
<i>C. sakazakii</i>	Cs1F	AATCCTGCAGAGATGCG	46	409	Hassan ve ark., 2007
	Cs1R	GTGTGACGGGCGGTGTGTAC	56		
	Cs2F	GCTCTGCTGACGAGTGGCGG	65,5	929	Lehner ve ark., 2004
	Cs2R	ATCTCTGCAGGATTCTCTGG	57,3		
	Cs3F	ACAGGGAGCAGCTTGCTGC	61	952	Hassan ve ark., 2007
	Cs3R	TCCCGCATCTCTGCAGGA	58,2		
<i>L. monocytogenes</i>	Lm1F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	52	409	Wang ve ark., 1991
	Lm1R	AAACTCAAAGGAATTGACGG	49		
	Lm2F	TTAGCTAGTTGGTAGGGT	51,4	318	Miladi ve ark., 2013
	Lm2R	AATCCGGACAACGCTTGC	56		
	Lm3F	TAAGAGTAACTGCTTGTCCT	55,9	863	Koo ve ark., 2002
	Lm3R	GAGTTGCAGCCTACAATCCGA	59,8		

C. sakazakii ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmaları için Cs1 ve Lm1 primer çiftlerinin amplifiye edeceği bölgelerin uzunluklarının (409 bç) aynı olacağı için Multipleks PCR amplifikasyonlarında kullanılmaları problemlili görülmüştür. Bm-Cs2-Lm2 primer grupları Multipleks çalışmalarda farklı PCR koşullarında analiz edilmiş ama başarılı bir sonuç elde edilememiştir. Sorunun primer kaynaklı olduğu düşünülüp alternatif primerler (Bm-Cs3-Lm3) ile tekrar çoklu PCR tepkimeleri gerçekleştirilmiş ama sonuç değişmemiştir. *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojenlerine ait primer çiftleri farklı kombinasyonlar oluşturularak denenmiş (Bm-Cs1-Lm2, Bm-Cs1-Lm3, Bm-Cs2-Lm1 primer grupları gibi) ama jel görüntülerinde hedeflenen amplifikasyon ürünlerinin oluşmadığı görülmüştür.

C. sakazakii ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmalarına ait Çizelge 4.2’de listelenen primerler ve hedefledikleri 16S rRNA bölgelerinin nükleotid dizileri karşılaştırıldığında, *C. sakazakii* patojenine özgü Cs1R geri primerinin Cs1F-Cs2F-Cs3F ileri primerleri ile *C. sakazakii* 16S rRNA hedef bölgesinde farklı uzunluklarda amplifikasyon ürünleri oluşturabildiği, aynı zamanda *L. monocytogenes* patojenine özgü ileri primerler (Lm1F ve Lm2F) ile kullanılarak *L. monocytogenes* 16S rRNA hedef bölgesinde de farklı uzunlukta bölgeleri hedeflediği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Aynı durum Lm1F ileri primerinde de tespit edilmiş ve geri primerler ile (Lm1R-Lm3R-Cs2R-Cs3R) kullanıldığında *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* mikroorganizmalarını tanımlayabilecek farklı uzunlukta PCR ürünleri oluşturabileceği görülmüştür. Dolayısıyla Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi hedef patojenler için universal özellik gösteren Cs1R ve Lm1F primerleri ile diğer primerler kullanılarak multipleks PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

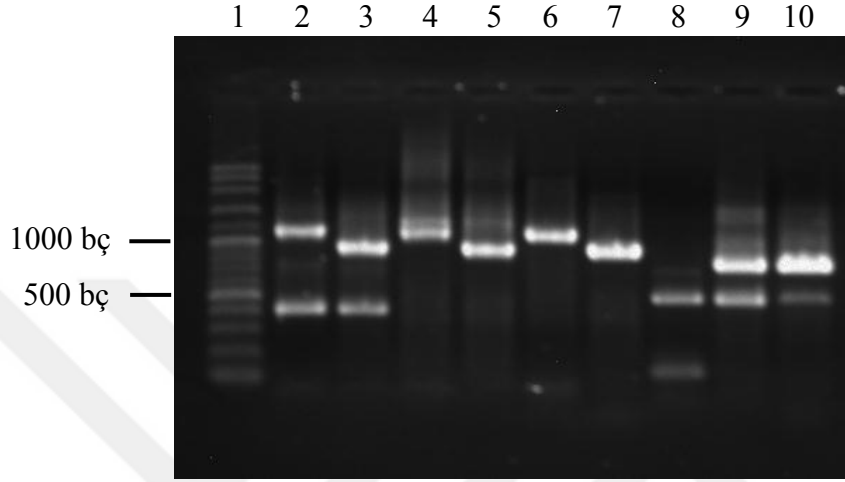
Çizelge 4.3. E^{M3} grubuna ait patojen mikroorganizmalar için farklı primer kombinasyonları

	Primerler	Beklenen bant uzunlukları (bç)	
		<i>C. sakazakii</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Cs1R	Cs1F-Lm2F	409	1167
	Cs1F-Lm3F	409	952
	Cs2F-Lm2F	1324	1167
	Cs2F-Lm3F	1324	952
	Cs3F-Lm2F	1341	1167
	Cs3F-Lm3F	1341	952
Lm1F	Lm1R-Cs3R	505	409
	Lm3R-Cs2R	499	803
	Lm3R-Cs3R	505	803

Öncelikle *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojenlerini Çizelge 4.3’de belirtilen primer kombinasyonları kullanılarak belirleyebilmek için olası problemler elemine edilmek istenmiş ve *B. melitensis* PCR reaksiyonlarına dahil edilmemiştir. PCR reaksiyonunda kalıp DNA olarak 1 µL koloni süspansiyonu, 10 µM ileri ve geri primer kullanılmıştır. Diğer PCR bileşenleri 4 µL 10X tampon, 4 µL dNTP (2 mM), 0,3 µL Taq DNA polimeraz (5 U/mL) ve nükleaz içermeyen steril su ile toplam hacime (40 µL) tamamlanarak gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları ise 94 °C’de 2 dk. ilk ayrıştırma, 35 döngü olmak üzere 94 °C’de 30 sn. denatürasyon, 55 °C’de 30 sn. ve 72 °C’de 45 sn. ardından 72 °C’de 4 dk. son uzama olarak gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.9).

Farklı primer kombinleri ile hedef patojenler belirlenmek istenmiş ve Şekil 4.9’ a bakıldığında Line 3, 9 ve 10’da beklenen amplifikasyon ürünlerinin oluştuğu görülmüştür.

Cs1R geri primeri Cs1F ve Lm3F ileri primerleri ile *C. sakazakii* (409 bç) ve *L. monocytogenes* (952 bç) mikroorganizmasına ait iki hedef bölgeyi amplifiye etmiştir (Şekil 4.9, Line 3). Yine aynı şekilde Lm1F primeri iki farklı primer kombinasyonu (Lm1F-Lm3R-Cs2R ve Lm1F-Lm3R-Cs3R) ile hedef patojenleri belirleyen iki spesifik PCR ürünü oluşturmuştur (Şekil 4.9, Line 9-10). Diğer primer kombinasyonlarında ise beklenen sonuçlar elde edilememiştir (Şekil 4.9, Line 2-4-5-6-7-8).

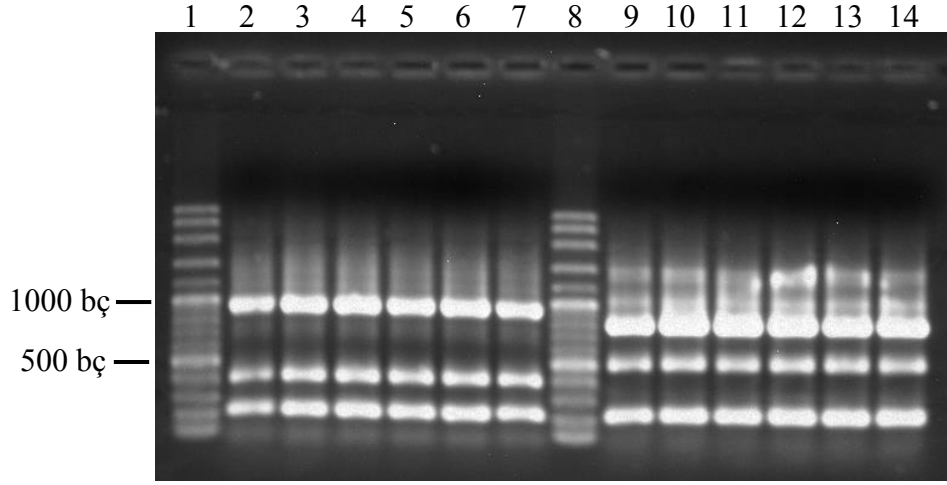


Şekil 4.9. *C. sakazakii* (Cs) ve *L. monocytogenes* (Lm) mikroorganizmaları için farklı primer kombinasyonları kullanılarak elde edilen amplifikasyon görüntüsü. 1: Markır, Cs ve Lm sırası ile 2: Cs1R-Cs1F-Lm2F primer grubu ve Cs 409 bç-Lm 1167 bç, 3: Cs1R-Cs1F-Lm3F primer grubu ve Cs 409 bç-Lm 952 bç, 4: Cs1R-Cs2F-Lm2F primer grubu ve Cs 1324 bç-Lm 1167 bç, 5: Cs1R-Cs2F-Lm3F primer grubu ve Cs 1324 bç-Lm 952 bç, 6: Cs1R-Cs3F-Lm2F primer grubu ve Cs 1341 bç-Lm 1167 bç, 7: Cs1R-Cs3F-Lm3F primer grubu ve Cs 1341 bç-Lm 952 bç, 8: Lm1F-Lm1R-Cs3R primer grubu ve Cs 505 bç-Lm 409 bç, 9: Lm1F-Lm3R-Cs2R primer grubu ve Cs 499 bç-Lm 803 bç, 10: Lm1F-Lm3R-Cs3R primer grubu ve Cs 505 bç-Lm 803 bç uzunluğunda

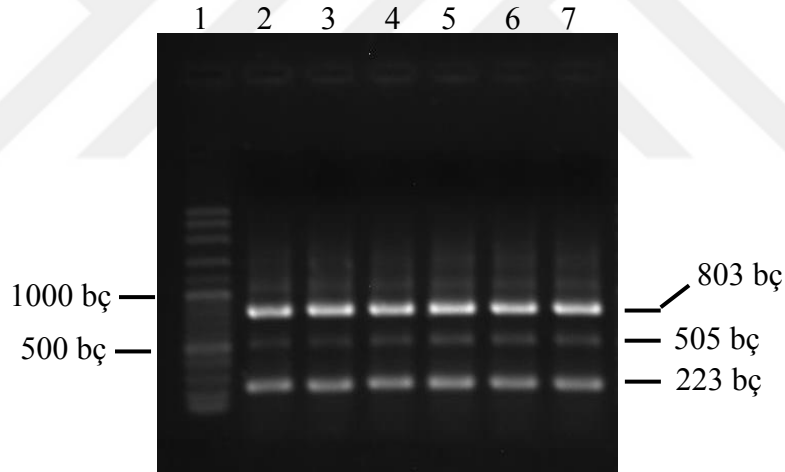
Şekil 4.9, Line 3,9 ve 10'daki primer kombinasyonlarına *B. melitensis* patojeninin referans primerleri eklenip, PCR koşulları aynı kalıp sadece yapışma sıcaklığı 50-55 °C'de 30 sn. gradient olarak uygulanarak çoklu PCR analizi gerçekleştirilmiştir. *B. melitensis* varlığı sonuçları etkilememiş ve hedef patojenler 3 primer kombinasyonunda da başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

Kalıp DNA olarak koloni suspansiyonları kullanıldığında Multipleks PCR çalışmaları başarılı bir şekilde sonuçlanmıştır (Şekil 4.12). Kromozomal DNA kullanıldığında ise BmF-BmR-Cs1R-Cs1F-Lm3F primer grubu farklı PCR koşulları denenmesine rağmen aynı şekilde sonuç vermemiştir (Şekil 4.12, Line 2-5). Diğer BmF-BmR-Lm1F-Lm3R-Cs2R ve BmF-BmR-Lm1F-Lm3R-Cs3R primer grubunda ise koloni

Multipleks PCR'da olduğu gibi beklenen amplifikasyon ürünleri oluşmuş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.12, Line 6-13).



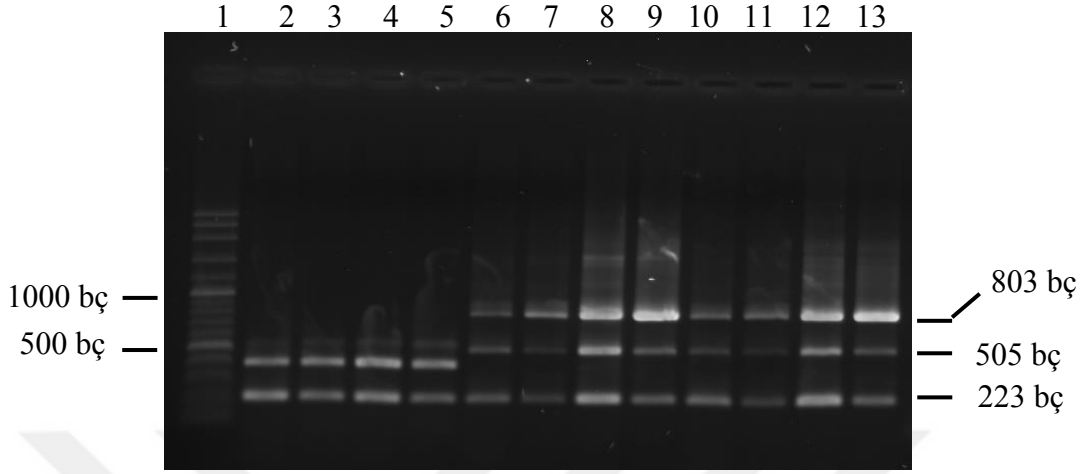
Şekil 4.10. E^M3 grubu farklı primer kombinasyonları ile amplifikasyon görüntüsü. 1-8: Markır, 2-7: BmF-BmR-Cs1R-Cs1F-Lm3F primer grubu ve Bm: 223, Cs:409, Lm: 952 bç uzunluğunda ve 50-55 °C gradient PCR ürünleri, 9-14: BmF-BmR-Lm1F-Lm3R-Cs2R primer grubu ve Bm: 223, Cs: 499, Lm: 803 bç uzunluğunda ve 50-55 °C gradient PCR ürünleri



Şekil 4.11. E^M3 grubu amplifikasyon görüntüsü. 1: Markır, 2-7: BmF-BmR-Lm1F-Lm3R-Cs3R primer grubu ve Bm: 223, Cs: 505, Lm: 803 bç uzunluğunda ve 50-55 °C gradient PCR ürünleri

Gerçekleşen PCR tepkimesinde, önceki deneyimlerde *L. monocytogenes* patojenini belirlemede sorun olduğundan dolayı bu patojenin DNA konsantrasyonu değiştirilmeden *B. melitensis* ve *C. sakazakii* mikroorganizmaları için farklı DNA konsantrasyonları (Bm: 73,1 ng/ μ L, Cs: 158,7 ng/ μ L ve Bm: 146,2 ng/ μ L, Cs: 317,4 ng/ μ L) uygulanmıştır. DNA konsantrasyonları azaltıldığında amplifikasyon ürünlerinin daha az oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.12, Line 2-3-6-7-10-11). PCR reaksiyonu 1'er μ L DNA, 1'er μ L (10 μ M) primerler, 4 μ L 10X tampon, 4 μ L dNTP (2 mM), 0,3 μ L Taq DNA polimeraz (5 U/mL) ile 40 μ L

hacimde tamamlanmıştır. PCR koşulları ise 94 °C’de 2 dk., 35 döngü olmak üzere 94 °C’de 30 sn., 55 °C’de 30 sn. ve 72 °C’de 45 sn. ardından 72 °C’de 4 dk. olarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1’lik agaroz jel görüntülenmiştir.



Şekil 4.12. E^{M3} grubu amplifikasyon görüntüsü. 1:Markır, 2-5: BmF-BmR-Cs1R-Cs1F-Lm3F primer grubu ile yapılan amplifikasyon ürünleri, 6-9: BmF-BmR-Lm1F-Lm3R-Cs2R primer grubu ile yapılan amplifikasyon ürünleri, 10-13: BmF-BmR-Lm1F-Lm3R-Cs3R primer grubu ile yapılan amplifikasyon ürünleri. 2,3,6,7,10,11: DNA konsantrasyonları Bm:73,1 ng/μL, Cs: 158,7 ng/μL, Lm: 180,3 ng/μL, 4,5,8,9,12,13: DNA konsantrasyonları Bm: 146,2 ng/μL, Cs: 317,4 ng/μL, Lm: 180,3 ng/μL

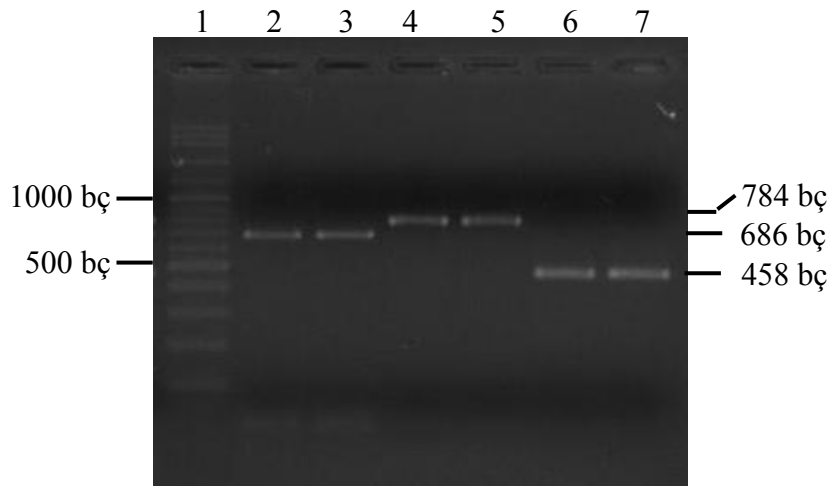
Sonuç olarak, E^{M3} grubunda yer alan patojen mikroorganizmalar için yeni ve güncel Multipleks PCR protokolü oluşturulmuştur. Literatür taramasında bu patojenleri eş zamanlı olarak tek bir PCR reaksiyonunda tanımlayabilen bir Multipleks PCR uygulamasına rastlanmamıştır. Bu nedenle E^{M3} Multipleks PCR protokolü bu hedef patojenleri Multipleks PCR ile tanımlayabilen ilk protokoldür. Multipleks PCR analizleri *B. melitensis* patojeni için genellikle *Brucella* türleri arasında gerçekleşmiştir (García-Yoldi ve ark., 2006; Hinic ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2011; López-Goñi ve ark., 2011). *C. sakazakii* patojeni için ise Multipleks PCR uygulamasına rastlanmamıştır. *L. monocytogenes* ise bu patojenler arasında en çok Multipleks PCR uygulamalarına dahil olan patojen mikroorganizmadır (Jofre ve ark., 2005; Liu ve ark., 2007; Germini ve ark., 2009).

4.1.3.4. E^{M4} grubu için multipleks amplifikasyon

A. hydrophila, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojen mikroorganizmaları E^{M4} grubu PCR amplifikasyonu ile manuel belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu patojen mikroorganizmaları tanımlayabilecek, 16S rRNA hedef bölgesinden tasarlanmış ve literatürde bildirilen spesifik primerler Çizelge 3.3’de belirtilmiştir.

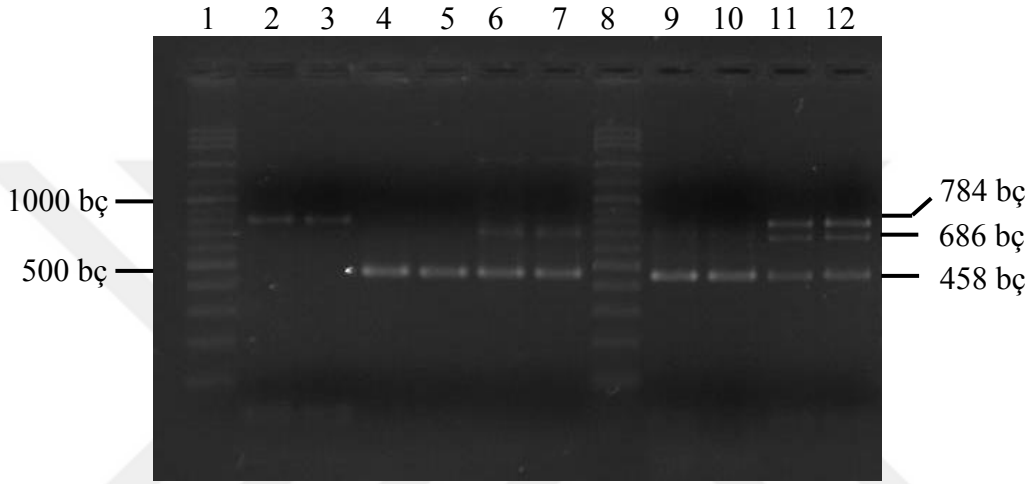
B. cereus patojeninin tanımlanması için literatürde verilen BcF ve BcR primerleri daha özgün primerler elde etmek amacıyla Haitao ve ark. (2011) yaptığı çalışmadaki primerlere nükleotid analizi ile yeni nükleotid (altı çizili) eklemesi yapılarak modifiye edilmiştir. E^M4 grubu patojenlere özgü 16S rRNA nükleotid dizisi ile primerlerin dizileri karşılaştırıldığında BcR ve KpF primerlerinin bir tür patojen için yeterince spesifik olmadığı dolayısı ile bu primerlere alternatif Bc2R (AACTTAATGATGGCAACTAAGAT) ve Kp2F (TCTGTCAAGTCGGATGTGAAAT) primerleri çalışmamızda tasarlanmıştır. Bc2R primeri ile *B. cereus* için hedeflenen bölge uzunluğu 796 bç ve Kp2F primeri ile *K. pneumoniae* patojeni için ise 458 bç olarak belirlenmiştir.

E^M4 grubunda yer alan patojen mikroorganizmalar için yapılan PCR amplifikasyonları kalıp DNA (koloni süspansiyonu ve kromozomal DNA), ileri ve geri primer miktarları 1'er µL (10 µM) olarak kullanılmıştır. Aynı PCR koşullarında *A. hydrophila* (686 bç), *B. cereus* (784 bç) ve *K. pneumoniae* (458 bç) patojenlerinin tek olarak amplifikasyonları doğrulamak için PCR tepkimesi gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Diğer amplifikasyon gruplarında olduğu gibi E^M4 grubu içerisinde yer alan patojen mikroorganizmaların belirlenmesi için alternatif primer kullanımı ve değiştirilen PCR şartları ile PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Başarılı şekilde gerçekleştirilen tekli (AhF-R, BcF-R ve KpF-R) amplifikasyonları takiben, multipleks PCR amplifikasyonları ikili (Ah-Bc, Ah-Kp ve Bc-Kp) ve üçlü (Ah-Bc-Kp) primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Başarılı olmayan, beklenenden farklı amplifikasyon bantları oluşan reaksiyonlardan sonra PCR bileşenleri ve koşullarında değişiklikler yapılmıştır.



Şekil 4.13. *A. hydrophila*, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojenlerinin belirlenmesi. 1: Markır, 2-3: *A. hydrophila*; 4-5: *B. cereus* ve 6-7: *K. pneumonia*

Yapışma sıcaklığı ve süresi 50 °C’de 1 dk. ve 50 °C’de 1.30 dk. olarak değiştirildiğinde, ikili PCR amplifikasyonu ile *A. hydrophila* - *B. cereus* (Şekil 4.14, Line 1-2-7-8) ve *A. hydrophila* - *K. pneumoniae* (Şekil 4.14, Line 3-4) başarılı bir amplifikasyon gerçekleşmezken *B. cereus* - *K. pneumoniae* (Şekil 4.14, Line 5-6) amplifikasyonları başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. *A. hydrophila* - *B. cereus* - *K. pneumoniae* (Şekil 4.14, Line 7-8) üçlü amplifikasyonu ise beklenen bantlar elde edilemediğinden başarılı olmamıştır. Şekil 4.14, Line 9 ve 10’da çoklu amplifikasyonları doğrulamak amacı ile tekli amplifikasyonlar jelde çoklu olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.14. *A. hydrophila*, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojenlerinin multipleks (ikili ve üçlü) PCR şartlarında belirlenmesi. 1,8: Markır; 2-3: Ah-Bc; 4-5: Ah-Kp; 6-7: Bc-Kp; 9-10: Ah-Bc-Kp; 11-12: Ah-Bc-Kp (tekli PCR ürünlerinin çoklu gösterimi)

E^M4 grubunu yer alan *A. hydrophila*, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojen mikroorganizmaları farklı kalıp DNA (koloni süspansiyonu ve kromozomal DNA), primer ve PCR şartlarında amplifikasyonlar gerçekleştirilmiş, ancak hedeflenen üçlü ampliconlar elde edilememiş ikili ampliconlar elde edilmiştir. Dolayısı ile E^M4 Multipleks PCR iki türü tanımlayan bir protokol olarak (Bc-Kp) geliştirilmiştir.

Literatür taramasında ise bu patojen mikroorganizmaları tek bir reaksiyonda eş zamanlı olarak tanımlayabilen Multipleks PCR uygulamalarına rastlanmamakla birlikte Unipleks PCR ile ilgili çok fazla çalışma mevcut değildir (Chu ve Lu, 2005; Yang ve ark., 2005; Panangala ve ark., 2007; Park ve ark., 2007; Thong ve ark., 2011).

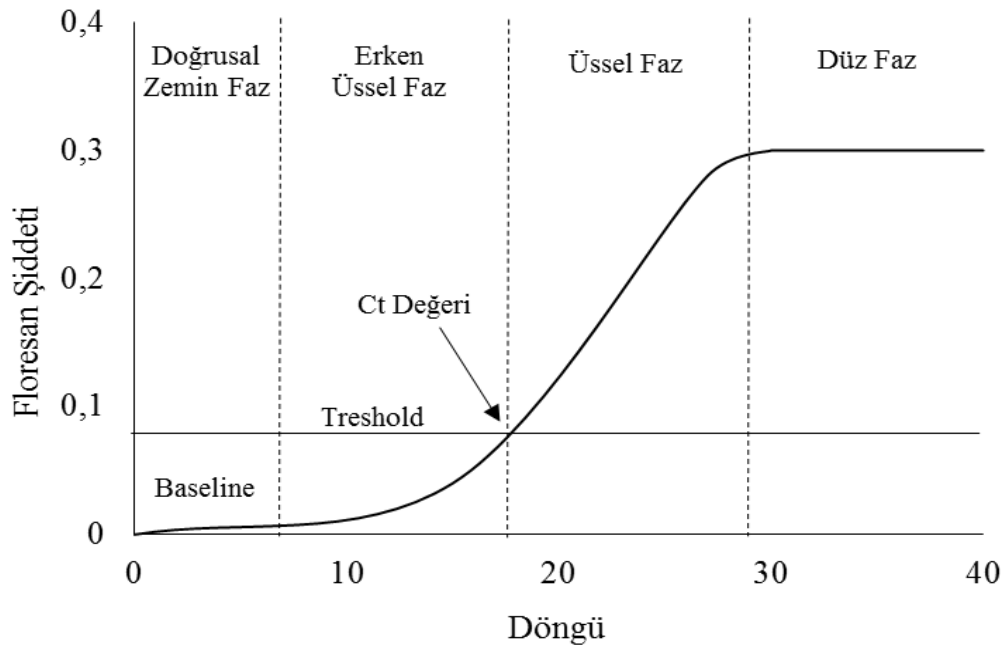
4.2. Eş Zamanlı PCR ile Hedef Gıda Patojenlerin Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Real Time PCR teknolojisi hedef DNA dizisine özgü (Taqman teknolojisi gibi) veya amplifiye olmuş DNA fragmentlerini belirleyebilen (SYBR-Green gibi) teknikleri içeren güncel metotlar arasında yer almaktadır. Bu teknolojiye PCR ile amplifiye edilen hedef DNA fragmentleri floresan işaretleyiciler ile eş zamanlı olarak izlenebilmekte ve bu hedef diziler ile çok düşük miktarlarda bile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Floresan özellikte boya veya probların oluşturduğu floresan ışımaya, PCR amplifikasyonu sırasında oluşan amplifikasyon ürünü ile doğru orantılıdır ve kantitatif analiz yapabilmeye imkanı tanımaktadır. Real Time PCR teknolojisi özellikle mikroorganizma dinamiğinin ve gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi gibi biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gıda kaynaklı mikrobiyal patojenlerin karakterizasyonunda Real Time PCR teknolojisi kullanımı önemli bir yaklaşımdır. Real Time PCR tekniğinin mikrobiyal yük ile ilgili bilgi vermesi, düşük miktarların bile tespit edilebilmesi, hızlı bir şekilde tanımlayabilme gibi özellikleri ile mikrobiyal patojenlerin identifikasyonunda önemli üstünlükler sağlamaktadır. Bu teknolojiye kısa bir zenginleştirme uygulanarak 1 kob/g belirleme limitine kadar inilebilmekte ve özellikle gıdalarda bulunan *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* gibi sıfır tolerans tanınan patojenleri tanımlamada bile yüksek bir hassasiyet göstermektedir (Hanna ve ark., 2005). Real Time PCR teknolojisi ile birçok mikrobiyal patojen tanımlanmış ve gıdalardaki mikrobiyal potansiyelleri tespit edilmiştir. *C. jejuni*, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 patojenleri gibi gıda kaynaklı hastalıklardan büyük ölçüde sorumlu olan mikroorganizmalar tanımlanmıştır (Elizaquivel ve ark., 2008; Cheng ve ark., 2012; Garrido ve ark., 2012; Köppel ve ark., 2013). Real Time PCR ile mikrobiyal patojenleri tanımlamada en yaygın olarak kullanılan Real Time PCR yaklaşımları SYBR-Green ve Taqman belirleme teknikleridir (Chon ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Ueda ve ark., 2013). Ayrıca FRET, moleküler boncuk, LNA (Locked Nucleic Acid) prob, akrep primerleri kullanılarak patojen mikroorganizma identifikasyonları yapılmıştır (O'Grady ve ark., 2008; Omiccioli ve ark., 2009; Kotzekidou, 2013).

Real Time PCR teknolojisi ile oluşan amplifikasyon grafiği; i-doğrusal zemin faz, ii-erken üssel faz, iii- üssel faz ve iv-düz faz olarak tanımlanan dört aşamadan oluşmaktadır (Şekil 4.15). PCR amplifikasyonunun henüz başladığı dolayısı ile floresan ışımının henüz

ölçülebilir seviyede olmadığı aşama doğrusal zemin fazdır. Real Time PCR analizlerinde önemli parametrelerden biri olan Temel çizgi (baseline) amplifikasyonun başlangıç aşamasında (doğrusal zemin fazında) hesaplanmaktadır. PCR amplifikasyonunun üssel olarak artış gösterdiği ve bunu bağlı olarak floresan ışımının anlamlı bir değere ulaştığı aşama erken üssel faz olarak tanımlanmaktadır. Erken üssel faz aşamasında amplifikasyonun eşik değeri (treshhold) belirlenmektedir. Aynı zamanda eşik değere karşılık gelen PCR döngü sayısı eşik değer döngüsü olarak ifade edilmekte ve Ct ile gösterilmektedir. Ct değeri (eşik döngü değeri) kantitatif analizlerde referans bir parametre olup amplifikasyonun gerçekleşmeye başladığı döngü sayısı ve kalıp DNA miktarı ile ilgili bilgi vermektedir. Amplifikasyonun ölçülebilir seviyeye ulaşması (Ct değeri) kalıp DNA miktarının yüksek olduğu zaman daha önceki döngülerde gözlenmektedir. Dolayısı ile küçük Ct değerleri PCR amplifikasyonunun yüksek DNA miktarından dolayı erken başladığını ifade etmektedir (Schmittgen ve Livak, 2008). Başka bir ifade ile Ct değeri ile DNA miktarı arasında ters ilişki bulunmakta ve regresyon grafikleri azalan yönde bir eğilim göstermektedir. PCR amplifikasyonu devam ederken her döngü sonunda amplifikasyon ürünleri üssel olarak artmakta ve takiben optimum amplifikasyon periyoduna ulaşmakta ve bu faz üssel faz olarak tanımlanmaktadır. Amplifikasyon grafiğinin son aşaması olan düz faz aşamasında ise reaksiyon bileşenleri tükenme noktasına gelmiş ve bu aşamada artan floresan yoğunluğu verilerini hesaplamak mümkün olmamaktadır (Wong ve Medrano, 2005).



Şekil 4.15. Real Time PCR amplifikasyon grafiğinin şematik gösterimi

Eşik değer döngü sayısı ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) literatürlerinde eşik döngü değeri 'Ct' olarak, LightCycler literatürlerinde (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) ise geçiş noktası 'Cp' olarak tanımlanmaktadır (Wong ve Medrano, 2005). Çalışmamızda ABI PRISM cihazı kullanılmış ve amplifikasyonlar Ct değeri olarak ifade edilmiştir. Amplifikasyonlar Taqman probolar kullanılarak Unipleks ve Multipleks olarak yapılmıştır.

4.2.1. Unipleks Real Time PCR şartlarının standardizasyonu ve mikroorganizma sayısına bağlı amplifikasyon kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Patojen mikroorganizmalar Materyal ve Metot 3.4'de belirtildiği gibi bir gece (≈ 16 saat) inkubasyona tabi tutulmuş ve gelişen kültürden ayrılan 1 mL bakteri kültürü kromozomal DNA izolasyonunda, ayrılan ikinci 1 mL kültür ise mikroorganizma sayımı (kob/mL) için kullanılmıştır. Aynı kültürden izole edilen DNA miktarı (ng/ μ L) ile sayılan koloniler (kob/mL) arasındaki ilişki (r^2) Real Time PCR analizlerinde DNA konsantrasyonundan mikroorganizma sayılarını belirlemede kullanılmıştır. On iki farklı patojen mikroorganizma için planlanan Real Time PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler ile Taqman probolar Çizelge 3.4'de ve Unipleks Real Time PCR bileşenleri ve koşulları ise Materyal ve Metot 3.7'de belirtilmiştir.

Referans patojen mikroorganizmaların Real Time PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiş, ancak *A. hydrophila* ve *B. cereus* patojenleri için teorik olarak beklenen sonuçlar deneysel olarak elde edilememiştir. *A. hydrophila* ve *B. cereus* patojenlerinin Real Time PCR ile analizlerinde primer ve probolar için referans olarak alınan çalışmalardaki (Fricker ve ark 2007; Trakhna ve ark., 2009) koşullar ve alternatif PCR koşulları denenmiş ancak başarılı PCR amplifikasyonları elde edilememiştir. Bunun yanında her patojen mikroorganizma için belirlenen hedef genleri dışında iç kontrol (internal) olarak kullanılan universal 16S rRNA bölgesi de PCR analizlerine dahil edilmiştir. Hedef patojen mikroorganizmalar için universal primer ve prob kullanıldığında başarılı amplifikasyonlar gerçekleşmiştir. Real Time PCR amplifikasyon ürünleri kontrol amaçlı % 2,5'luk agaroz jelde görüntülenmiş ve *A. hydrophila* patojeni hedef bölgesinin amplifiye olduğu ancak *B. cereus* için amplifikasyonun olmadığı gözlenmiştir. Böylece, *A. hydrophila* patojeni için problemin prob odaklı olabileceği düşünülmüştür. *A. hydrophila* patojeni için belirlenen prob nükleotid eklenerek modifiye edilerek AhP2 (Hex-AGTTCAAGGCC-GATGTCAGTT-Q1) probu tasarlanmıştır. *B. cereus* patojeni için ise literatürde (Lim ve

ark., 2011) belirtilen alternatif primer ve prob setleri kullanılmıştır. Yeni primer ve problemler ile de beklenen amplifikasyonlar elde edilememiştir.

Real Time PCR amplifikasyonunun kalıp DNA konsantrasyonu ve koloni sayısı ile ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Ön çalışmalarımızda farklı sayıda koloni bulunduran kültürlerden izole edilen DNA miktarları ilişkilendirilmiş ve arada güçlü korelasyon ($r^2=0.99$) ve $y = 0,0728x + 0,5506$ ilişki denklemi bulunmuştur. Dolayısıyla DNA konsantrasyonu ile elde edilen amplifikasyonlar koloni sayısı için uygulanabilir niteliktedir.

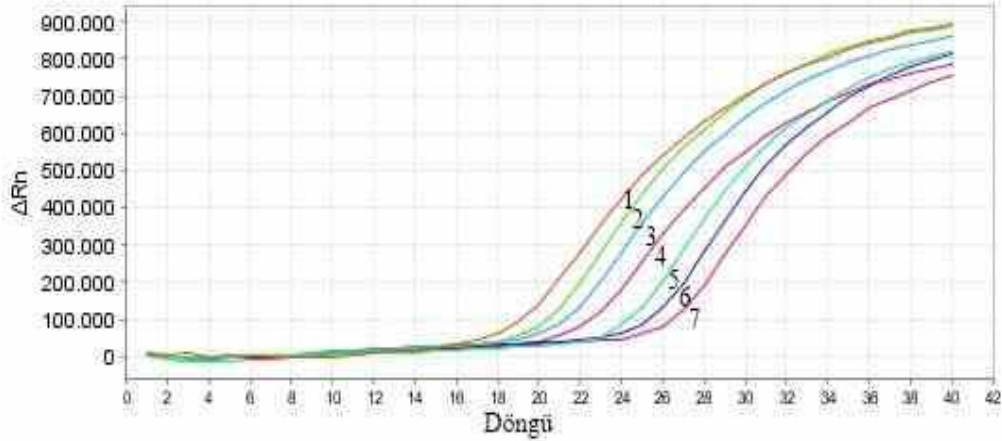
Real Time PCR amplifikasyonu ile kalıp DNA konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi tespit etmek için patojen mikroorganizmadan izole edilen kromozomal DNA'lardan seri seyreltmeler (1:2 oranında) kullanılmıştır. Seyreltilen DNA'lar kullanılarak elde edilen amplifikasyon sonuçları ile standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrileri seri dilüsyonlara ait DNA konsantrasyonu ile her bir dilüsyon için tespit edilen Ct değerleri arasındaki logaritmik ilişki belirlenerek oluşturulmuştur. Ayrıca, izole edilen DNA'ların mikroorganizma sayımı (kob/mL) yapıldığından mikroorganizma sayısının logaritmik değerine karşı Ct değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve mikroorganizma sayısı ve Ct değeri arasındaki ilişki belirlenmiştir.

Ct değeri tahmini ve analiz sonrası elde edilen veriler Real Time PCR cihazının (7500 Fast Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) yazılımı ile yapılmıştır. Ayrıca amplifikasyon verileri Excel programına aktarılmış ve iki değişkenli grafik analizleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan patojenler için tekli Real Time PCR amplifikasyonu standardizasyonu Bulgular ve Tartışma 4.2.1.2- 4.2.1.11'de detaylandırılmıştır.

4.2.1.1. *Brucella melitensis* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

B. melitensis referans patojen suşun Real Time PCR ile analizlerinde türe özgü *BMEII0466* geni hedef gen bölgesi olarak belirlenmiş ve bu bölgeye spesifik primerler ve prob Çizelge 3.4'te belirtilmiştir. Bu patojen mikroorganizmadan izole edilen kromozomal DNA'dan seri seyreltmeler ile elde edilen DNA dilüsyonları kalıp DNA olarak kullanılmış ve herbiri 3 tekrarlı PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. *B. melitensis* patojeninden izole edilen kromozomal DNA (183,30 ng/ μ L) 1:2 dilüsyon oranında 8 kat seyreltilmiş, her bir seyreltilmiş DNA amplifiye edilmiş ve Şekil 4.16'de gösterilen Real Time amplifikasyon grafiği elde edilmiştir. DNA konsantrasyonları 183,30-1,43-ng/ μ L arasında değişim gösteren DNA dilüsyonlarının eşik değer döngüleri (Ct) ise 19,63 ile 26,86 döngü arasında hesaplanmıştır.

Seyreltilmiş DNA standartlarından elde edilen Ct değerine karşılık gelen DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayıları belirlenmiş, doğrusal bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayılarının logaritmaları alınmıştır (Çizelge 4.4).



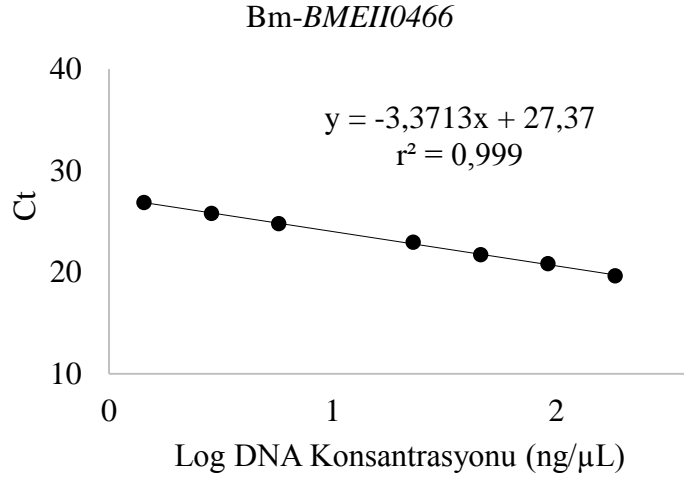
Şekil 4.16. *B. melitensis* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilasyonları; 1: Bm 1X, 2: Bm 1:2X, 3: Bm 1:4X, 4: Bm 1:8X, 5: Bm 1:32X, 6: Bm 1:64X, 7: Bm 1:128X

BMEII0466 hedef geninin amplifikasyonu sonucu elde edilen Ct değerleri ile DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayılarının logaritmik değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Ct değeri ve logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki belirlenmiş ve korelasyon katsayısı 0,9987 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

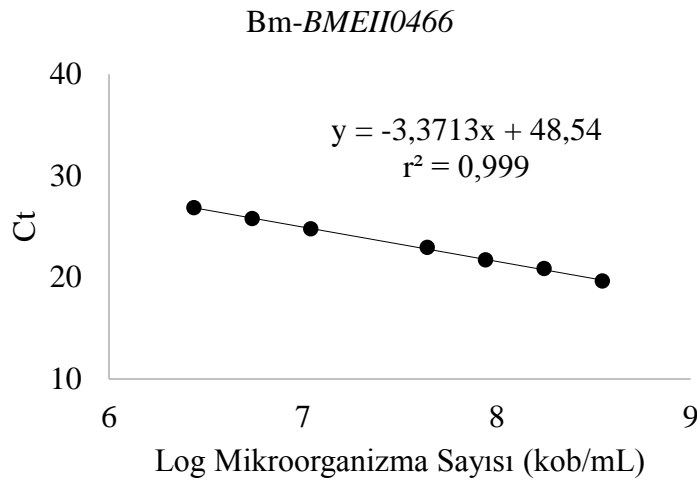
Çizelge 4.4. *B. melitensis* patojeni için standart DNA dilasyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilusyonu	C _T	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL (x10 ⁶)
Bm 1X	19,63	183,30	350
Bm 1:2X	20,84	91,65	180
Bm 1:4X	21,72	45,83	88
Bm 1:8X	22,95	22,91	44
Bm 1:32X	24,76	5,73	11
Bm 1:64X	25,78	2,86	5,5
Bm 1:128X	26,86	1,43	2,7

Regresyon denklemi ise “ $y = -3,3713x + 27,37$ ” olarak bulunmuştur. *B. melitensis* patojen mikroorganizması için Ct değeri ve logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki ilişki ise aynı korelasyon katsayısı ve “ $y = -3,3713x + 48,547$ ” regresyon denklemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. *B. melitensis* BMEII0466 hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki

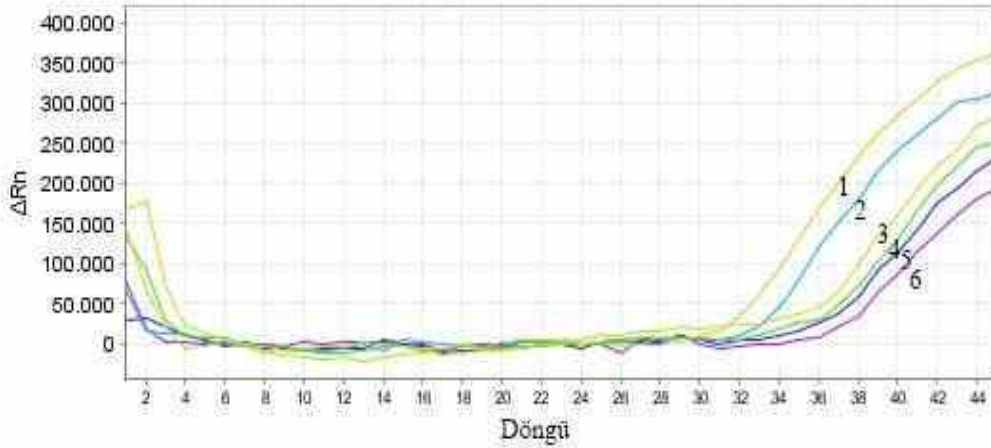


Şekil 4.18. *B. melitensis* BMEII0466 hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

Brucella mikroorganizmasının Real Time PCR'da tanımlanması ile ilgili diğer patojenlere göre çok sayıda araştırmaya rastlanmamıştır. Genellikle genus bazında *Brucella* türlerini, *B. melitensis* ve *B. abortus* mikroorganizmalarını belirlemek amacıyla geliştirilmiş Real Time PCR protokolleri dikkat çekmektedir (Redkar ve ark., 2001; Probert ve ark., 2004; Debeaumont ve ark., 2005; Hinić ve ark., 2008; Bounaadja ve ark., 2009; Tomaso ve ark., 2010; Winchell ve ark., 2010). Real Time PCR analizlerinde *bcs31*, *per*, *IS711*, *alkB*, *BMEII0466* ve *IS711* gen bölgeleri amplifikasyon için çoğunlukla hedeflenen bölgelerdir.

4.2.1.2. *Campylobacter jejuni* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

Campylobacter jejuni'de türe özgü *hipO* genini amplifiye eden primer ve prob kullanılarak (Çizelge 3.4) *C. jejuni* referans patojeninin kuantifikasyonu Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'nın 1X → 128X arasında değişen dilusyonları kalıp olarak kullanılarak amplifikasyon yapılmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *C. jejuni* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Cj 1X, 2: Cj 1:4X, 3: Cj 1:8X, 4: Cj 1:32X, 5: Cj 1:64X, 6: Cj 1:128X

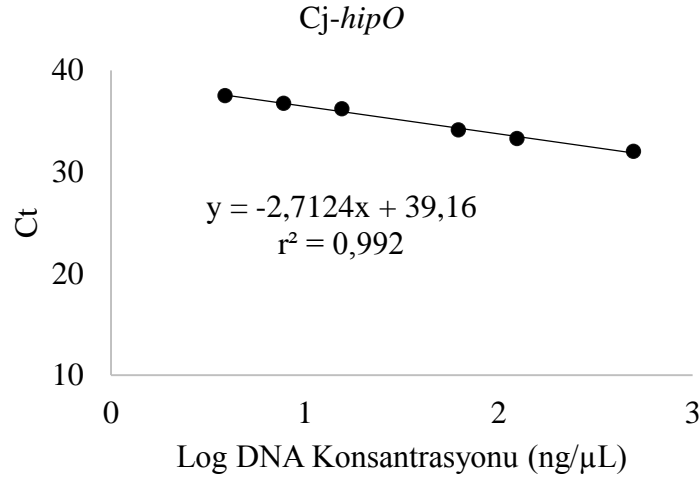
İzole edilen ve konsantrasyonu 495,75 ng/μL olarak ölçülen kromozomal DNA'nın (Cj 1X olarak isimlendirilmiş) seyreltilmiş DNA standartları analiz edilmiş ve her birine karşılık gelen Ct değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Ayrıca DNA dilusyonlarının konsantrasyonları ve mikroorganizma sayılarının logaritmik değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5. *C. jejuni* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

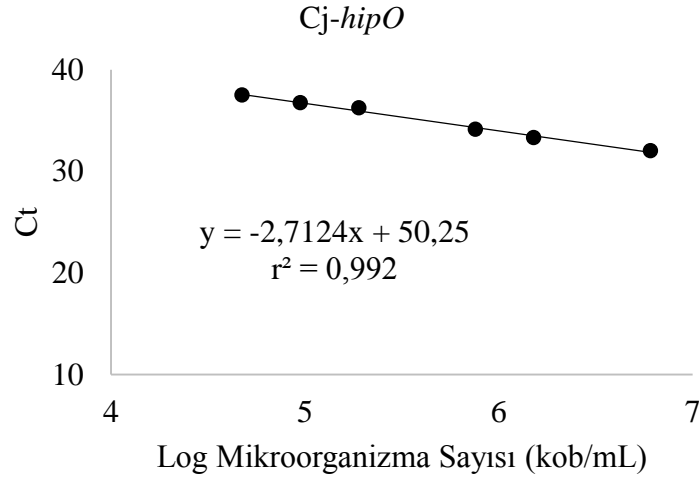
DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL (x10 ⁴)
Cj 1X	32,01	495,75	610
Cj 1:4X	33,29	123,94	150
Cj 1:8X	34,13	61,97	76
Cj 1:32X	36,22	15,49	19
Cj 1:64X	36,74	7,75	9,5
Cj 1:128X	37,50	3,87	4,7

C. jejuni patojeninin *hipO* geni tespit edilen en düşük DNA konsantrasyonu ve ona karşılık gelen mikroorganizma sayısı 3,87 ng/μL ve 4,7x10⁴ kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Ct değerlerine karşı DNA konsantrasyonunun logaritmik eğrisi 0,992 korelasyon katsayısı ile elde edilmiştir (Şekil 4.20). Ct değerine karşı mikroorganizma sayısının logaritmik artışının çizilen kalibrasyon eğrisinde de aynı korelasyon katsayısı belirlenmiştir (Şekil 4.21). Böylece *C. jejuni* patojen mikroorganizması için Ct değerine karşı logaritmik DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki belirlenmiştir. Oluşturulan eğrilerin regresyon denklemleri Şekil 4.20 ve 4.21’de belirtilmiştir.



Şekil 4.20. *C. jejuni hipO* hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.21. *C. jejuni hipO* hedef geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

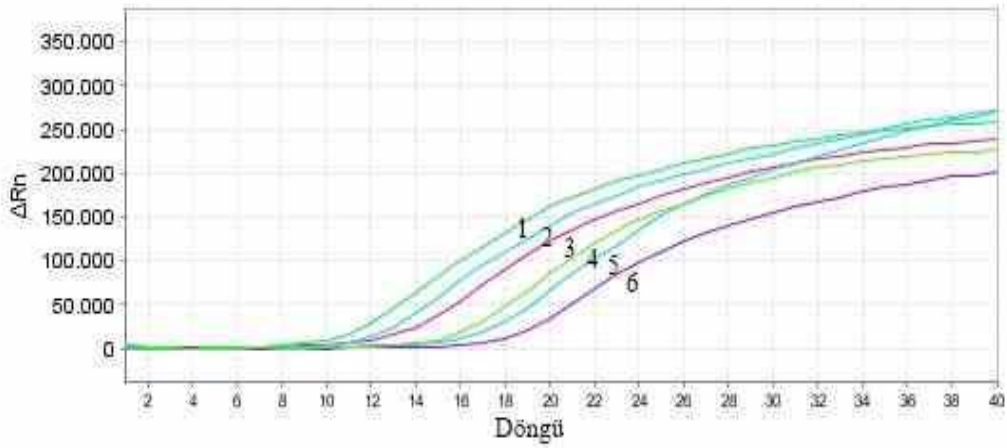
Bu çalışmada *C. jejuni* patojeni için *hipO* geninin amplifikasyonu ile identifikasyon yapılmıştır. Farklı çalışmalarda ise 16S rRNA, *ccON*, *cadF* ve *hsp60* gibi hedef genler kullanılmıştır (Park ve ark., 2011; Toplak ve ark., 2012; Alves ve ark., 2016). *C. jejuni* için

örnek zenginleştirme işlemi uygulanmadan 10^3 kob/mL belirleme limiti ve 24 saatlik bir zenginleştirme uygulanarak ise 1 kob/mL belirleme limiti ile tespit edilmiştir (Alves ve ark., 2016). SYBR-Green belirleme tekniği kullanılarak ise 53 kob/mL olarak en düşük belirleme limiti belirlenmiştir (Park ve ark., 2011).

C. jejuni patojeni düşük bir mikrobiyal yük ile (10^2 - 10^3 kob) hastalık oluşturabilmektedir. Bu nedenle Real Time PCR ile daha düşük belirleme limitlerine inebilmek *C. jejuni* gibi patojenlerin karakterizasyonu için önem taşımaktadır.

4.2.1.3. *Clostridium perfringens* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

C. perfringens patojen mikroorganizması *plc* geninin amplifikasyonuna bağlı olarak Real Time PCR ile karakterize edilmiştir. İzole edilmiş ve Cp1X olarak isimlendirilmiş DNA (Cp 1X: 613,76 ng/ μ L) seyreltilerek standart DNA dilusyonları oluşturulmuştur. Bu kalıp DNA dilusyonları ve Çizelge 3.4'te belirtilen türe özgü primer ve prob kullanılarak Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR analiz sonuçları incelendiğinde, Cp 1:X ve Cp 1:16X olarak tanımlanan DNA dilusyonları dışındaki standart DNA'ların başarılı bir şekilde amplifiye olduğu görülmüş ve kantitatif analizler için yapılan hesaplamalara dahil edilmiştir (Şekil 4.22).



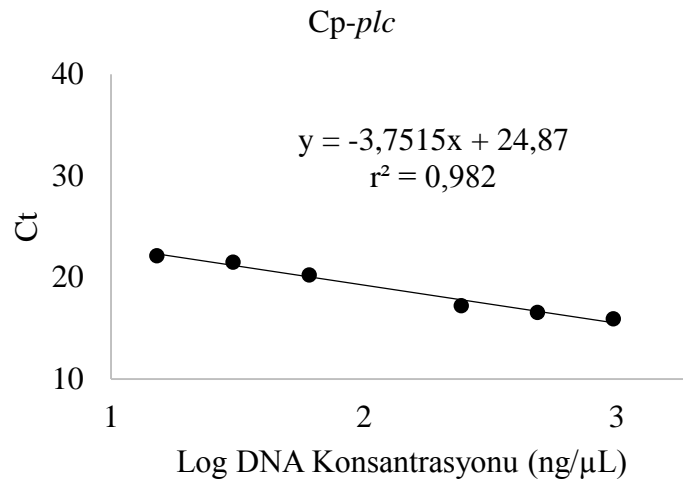
Şekil 4.22. *C. perfringens* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Cp 1:2X, 2: Cp 1:4X, 3: Cp 1:8X, 4: Cp 1:32X, 5: Cp 1:64X, 6: Cp 1:128X

Real Time PCR analizleri öncesinde *C. perfringens* mikroorganizması için belirlenen DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayılarının logaritmik değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca PCR analizleri sonucu DNA dilusyonlarının Ct değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *C. perfringens* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

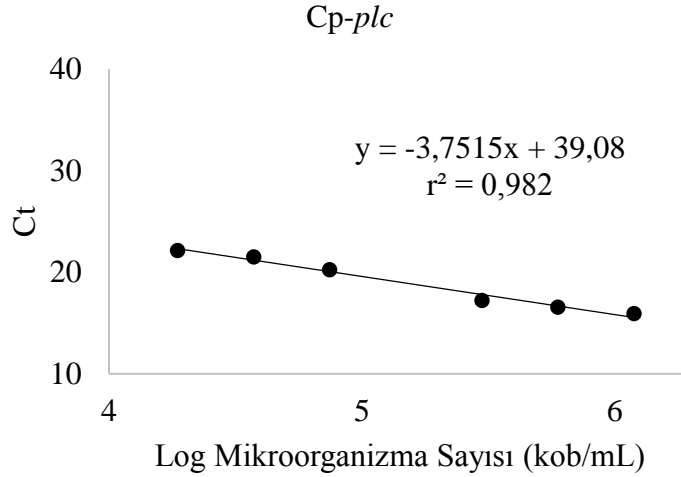
DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/ μ L	Mikroorganizma Sayısı kob/mL ($\times 10^4$)
Cp 1:2X	15,91	306,88	190
Cp 1:4X	16,56	153,44	95
Cp 1:8X	17,22	76,72	47
Cp 1:32X	20,24	19,18	12
Cp 1:64X	21,51	9,59	5,9
Cp 1:128X	22,14	4,79	3,0

Metodun belirleyebildiği en düşük limit DNA konsantrasyonu bazında 4,7 ng/ μ L ve mikrobiyal yük bazında ise $4,4 \times 10^4$ kob/mL'dir. *plc* geni için Ct değerine karşı DNA konsantrasyonu ve toplam mikrobiyal yük arasındaki ilişki oluşturulan kalibrasyon eğrileri ile belirlenmiştir (Şekil 4.23 ve 4.24). Seyreltilmiş DNA standartları ile çizilen kalibrasyon eğrisi 6 standart noktadan oluşmuştur. *C. perfringens* patojen mikroorganizmasını *plc* geninin amplifikasyonu ile kantitatif olarak tanımlayabilecek bu yeni yöntem 0,982 hassasiyete sahiptir.



Şekil 4.23. *C. perfringens plc* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki

C. perfringens ile ilgili çalışmalarda genellikle alfa (*cpa*), beta (*cpb*), iota (*ia*), epsilon (*etx*), beta2 (*cpb2*) toksin genleri ve enterotoksin (*cpe*) geni tanımlama için kullanılmıştır (Albini ve ark., 2007; Grant ve ark., 2008; Gurjar ve ark., 2008; Wang ve ark., 2010; Wu ve ark., 2011; Jung-Whan ve ark., 2012). Bu çalışmada ise *C. perfringens* mikrobiyal patojeni bir alfa toksin geni olan *plc* (*cpa*) geninin amplifikasyonu ile karakterize edilmiştir.



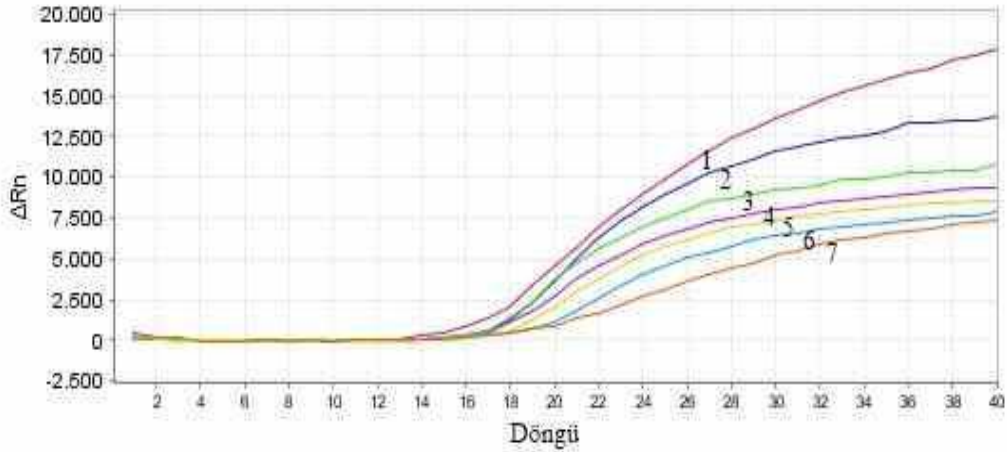
Şekil 4.24. *C. perfringens plc* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

C. perfringens mikrobiyal patojeni SYBR-Green teknolojisi kullanılarak *cpe* geninin amplifikasyonu ve 0,845 hassasiyet ile tespit edilmiştir (Wu ve ark., 2011). Bu çalışmada Taqman teknoloji kullanarak oluşturduğumuz metodun daha hassas olduğu görülmektedir. Bu farkın belirleme teknolojilerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *C. perfringens* patojeni ile Real Time PCR uygulamalarının fazla olmadığı görülmektedir. Dolayısı ile bu çalışma *C. perfringens* patojeninin tanısında alternatif bir yöntem oluşturmaktadır.

4.2.1.4. *Cronobacter sakazakii* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

C. sakazakii patojenini Real Time PCR ile belirlemek amacıyla *mms* geni amplifikasyon için seçilmiş, Çizelge 3.4'te belirtilen primer ve prob kullanılarak amplifiye edilmiştir. Referans suşlardan izole edilen kromozomal DNA 1:2 oranında 8 kat seyreltilmiştir. Bu DNA dilusyonları Real Time PCR ile analiz edilmiş, elde edilen amplifikasyon ürünleri için Ct değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.25). DNA konsantrasyonları, mikroorganizma sayıları ve Ct değeri arasındaki ilişki ise çizilen kalibrasyon eğrileri ifade edilmiştir. *C. sakazakii* mikroorganizması için 3 tekrarlı bağımsız olarak 8 DNA dilusyonu analiz edilmiş sadece Cs 1:2X olarak isimlendirilen seyreltilmiş DNA standardının amplifikasyonundan sonuç alınamamıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7'de *C. sakazakii* referans mikroorganizmasının DNA konsantrasyonları, mikrobiyal yük ve Ct değerleri gösterilmiştir. Bu değerler kullanılarak amplifikasyon ürünleri ile DNA konsantrasyonu ve mikrobiyal yük arasındaki ilişki oluşturulan kalibrasyon eğrileri ile belirlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27).



Şekil 4.25. *C. sakazakii* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Cs 1X, 2: Cs 1:4X, 3: Cs 1:8X, 4: Cs 1:16X, 5: Cs 1:32X, 6: Cs 1:64X, 7: Cs 1:128X

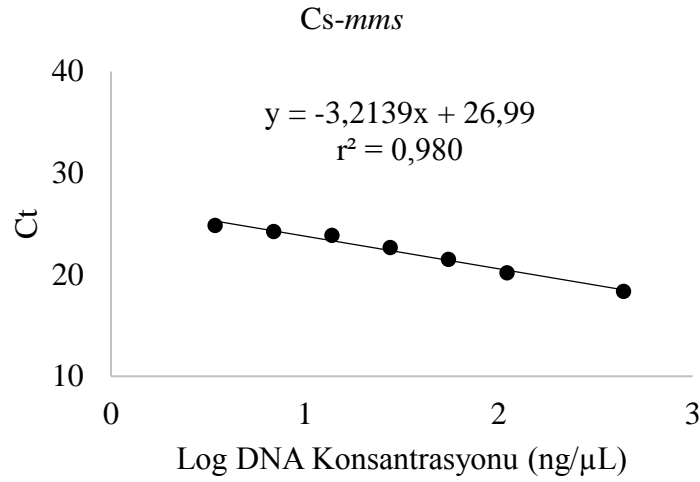
mms geninin amplifiye olması ile elde edilen Ct değeri ile DNA konsantrasyonu arasındaki logaritmik ilişki 0,980 hassasiyet ile tespit edilmiştir. Analizler sonucunda regresyon denklemi “ $y = -3,2139x + 26,99$ ” olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisinin DNA konsantrasyonu bazında dinamik aralığı 3,44-440,60 ng/μL ve mikrobiyal yük bazında ise $8,3 \times 10^5 - 1,1 \times 10^8$ kob/mL arasında belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. *C. sakazakii* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

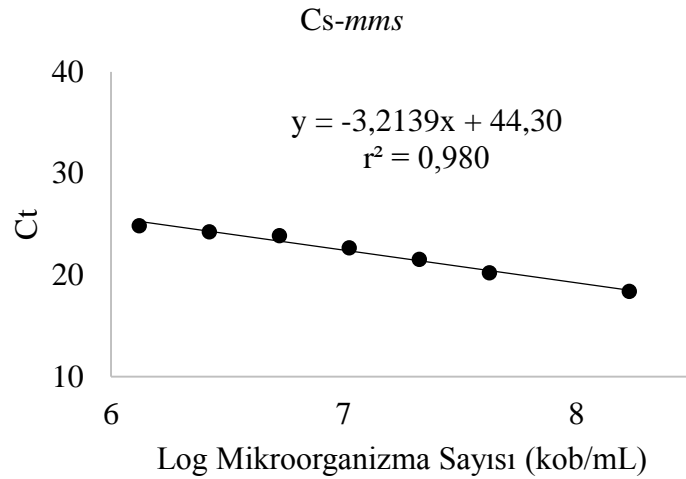
DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL ($\times 10^5$)
Cs 1X	18,36	440,60	1100
Cs 1:4X	20,19	110,15	270
Cs 1:8X	21,51	55,08	130
Cs 1:16X	22,65	27,54	67
Cs 1:32X	23,86	13,77	33
Cs 1:64X	24,23	6,88	17
Cs 1:128X	24,83	3,44	8,3

C. sakazakii için 0,99 hassasiyet ve 10^3 kob/mL’ye belirleme limiti ile yeni bir Real Time PCR metodu geliştirilmiştir (Wang ve ark., 2012). Ayrıca farklı bir Real Time PCR metodu ile *C. sakazakii* patojeni çok düşük miktarda (10^0 kob/mL) belirlenmiştir (Seo ve Brackett, 2005). Bu mikrobiyal patojen 10^0 - 10^3 kob gibi değişen belirleme limitleri ve *mms*, *G operon*, *IA operon* gibi hedef bölgeler ile birçok Real Time PCR uygulamasında karakterize edilmiştir (Li ve ark., 2006; Hyeon ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012). Bu tez

çalışmasında ise 0,98 hassasiyet ile *mms* geni ile *C. sakazakii* tanımlaması yapılmış ve bu yeni yöntem güncel alternatif bir metot özelliği taşımaktadır.



Şekil 4.26. *C. sakazakii mms* operon geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki

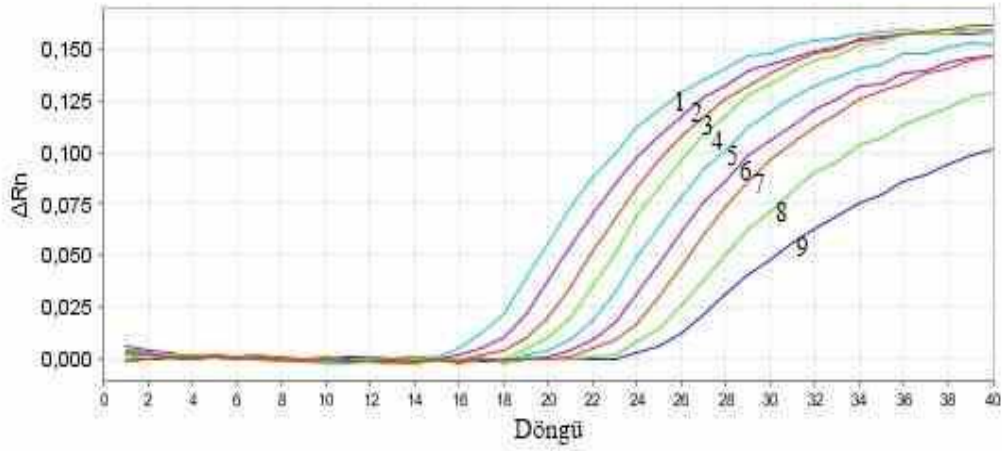


Şekil 4.27. *C. sakazakii mms* operon geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

4.2.1.5. *Escherichia coli* O157:H7 miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

Shiga toksini üreten (*stx2*) genin amplifikasyonu ile *E. coli* O157:H7 referans patojenini karakterize edebilmek amacıyla Real Time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan primer ve prob Çizelge 3.4'te belirtilmiştir. Real Time PCR analizleri için izole edilen DNA konsantrasyonu (EcO 1X) 806,75 ng/μL olarak ölçülmüştür. Uygulanan seri dilusyonlar ile (1:2 oranında 9 kat) seyreltilmiş DNA standartları oluşturulmuştur. Real Time PCR analizleri sonrasında DNA standartlarının amplifikasyon

grafikleri Şekil 4.28’de görülmektedir. *stx2* geni bütün DNA standartlarında başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir.



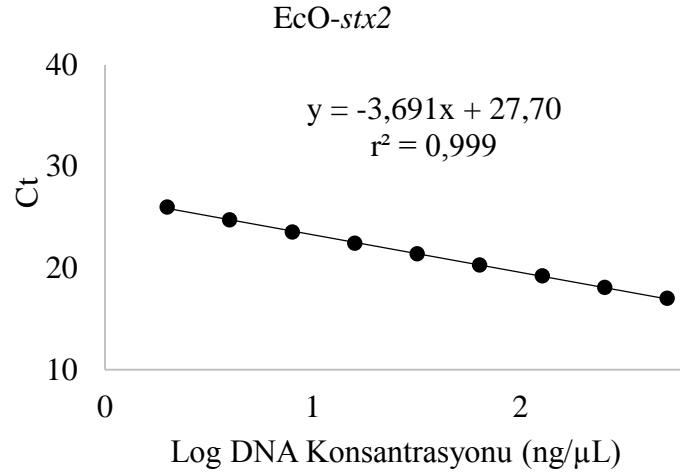
Şekil 4.28. *E. coli* O157:H7 referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: EcO 1X, 2: EcO 1:2X, 3: EcO 1:4X, 4: EcO 1:8X, 5: EcO 1:16X, 6: EcO 1:32X, 7: EcO 1:64X, 8: EcO 1:128X, 9: EcO 1:256X

E. coli O157:H7 patojeni için Real Time PCR analizleri sonucu eşik değeri döngü sayıları tespit edilmiştir. Yine bu patojen için DNA dilusyonlarının DNA konsantrasyonları ve onlara karşılık gelen mikroorganizma sayıları hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Ayrıca DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayılarının doğrusal bir kalibrasyon eğrisi çizmek amacıyla logaritmik değerleri alınmıştır. Bu metot ile dinamik aralık kromozomal DNA için yaklaşık 3-806 ng/μL olarak belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7 patojeni için toplam mikrobiyal yük ise $3,5 \times 10^5$ - 9×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

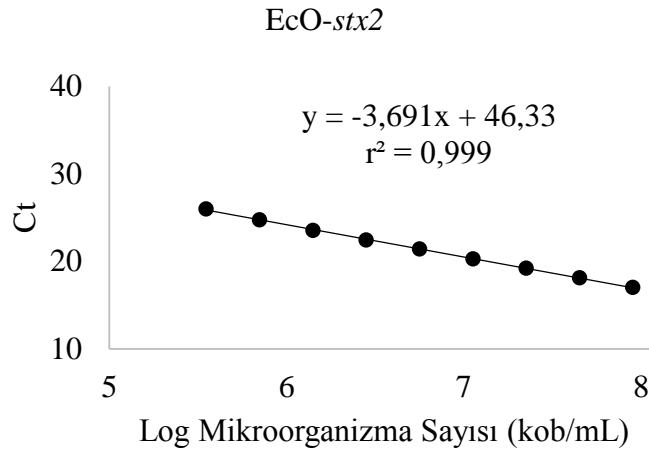
Çizelge 4.8. *E. coli* O157:H7 patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL ($\times 10^5$)
EcO 1X	17,01	806,75	900
EcO 1:2X	18,10	403,38	450
EcO 1:4X	19,21	201,69	230
EcO 1:8X	20,28	100,84	110
EcO 1:16X	21,42	50,42	56
EcO 1:32X	22,45	25,21	28
EcO 1:64X	23,53	12,61	14
EcO 1:128X	24,75	6,30	7,0
EcO 1:256X	25,99	3,15	3,5

Ct değerine karşı DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayısı baz alınarak kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Her iki kalibrasyon eğrisi için korelasyon katsayısı 0,999 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrileri 9 standart noktadan oluşan geniş bir dinamik aralığa sahiptir (Şekil 4.29 ve 4.30).



Şekil 4.29. *E. coli* O157:H7 *stx2* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki



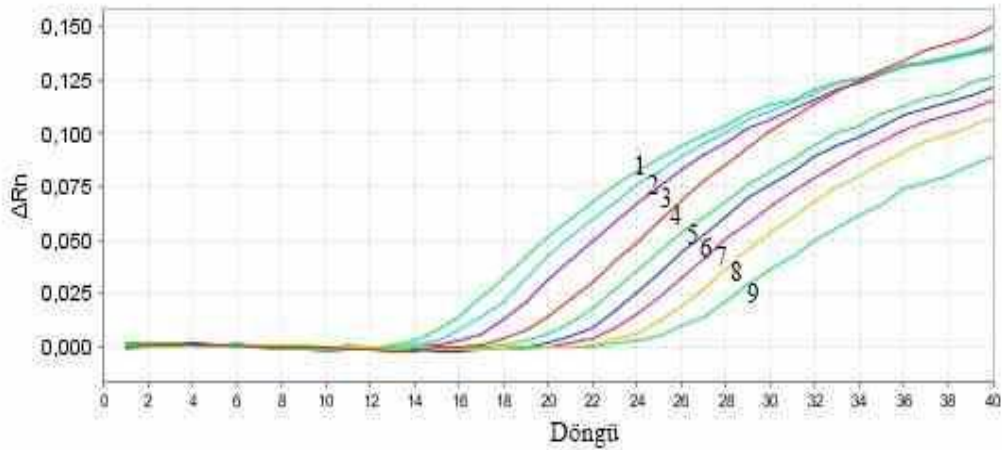
Şekil 4.30. *E. coli* O157:H7 *stx2* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

E. coli O157:H7 gıda kaynaklı mikroorganizmalar arasında en yaygın olarak çalışılmış patojen olup en çok amplifikasyonu gerçekleştiren hedef genler ise *stx1*, *stx2*, *eae*, *rfbE* ve *uidA* genleridir. Bu çalışmada da *stx2* hedef gen bölgesinin amplifikasyonu ile bu mikrobiyal patojenin tanımlaması yapılmıştır. *E. coli* O157:H7 ile ilgili Real Time PCR çalışmalarında 10^0 - 10^3 kob arasında değişen belirleme limitlerinde saptama yapılabilmektedir.

Bununla beraber bu çalışmada olduğu gibi Taqman teknolojisi ile tanımlanmış çalışmaların yanı sıra SYBR-Green, LNA prob ve Akrep primerleri gibi farklı belirleme teknolojileride uygulanmıştır (Sharma ve ark., 2000; Elizaquivel ve ark., 2008; Omiccioli ve ark., 2009; Singh ve ark., 2009; Köppel ve ark., 2013).

4.2.1.6. *Enterococcus faecalis* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

16S rRNA geni hedef gen olarak belirlenerek Real Time PCR analizleri ile *E. faecalis* patojen mikroorganizması nicel ve nitel olarak tanımlanmıştır. *E. faecalis* için izole edilen kromozomal DNA'nın (Ef 1X: 518,4 ng/μL) 9 kat seri dilusyonları ile kalibrasyon noktalarını belirleyen seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.31). *E. faecalis* patojen mikroorganizmasına özgü tüm seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyonlarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayıları bilinen seyreltik DNA dilusyonlarının analizler sonucunda Ct değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.9). *E. faecalis* patojen mikroorganizması 16S rRNA geninin PCR ile amplifikasyonu için analiz edilen seyreltilmiş kromozomal DNA'lar kullanıldığında analizi sonucu 15 ve 26. amplifikasyon döngüleri arasında Ct değerleri belirlenmiştir.



Şekil 4.31. *E. faecalis* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Ef 1X, 2: Ef 1:2X, 3: Ef 1:4X, 4: Ef 1:8X, 5: Ef 1:16X, 6: Ef 1:32X, 7: Ef 1:64X, 8: Ef 1:128 X, 9: Ef 1:256X

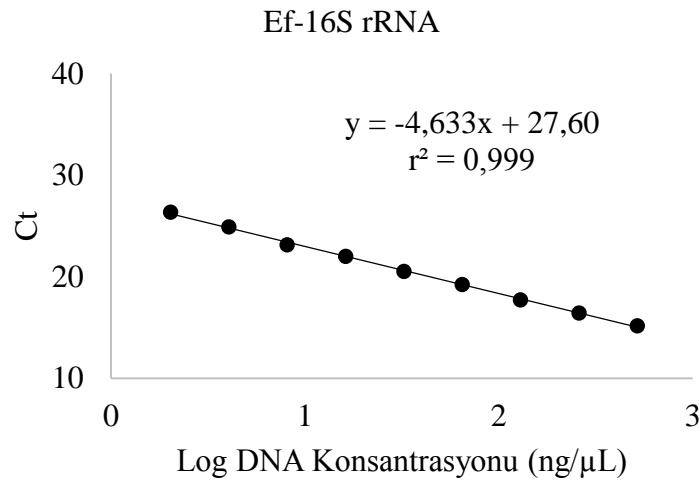
Çizelge 4.9'da belirtildiği gibi 16S rRNA geni için 2 ng/μL en düşük belirlenen DNA konsantrasyon miktarı olmuş ve mikroorganizma sayısı olarak en düşük belirleme limiti ise $1,7 \times 10^4$ kob/mL olarak belirlenmiştir. Ct amplifikasyon değeri ile DNA konsantrasyonu ve

mikroorganizma sayısı arasındaki logaritmik ilişki ise 0,999 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.32 ve 4.33).

Çizelge 4.9. *E. faecalis* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL(x10 ⁵)
Ef 1X	15,17	518,40	460
Ef 1:2X	16,43	259,20	230
Ef 1:4X	17,73	129,60	110
Ef 1:8X	19,23	64,80	57
Ef 1:16X	20,54	32,40	29
Ef 1:32X	21,99	16,20	14
Ef 1:64X	23,12	8,10	7,1
Ef 1:128X	24,90	4,05	3,6
Ef 1:256X	26,35	2,03	1,8

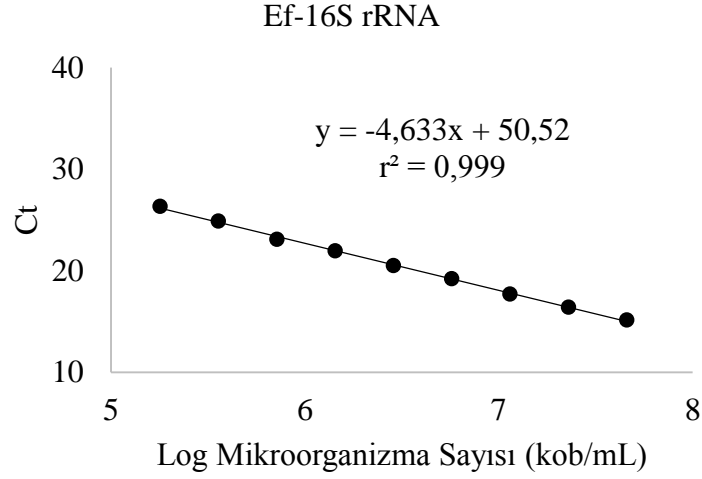
E. faecalis patojen mikroorganizması için Real Time PCR metodu kullanılarak (5x10⁰ ve 5x10⁶ kopya/reaksiyon) 7 noktalı ve 0,99 korelasyon katsayısı ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Metodun en düşük belirleme limiti ise 5 kob/reaksiyon olarak tespit edilmiştir (He ve ark., 2005). Çalışmanın sonuçları bulgularımız ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.32. *E. faecalis* 16S rRNA geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki

Farklı bir çalışmada ise 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu ve SYBR-Green teknoloji ile 0,98 hassasiyete sahip yeni bir Real Time PCR protokolü geliştirilmiştir

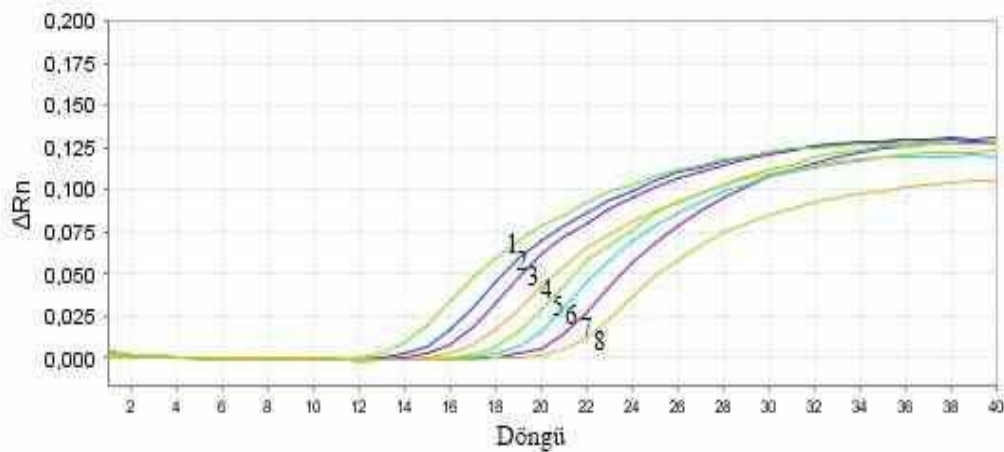
(Sedgley ve ark., 2005). Korelasyon katsayısının bu çalışmadaki bulgulara göre düşük olması SYBR-Green belirleme teknolojinin Taqman teknolojisi kadar hassas olmamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.33. *E. faecalis* 16S rRNA geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

4.2.1.7. *Klebsiella pneumoniae* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

phoE geni amplifikasyonu için gerçekleştirilen Real Time PCR tepkimeleri ile *K. pneumoniae* patojen mikroorganizması kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Analizlerde 8 farklı DNA dilusyonu test edilmiş ve başarılı amplifikasyonlar elde edilmiştir (Şekil 4. 34).



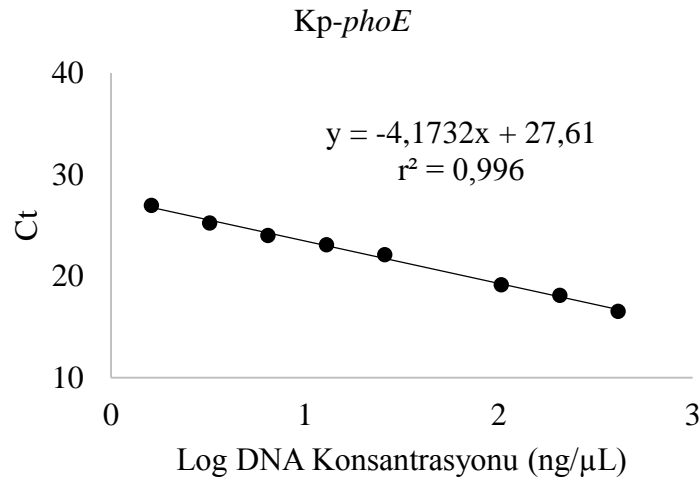
Şekil 4.34. *K. pneumoniae* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Kp 1X, 2: Kp 1:2X, 3: Kp 1:4X, 4: Kp 1:8X, 5: Kp 1:16X, 6: Kp 1:32X, 7: Kp 1:64X, 8: Kp 1:128 X

Metodun dinamik aralığı kromozomal DNA konsantrasyonu bazında 1,6-412 ng/μL ve toplam mikroorganizma sayısı bakımından ise 1,3x10⁵-3,4x10⁷ kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). DNA konsantrasyonları ve mikroorganizmaların logaritmik değerleri kalibrasyon eğrileri için hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. *K. pneumannia* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL (x10 ⁵)
Kp 1X	16,50	412,75	340
Kp 1:2X	18,11	206,38	170
Kp 1:4X	19,13	103,19	84
Kp 1:16X	22,08	25,80	21
Kp 1:32X	23,07	12,90	11
Kp 1:64X	24,00	6,45	5,3
Kp 1:128X	25,20	3,22	2,6
Kp 1:256X	26,94	1,61	1,3

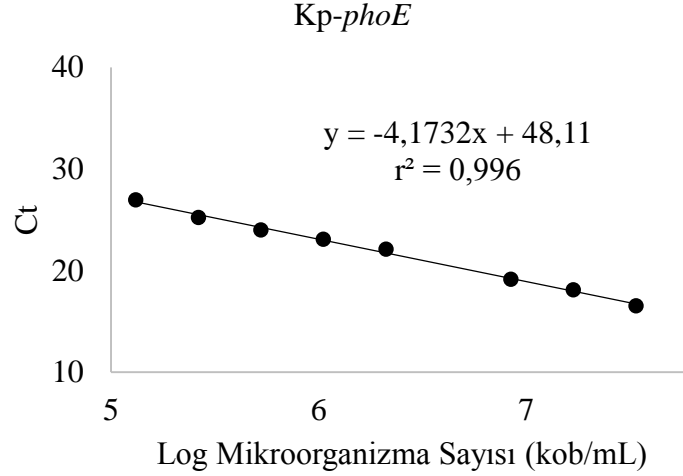
Hedef gen bölgesi için çizilen standart eğrilerin kalibrasyon noktaları 1X (412,75 ng/μL) ile 1:256X (1,61 ng/μL) aralığında yer almaktadır. *phoE* hedef geninin amplifikasyonuna bağlı olarak belirlenen Ct değerine karşı DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayısı arasındaki ilişki ise korelasyon katsayıları ($r^2=0,99$) ile belirlenmiştir (Şekil 4.35 ve 4.36).



Şekil 4.35. *K. pneumannia phoE* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki

phoE genin amplifikasyonuna bağlı olarak geliştirilen Real Time PCR protokolünde dinamik aralığı 10⁴-10⁹ kopya/mL *K. pneumannia* ya karşılık gelen kromozomal DNA'lar

ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayısı 0,998 olarak tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2010). Bu çalışmanın sonuçları bulgularımız ile benzerlik göstermektedir. Bu patojen için Real Time PCR ile yapılan uygulamalarda *phoE* geni dışında *bla_{KPC}*, *khe*, *rmpA*, *magA*, 16S rRNA ve *ntrA* genleri de amplifiye edilmiş ve genellikle SYBR-Green belirleme teknolojisi kullanılarak bu patojenin identifikasyonu yapılmıştır (Kurupati ve ark., 2004; Cole ve ark., 2009; Hartman ve ark., 2009; Anbazhagan ve ark., 2011; Chen ve ark., 2012).



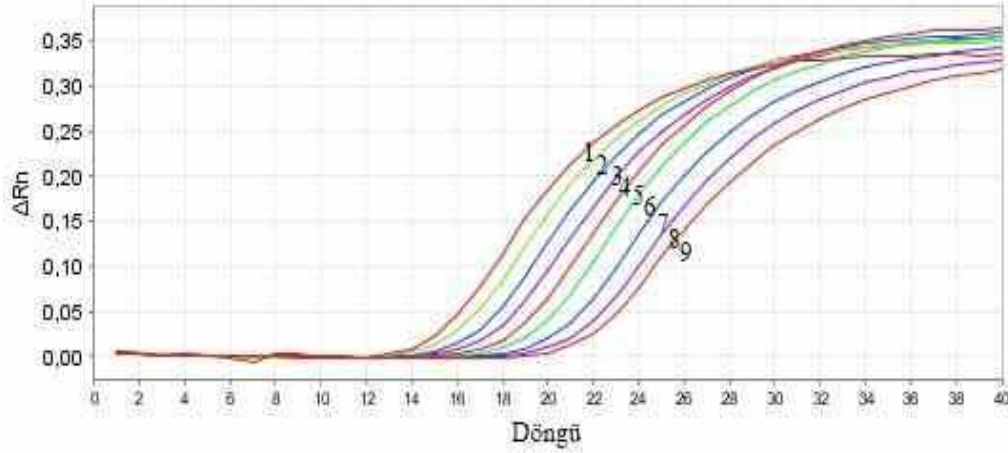
Şekil 4.36. *K. pneumannia phoE* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

4.2.1.8. *Listeria monocytogenes* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

Listeria patojeni Real Time PCR teknoloji ile tespit etmek için izole edilen kromozomal DNA'nın seri dilusyonları ile hazırlanan standart DNA'lar ile 3 paralel olarak amplifiye edilmiş 9 kalibrasyon noktası oluşturulmuştur (Şekil 4.37). Real Time PCR cihazında analize tabi tutulan her bir standart kromozomal DNA için cihazın yazılımı kullanılarak Ct değerleri ile DNA arasındaki logaritmik ilişki belirlenmiş, standart eğriler çizilmiştir. *Listeria* için türe özgü *hly* hedef gen bölgesi için seyreltilmiş kromozomal DNA'lar ve onlara ait Ct, DNA ve mikroorganizma sayısı hakkındaki bilgiler Çizelge 4.11'de belirtilmiştir.

Listeria patojeninin türe özgü *hly* geninin amplifikasyonu sonucu DNA konsantrasyonları ve mikroorganizma sayısına karşılık gelen Ct değerleri ile standart eğriler çizilmiştir. Oluşturulan metodun dinamik aralığı 1,17 ng/uL ile 298,30 ng/uL arasında değişmektedir. Mikrobiyal yük ise $4,0 \times 10^5$ kob/mL ile $1,0 \times 10^8$ kob/mL aralığında tanımlanmıştır. Kalibrasyon eğrileri çizilerek belirlenen korelasyon katsayısı 0,998 ile bu iki

değişken arasındaki ilişki belirlenmiş, metodun doğruluk ve hassasiyeti test edilmiştir (Şekil 4.38 ve 4.39).

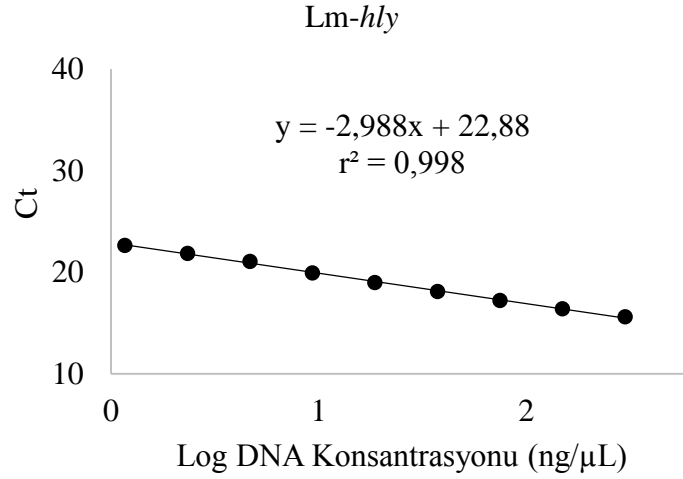


Şekil 4.37. *L. monocytogenes* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilasyonları; 1: Lm 1X, 2: Lm 1:2X, 3: Lm 1:4X, 4: Lm 1:8X, 5: Lm 1:16X, 6: Lm 1:32X, 7: Lm 1:64X, 8: Lm 1:128 X, 9: Lm 1:256X

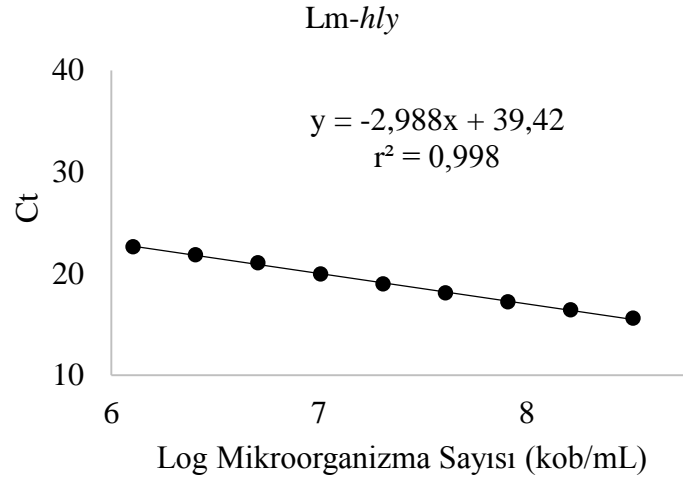
Çizelge 4.11. *L. monocytogenes* patojeni için standart DNA dilasyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilasyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL (x10 ⁵)
Lm 1X	15,60	298,30	1000
Lm 1:2X	16,40	149,15	520
Lm 1:4X	17,21	74,57	260
Lm 1:8X	18,09	37,29	130
Lm 1:16X	18,97	18,64	64
Lm 1:32X	19,94	9,32	32
Lm 1:64X	21,06	4,66	16
Lm 1:128X	21,84	2,33	8,0
Lm 1:256X	22,63	1,17	4,0

L. monocytogenes sağlık açısından yüksek risk potansiyeline sahip mikrobiyal patojenlerden biridir. Bu patojenin mikrobiyal potansiyeli Real Time PCR teknoloji ile belirlenmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi *hly* geninin amplifikasyonuna dayanan çalışmaların (Jothikumar ve ark., 2003; Singh ve ark., 2012) yanı sıra *hlyA*, *hlyQ*, *prfA* ve *ssrA* gibi hedef genleri baz alan Real Time PCR çalışmaları da bulunmaktadır (O'Grady ve ark., 2008; Omiccioli ve ark., 2009; Garrido ve ark., 2012; Garrido ve ark., 2013; Köppel ve ark., 2013). Bu çalışmalarda belirlenen en düşük belirleme limiti (ortalama 10⁰ kob) bu çalışmadaki bulgulara göre daha düşük bulunmuştur.



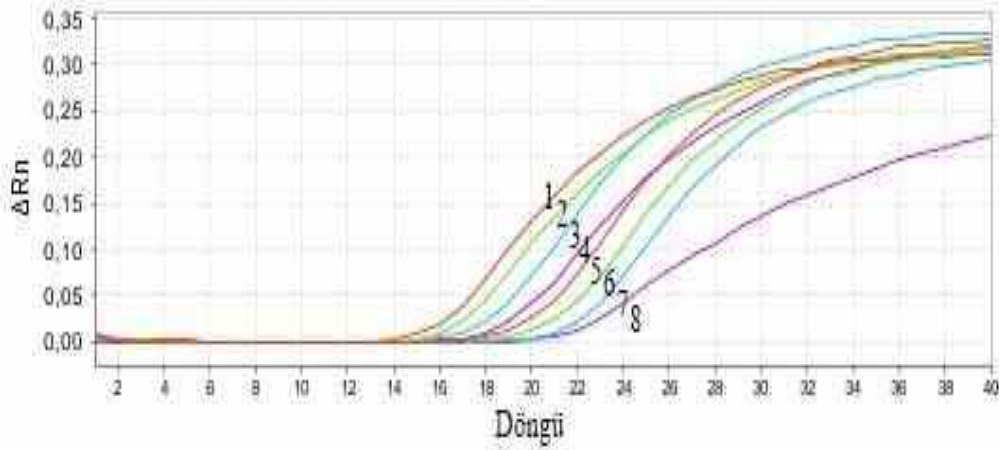
Şekil 4.38. *L. monocytogenes hly* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.39. *L. monocytogenes hly* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

4.2.1.9. *Staphylococcus aureus* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

S. aureus patojen mikroorganizmasını Real Time PCR cihazı ile tanımlamak amacıyla *nuc* geni amplifiye edilecek hedef gen olarak seçilmiştir. Bir gece inkube edilen referans suşların kültürlerinden kromozomal DNA'lar izole edilmiş ve yine aynı kültürler kullanılarak yapılan yayma yöntemi ile toplam mikroorganizma sayımları yapılmıştır. İzole edilen DNA "Sa 1X" olarak ve seyreltilmiş DNA standartları ise bu bağlamda seyreltme katsayılarına göre isimlendirilmiştir. Seyreltilmiş DNA standartları Real Time PCR ile analiz edildiğinde amplifikasyonlar başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.40).



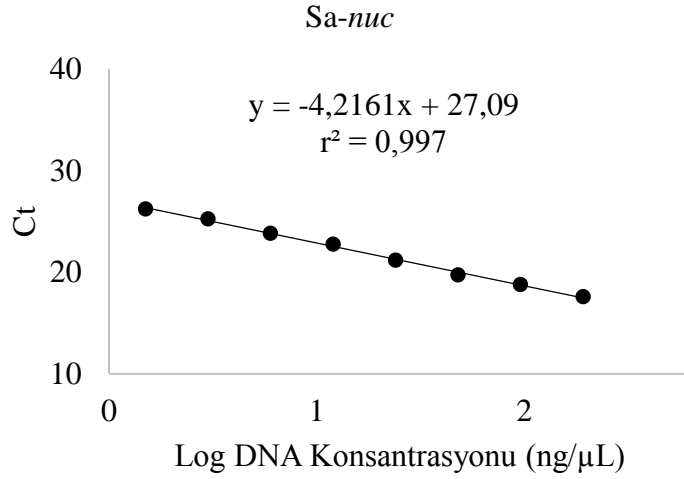
Şekil 4.40. *S. aureus* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Sa 1X, 2: Sa 1:2X, 3: Sa 1:4X, 4: Sa 1:8X, 5: Sa 1:16X, 6: Sa 1:32X, 7: Sa 1:64X, 8: Sa 1:128 X

DNA konsantrasyonu, mikroorganizma sayıları ve bunlara karşılık gelen Ct değerleri Çizelge 4.12’de belirtilmiştir. Real Time PCR analizleri ile seyreltilmiş DNA standartları için eşik değeri döngüleri belirlenmiştir. Bu Ct değerleri ile DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile gösterilmiştir (Şekil 4.41). Ayrıca yine Ct değeri ve bu patojenin mikrobiyal yükü aynı şekilde kalibrasyon eğrisi ile tanımlanmıştır (Şekil 4.42).

Çizelge 4.12. *S. aureus* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

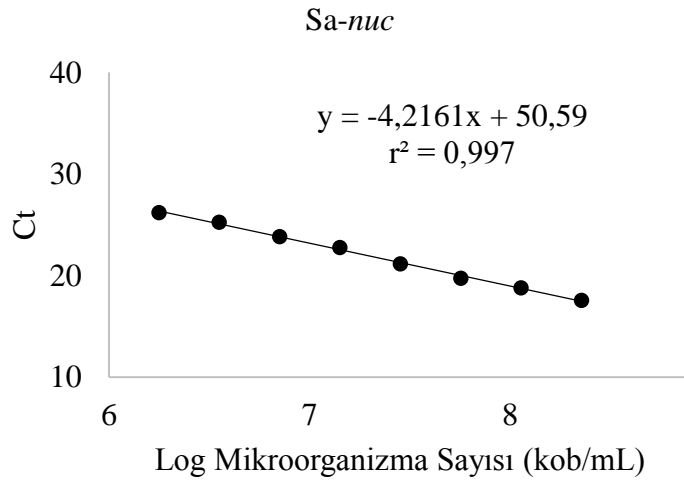
DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/µL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL ($\times 10^5$)
Sa 1X	17,58	191,50	720
Sa 1:2X	18,79	95,75	360
Sa 1:4X	19,73	47,88	180
Sa 1:8X	21,17	23,94	90
Sa 1:16X	22,77	11,97	45
Sa 1:32X	23,84	5,98	22
Sa 1:64X	25,25	2,99	1,1
Sa 1:128X	26,21	1,50	5,6

nuc hedef geni için en düşük DNA konsantrasyonu 1,50 ng/µL ve buna denk gelen Ct değeri 26. döngü ve mikroorganizma sayısı ise $5,6 \times 10^5$ kob/mL olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları aynı olup 0,997’dir ve oluşturulan metodun hassasiyetinin göstergesi olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.41. *S. aureus nuc* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki

S. aureus mikrobiyal patojeni karakterize etmek için birçok yeni Real Time PCR protokolleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen protokolde ise *nuc* geninin amplifikasyonu ile bu patojen tanımlanırken farklı çalışmalarda *SAOUHSC_02297*, *nuc*, *htrA* ve *oriC* gibi virülans özellikli genler tanımlama için seçilmiştir (Hein ve ark., 2005; Alarcon ve ark., 2006; Chiang ve ark., 2007; Elizaquivel ve ark., 2008).

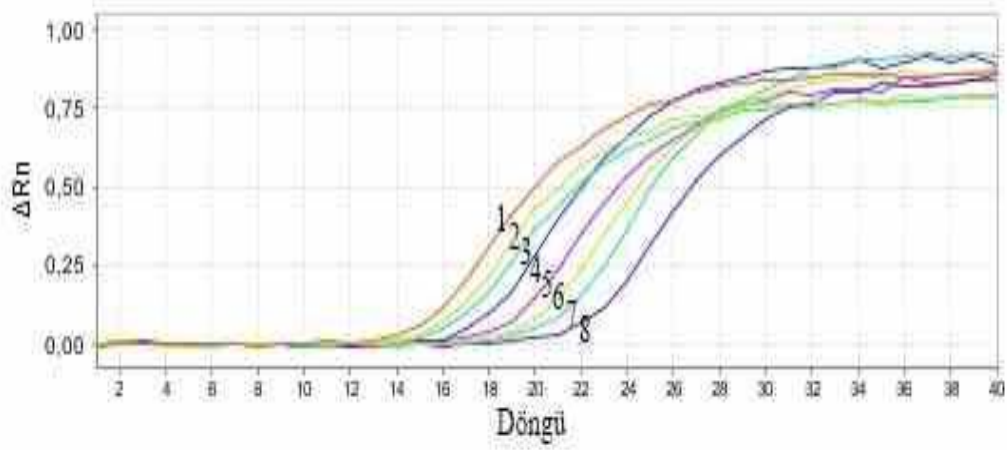


Şekil 4.42. *S. aureus nuc* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

4.2.1.10. *Salmonella enterica* miktarının Real Time PCR ile belirlenmesi

ttr geni *Salmonella* patojenini tanımlamak amacıyla amplifiye edilecek hedef bölge olarak seçilmiştir. Referans suşlar ile hazırlanan seyreltilmiş kromozomal DNA'lar ile Real Time PCR tepkimeleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.43). Seyreltilmiş kromozomal DNA'lar

kantitatif tanımlama yapabilmek için oluşturulan standart eğrilerin noktalarını oluşturmuştur. İzole edilen DNA (Se 1X:178,60 ng/μL) 8 kat seyreltilmiş ve en düşük DNA konsantrasyonu olarak 1,36 ng/μL tespit edilmiştir (Çizelge 4.13).



Şekil 4.43. *S. enterica* referans suşuna ait seyreltilmiş DNA standartlarının amplifikasyon grafiği. DNA dilusyonları; 1: Se 1X, 2: Se 1:2X, 3: Se 1:4X, 4: Se 1:8X, 5: Se 1:16X, 6: Se 1:32X, 7: Se 1:64X, 8: Se 1:128 X

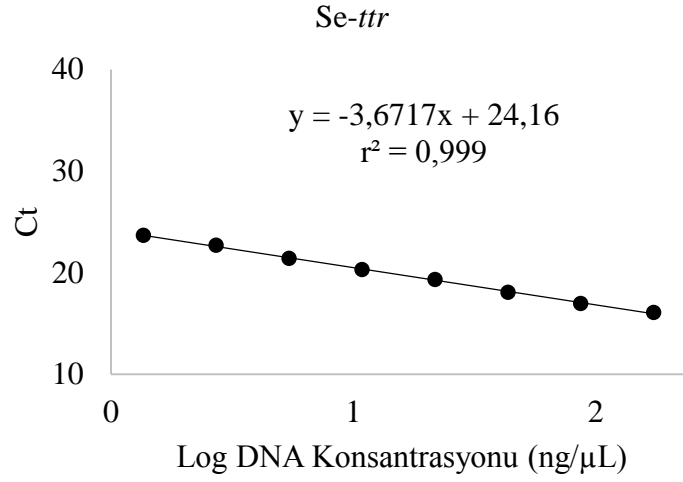
ttr geni için belirlenen Ct değerleri yaklaşık 15-23 döngüleri arasında değişmektedir. Tespit edilebilen en düşük mikroorganizma sayısı ise $2,7 \times 10^5$ kob/mL'dir. DNA konsantrasyonu ve ona karşılık gelen, analiz sonrası belirlenen Ct değerlerine karşı korelasyon katsayısı 0,999'dir (Şekil 4.44).

Çizelge 4.13. *S. enterica* patojeni için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

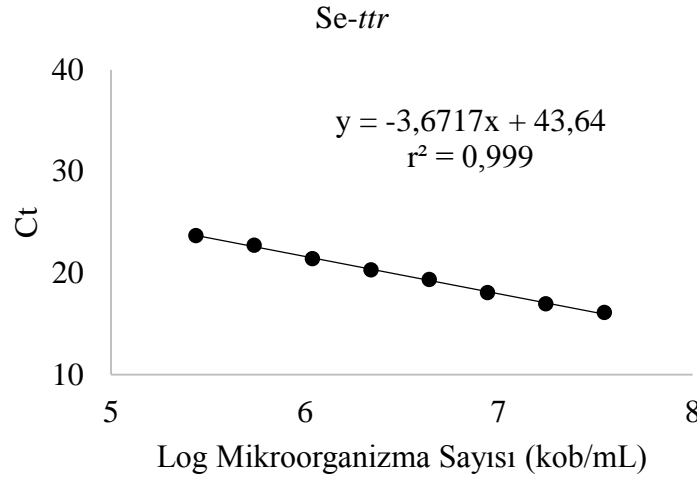
DNA Dilusyonu	Ct	DNA Konsantrasyonu ng/μL	Mikroorganizma Sayısı kob/mL ($\times 10^5$)
Se 1X	16,09	173,60	350
Se 1:2X	16,95	86,80	180
Se 1:4X	18,06	43,40	88
Se 1:8X	19,33	21,70	44
Se 1:16X	20,30	10,85	22
Se 1:32X	21,41	5,43	11
Se 1:64X	22,70	2,71	5,5
Se 1:128X	23,67	1,36	2,7

Aynı zamanda mikroorganizma sayısının logaritması alınarak Ct değerine karşı oluşturulan kalibrasyon eğrisi de yine aynı korelasyon katsayısı ile metodun hassasiyet ve doğruluğunu göstermiştir (Şekil 4.45). *S. enterica* mikrobiyal patojeni için yeni bir Real

Time PCR metodu geliştirilmiştir. İki farklı DNA ekstraksiyon metodu uygulanan bu metodun hassasiyeti 0,99 olarak belirlenmiştir (Garrido ve ark., 2013).



Şekil 4.44. *S. enterica ttr* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 4.45. *S. enterica ttr* geni için oluşturulan kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki

S. enterica mikrobiyal patojeni $3,6 \times 10^1$ - $3,6 \times 10^8$ kob/mL dinamik aralığında korelasyon katsayısı 0,99 olarak tespit edilmiştir (Xiao ve ark., 2015). *S. enterica* için geliştirilen başka bir yaklaşımda ise *invA* hedef geni amplifiye edilmiş ve oluşturulan kalibrasyon eğrisi için ise 0,98 korelasyon katsayısı hesaplanmıştır (Singh ve Mustapha, 2014). Bulgularımız ile bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında metodların hassasiyetlerinin birbirine benzer oldukları görülmüştür.

4.2.2. Multipleks Real Time PCR

Multipleks Real Time PCR farklı floresan özellik taşıyan birden fazla prob ve bu problemlerin bağlandığı bölgeyi amplifiye edecek primer çiftleri kullanılarak hedeflenen DNA ya da DNA'ları eş zamanlı kalitatif ve kantitatif olarak belirleyebilen uygulamadır. Bu yaklaşım gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Multipleks Real Time PCR ile birçok mikrobiyal patojen ya da bir patojenin birden fazla hedeflenen nükleik asit bölgeleri belirlenmiştir (Hartman ve ark., 2009; Singh ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Garrido ve ark., 2013; Alves ve ark., 2016).

Bu teknoloji ile hedeflenen birden fazla ampikonun kalitatif ve kantitatif olarak karakterizasyonunun yapılması, hızı, doğruluğu gibi üstünlüklerinin yanı sıra bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Bu sınırlamalardan en önemlisi kullanılan floresan moleküllerin dalga boyu aralıklarıdır. Bir floresan molekül uyarılma ve yayılma olarak iki farklı dalga boyu aralığına sahiptir (Shipley, 2007; Navarro ve ark., 2015). Multipleks Real Time PCR analizlerinde floresan moleküllere ait dalga boylarının birbirleri ile örtüşmemesi gerekmektedir. Daha önceki Real Time PCR belirleme tekniklerinde problemlerin 5' ve 3' ucunda bulunan muhbir ve söndürücü floresan moleküllerin her ikisi de belirli dalga boyu aralıkları ile ışımaya yayma özelliğine sahiptir. Belirleme teknolojisindeki gelişmeler ile söndürücü moleküller floresan özellik taşımayan nitelikte geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Dolayısı ile muhbir floresan moleküller için daha geniş bir dalga boyu aralığı imkanı oluşmuştur (Mackay, 2004). Bu çalışmada ise Taqman problemleri için FAM (495 nm-520 nm), HEX (535 nm -556 nm), Texas RED (597 nm -616 nm) ve Cy5 (646 nm -669 nm) olarak 4 farklı muhbir floresan molekül kullanılmıştır. Söndürücü molekül olarak ise floresan ışımaya yaymayan BHQ1 (480 nm-580 nm), BHQ2 (558 nm -670 nm) ve BHQ3 (670 nm -730 nm) molekülleri kullanılmıştır. Multipleks Real Time PCR'ın diğer bir sınırlaması ise Real Time PCR cihazının bir özelliği olan farklı sayıdaki kanal sayısına sahip olmasıdır. Farklı floresan moleküllerin ışınmaları farklı kanallar aracılığı ile floresan algılama sistemine iletilmektedir (Navarro ve ark., 2015). Analiz sırasında her bir kanal sadece bir floresan molekülün (bir probun) ışınmalarını iletmektedir. Bu nedenle kanal sayıları Multipleks Real Time PCR uygulamaları için hedef bölge sayılarını sınırlandırmaktadır.

Bu çalışmada farklı sayıda patojen mikroorganizmayı kalitatif ve kantitatif olarak tek bir amplifikasyonda tanımlayabilmek için yeni Multipleks Real Time PCR stratejileri geliştirilmiştir. Her bir Multipleks Real Time PCR gruplarına özel hedef patojenlerin en uygun PCR koşullarını belirleyebilmek için alternatif Real Time PCR amplifikasyon

protokolleri denenmiştir. Amplifikasyonlarda primer konsantrasyonları başta olmak üzere PCR koşullarında çeşitli değişiklikler yapılmış, E^R1, E^R2, E^R3 ve E^R4 olarak kodlanmış, dört farklı Multipleks Real Time PCR gruplarına özgü en uygun PCR koşulları belirlenmiştir.

4.2.2.1. E^R1 grubu için Multipleks Real Time PCR

E^R1 grup içerisinde yer alan *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojen mikroorganizmalar için yeni bir Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirilmiştir. Real Time PCR analizlerinde kalıp DNA olarak bir gece inkube edilmiş referans kültürlerden 1 mL alınarak izole edilen kromozomal DNA'lar kullanılmıştır. Ayrıca aynı kültürden alınan 1 mL sıvı kültürden ise mikroorganizma sayımı yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar 1:2 oranında 8 kat seyreltilerek DNA standartları hazırlanmış ve çizilecek kalibrasyon eğrisi için standart noktaları oluşturmuştur. Hedef patojen mikroorganizmalar için kullanılan primer ve prob lar ve hedefledikleri gen bölgeleri ise Çizelge 3.4'te belirtilmiştir.

Yöntemde, *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerinin her biri için 1 µL kalıp DNA, 1 µL ileri primeri (10 µM), 1 µL geri primeri (10 µM), 1 µL prob (10 µM) kullanılmıştır. Ayrıca 3 µL PCR buffer (10X), 3 µL dNTP (2 mM), 0,5 µL universal ileri primeri (10 µM), 0,5 µL universal geri primeri (10 µM), 0,5 µL universal prob (10 µM), 0,3 µL DNA Polimeraz (5 U/µL) eklenmiş ve toplam hacim nükleaz içermeyen steril ddH₂O ile 30 µL hacime tamamlanarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. PCR şartları; 95 °C'de 5 dakika ve 40 döngü olacak şekilde 95 °C 30 saniye ve 50 °C'de 1 dakika şeklinde uygulanmıştır. Metot optimizasyon aşamasında 50 °C, 55 °C ve 60 °C olarak farklı yapışma sıcaklıkları denenmiş ama en iyi sonuç 50 °C'de elde edilmiştir. Unipleks Real Time PCR analizlerinde ise yapışma sıcaklığı 55 °C ve 60 °C'de iyi sonuçlar gözlenmiştir. Bununla beraber DNA, primer ve prob miktarları 0,5-1-1,5 µL olarak farklı miktarlarda denenmiş ve grup içinde yer alan patojen mikroorganizmalar için en iyi amplifikasyon sonucu 1 µL hacimde elde edilmiştir.

DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayısı bilinen DNA standartlarının doğrusal kalibrasyon eğrisi oluşturmak için logaritmik değerleri alınmıştır (Çizelge 4.14). Seyreltilen DNA standartları E^R1 olarak isinlendirilmiş ve seyreltme katsayısına göre ekler almıştır (E^R1 1X, E^R1:2X gibi).

Çizelge 4.14. E^R1 grubu için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilusyonu	Hedef Patojen	Ct	DNA	M.S. (x10 ⁴)
E ^R 1 1X	Cp	14,00	613,75	378
	Ef	-	-	-
	Sa	-	-	-
	Uni	10,95	1596,55	24800
E ^R 1 1:2X	Cp	15,94	306,88	189
	Ef	13,98	295,20	4430
	Sa	16,98	196,2	7800
	Uni	11,81	798,28	12400
E ^R 1 1:4X	Cp	17,09	153,44	94,5
	Ef	14,74	147,60	2210
	Sa	17,66	98,1	3900
	Uni	12,48	399,14	6210
E ^R 1 1:8X	Cp	19,25	76,72	47,3
	Ef	15,92	73,80	1110
	Sa	18,69	49,05	1950
	Uni	13,34	199,57	3100
E ^R 1 1:16X	Cp	19,85	38,36	23,6
	Ef	-	-	-
	Sa	-	24,52	975
	Uni	-	99,78	1550
E ^R 1 1:32X	Cp	20,69	19,18	11,8
	Ef	18,10	18,45	277
	Sa	20,51	12,26	488
	Uni	16,17	49,89	776
E ^R 1 1:64X	Cp	-	9,59	5,91
	Ef	18,93	9,23	138
	Sa	21,13	6,13	244
	Uni	17,65	24,95	388
M1 1:128X	Cp	23,97	4,80	2,95
	Ef	19,47	4,61	69,1
	Sa	22,63	3,07	122
	Uni	18,20	12,47	194
M1 1:256X	Cp	25,10	2,40	1,48
	Ef	21,41	2,31	34,6
	Sa	23,68	1,53	60,9
	Uni	19,67	6,24	97,0

-; Amplifikasyon sonucu başarılı olmayan, Ct değeri elde edilemeyen DNA standardı DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/mL)

Multipleks Real Time PCR analizleri 3 tekrarlı yapılmış, elde edilen bağımsız Ct değerlerinin ortalamaları alınarak kullanılmıştır. Bu grup içinde yer alan patojen mikroorganizmalar için hazırlanan seyreltilmiş DNA standartlarının analizlerinde 10 ile 25 amplifikasyon döngüleri arasında Ct değerleri elde edilmiştir. Ancak DNA standartlarının bazılarında hedef referans patojenlerin amplifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmemiş ve eşik değerine denk gelen amplifikasyon döngüleri (Ct) elde edilememiştir (Çizelge 4.14). *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenleri ve bu üç patojene ait toplam mikroorganizmalar için DNA konsantrasyonları ile Ct değerleri arasındaki ilişkiyi belirleyen kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve regresyon denklemleri ile korelasyon katsayıları belirlenmiştir.

DNA konsantrasyonları ve toplam mikroorganizma sayısı esas alınarak çizilen eğrilerin korelasyon katsayıları Şekil 4.46 ve 4.47' de gösterilmiştir. Bu değerler metodun hassasiyetinin göstermektedir. Metodun dinamik aralığı *C. perfringens* için 2,40-613,75 ng/μL ($1,48 \times 10^4$ - $3,78 \times 10^6$ kob/mL), *E. faecalis* için 2,31-295,20 ng/μL ($3,46 \times 10^5$ - $4,43 \times 10^7$ kob/mL) ve *S. aureus* için 1,53-196,2 ng/μL ($6,09 \times 10^5$ - $7,80 \times 10^7$ kob/mL) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 6,24-1596,55 ng/μL ($9,70 \times 10^5$ - $2,48 \times 10^8$ kob/mL) ise toplam mikroorganizma yükü (Universal bölge için) için belirlenen limitlerdir.

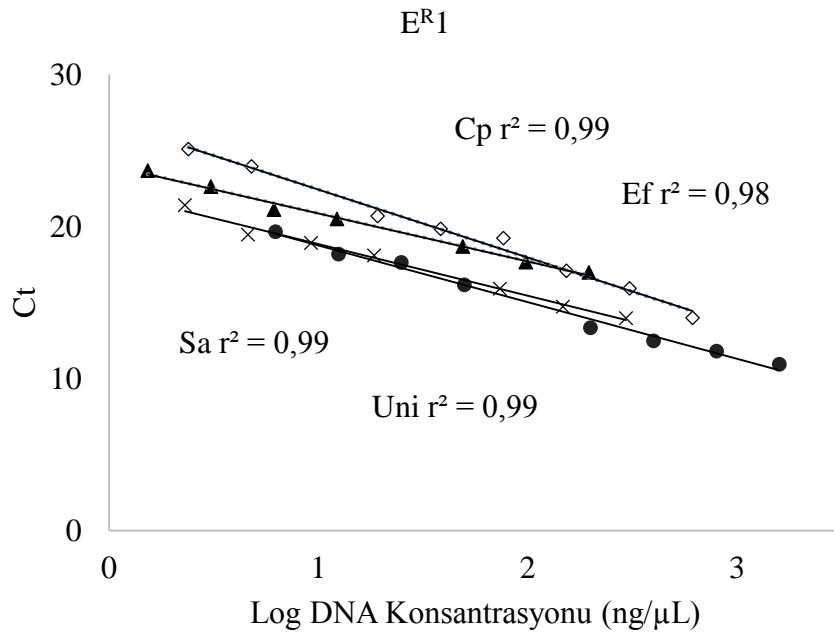
DNA konsantrasyonu bazında regresyon denklemleri *C. perfringens* (y: $-4,4715x + 26,907$), *E. faecalis* (y: $-3,3967x + 22,246$) ve *S. aureus* (y: $-3,1604x + 24,031$) patojen mikroorganizmaları için ve universal bölge için (y: $-3,7221x + 22,475$) regresyon analizleri ile belirlenmiştir.

Mikroorganizma sayısı bazında regresyon denklemleri ise *C. perfringens* (y: $-4,4715x + 43,851$), *E. faecalis* (y: $-3,3967x + 39,827$) ve *S. aureus* (y: $-3,1604x + 41,728$) patojen mikroorganizmaları için ve universal bölge için (y: $-3,7221x + 41,8$) yine regresyon analizleri ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak E^{R1} grubu içerisinde yer alan *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojen mikroorganizmaları ve toplam mikroorganizma sayısını belirleyen universal bölge ile 0,99 hassasiyete sahip, yeni, güncel, hassas ve dinamik aralığı geniş bir E^{R1} Multipleks Real Time PCR amplifikasyon kiti geliştirilmiştir.

C. perfringens, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojen mikroorganizmaları için daha önceden geliştirilmiş Multipleks Real Time PCR protokollerine rastlanmamıştır. E^{R1} metodu *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerini eş zamanlı olarak belirleyebilen

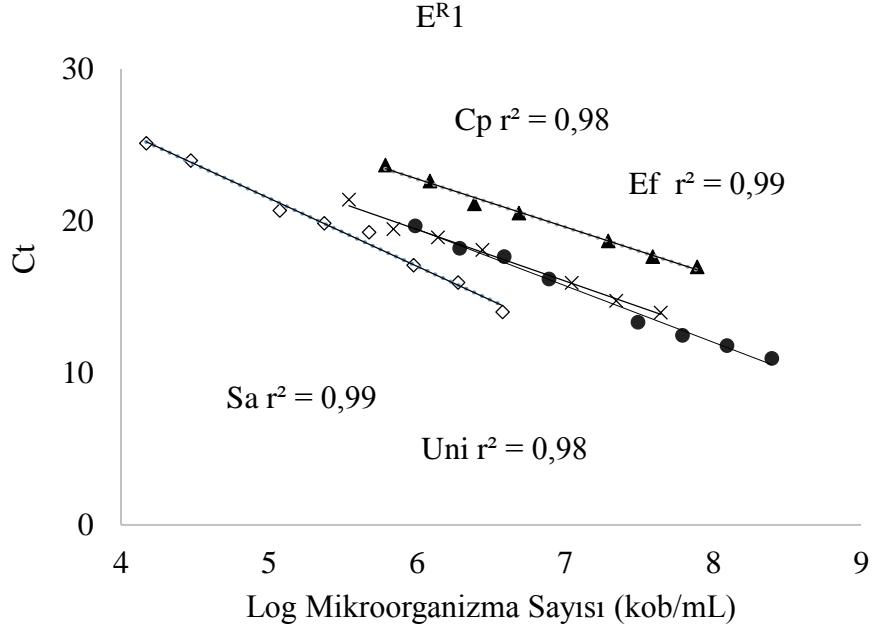
yeni Multipleks Real Time PCR metodu özelliği taşımaktadır. Ayrıca *E. faecalis* için tanımlanmış tekli Real Time PCR protokolüde sunulmamıştır.

C. perfringens patojeni için yapılan çoklu analizlerde ise genellikle alfa (*cpa* veya *plc*), beta (*cpb*), iota (*ia*), epsilon (*etx*), beta2 (*cpb2*) gibi toksin genleri ve enterotoksin geni (*cpe*) tanımlanmıştır (Albini ve ark., 2008; Grant ve ark., 2008; Gurjar ve ark., 2008; Wang ve ark., 2011). Bu çalışmada ise *C. perfringens* mikrobiyal patojeni *plc* (*cpa*) geninin amplifikasyonu ile tanımlanmıştır.



Şekil 4.46. E^{R1} grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki. \diamond : Cp, \times : Ef \blacktriangle : Sa, \bullet : Uni kalibrasyon eğrileri

S. aureus mikrobiyal patojeni *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus* ve *Vibrio parahaemolyticus* gibi gıda patojenleri ile birlikte eş zamanlı olarak karakterize edilmiştir (Elizaquivel ve Aznar, 2008; Cheng ve ark., 2012; Ma ve ark., 2014). Bu uygulamalarda *Sa422*, *SAOUHSC_02297* ve *nuc* geni tanımlamada amplifiye edilen hedef bölgelerdir. *S. aureus* patojeni için yeni bir Multipleks Real Time PCR uygulaması geliştirilmiştir (Cheng ve ark., 2012). Yöntemde oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı (0,99) bu çalışmanın hassasiyeti (0,99) ile aynı olduğu görülmüştür. Diğer Multipleks Real Time PCR uygulamaları ise genellikle bu mikroorganizmanın metisiline direnç geni üzerine yapılmış çalışmalardır (Gillespie ve Oliver, 2005; Kilic ve ark., 2010; Fosheim ve ark., 2011).



Şekil 4.47. E^R1 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki. . ◇: Cp, ×: Ef ▲: Sa, ●: Uni kalibrasyon eğrileri

4.2.2.2. E^R2 grubu için Multipleks Real Time PCR

İzole edilen referans patojen DNA'ları seyreltilerek DNA standartları oluşturulmuş ve hedef genlere spesifik primer ve prob (Çizelge 3.4) ile Real Time PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. *C. jejuni* patojen mikroorganizması için Multipleks Real Time PCR amplifikasyonlarında istenilen sonuçlar elde edilememiş ve dolayısı ile E^R2 grubuna dahil edilememiştir. E^R2 protokolünde, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenlerinin her biri için 1 µL DNA, 1 µL ileri primeri (10 µM), 1 µL geri primeri (10 µM), 1 µL prob (10 µM) kullanılmıştır. Diğer PCR bileşenleri ise 3 µL PCR buffer (10X), 3 µL dNTP (2 mM), 0,5 µL universal ileri primeri (10 µM), 0,5 µL universal geri primeri (10 µM), 0,5 µL universal prob (10 µM), 1 µL DNA, 0,3 µL DNA Polimeraz (5 U/µL) içermekte ve toplam hacim nükleaz içermeyen steril ddH₂O ile 30 µL tamamlanmıştır. PCR koşulları; 95 °C'de 5 dakika ve 45 döngü, 95 °C 30 saniye ve 55 °C'de 1 dakika olarak belirlenmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için yeni ve güncel bir E^R2 Multipleks Real Time PCR kiti geliştirilmiştir.

Metot optimizasyon aşamasında hibridizasyon sıcaklıkları 50 °C, 55 °C ve 60 °C olarak farklı yapışma sıcaklıkları denenmiş ama en optimum sonuç 55°C'de elde edilmiştir. Bununla beraber DNA, primer ve prob miktarları 0,5-1-1,5 µL olarak farklı miktarlarda denenmiş ve 1 µL en iyi sonuç verdiği için tercih edilmiştir. Seyreltilmiş DNA'ların

belirlenen Real Time PCR koşullarında analiz edilmesi ile elde edilen Ct değerleri ve DNA konsantrasyonlarına karşılık gelen mikroorganizma sayıları Çizelge 4.15’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.15. E^R2 grubu için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

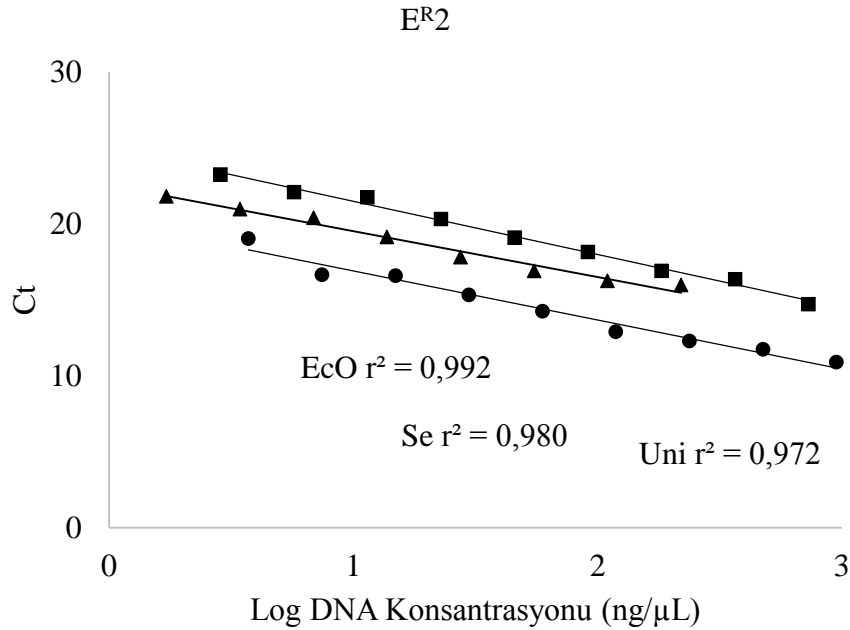
DNA Dilusyonu	Hedef Patojen	Ct	DNA	M.S. (x10 ⁵)
E ^R 2 1X	EcO	14,72	732,50	790
	Se	15,97	220,00	430
	Uni	10,91	952,50	1200
E ^R 2 1:2X	EcO	16,36	366,25	390
	Se	16,25	110,00	220
	Uni	11,74	476,25	610
E ^R 2 1:4X	EcO	16,90	183,13	200
	Se	16,92	55,00	110
	Uni	12,30	238,13	300
E ^R 2 1:8X	EcO	18,16	91,56	98
	Se	17,81	27,50	54
	Uni	12,90	119,06	150
E ^R 2 1:16X	EcO	19,10	45,78	49
	Se	19,13	13,75	27
	Uni	14,26	59,53	76
E ^R 2 1:32X	EcO	20,32	22,89	25
	Se	20,40	6,88	14
	Uni	15,33	29,77	38
E ^R 2 1:64X	EcO	21,75	11,45	12
	Se	20,98	3,44	6,8
	Uni	16,59	14,88	19
E ^R 2 1:128X	EcO	22,09	5,72	6,1
	Se	21,82	1,72	3,4
	Uni	16,66	7,44	9,5
E ^R 2 1:256X	EcO	23,26	2,86	3,1
	Se	23,15	0,86	1,7
	Uni	19,04	3,72	4,8

DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/mL)

E. coli O157:H7 ve *S. enterica* patojen mikroorganizmalarının DNA konsantrasyonu, mikroorganizma sayıları ve analiz sonrası elde edilen Ct değerleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla iki değişkenli regresyon analizi yapılmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.48 ve 4.49). Aynı zamanda Real Time PCR analizlerinde bu patojen mikroorganizmaların hedef bölgeleri dışında universal 16S rRNA hedef bölgesi de analiz

edilmiş ve toplam mikroorganizma yükü ve buna bağlı olarak toplam mikroorganizma sayısı ile karşılık gelen Ct değerleri arasındaki ilişki belirlenmiştir.

Her üç hedef bölge içinde korelasyon katsayısı ile *E. coli* O157:H7, *S. enterica* ve mikroorganizma yükünü kalitatif ve kantitatif olarak tanımlayabilen yeni bir Multiplex Real Time PCR stratejisi geliştirilmiştir. Geliştirilen metodun dinamik aralığı; *E. coli* O157:H7 için 2,86-732,50 ng/μL ($3,1 \times 10^5$ - $7,9 \times 10^7$ kob/mL), *S. enterica* için 1,72-220,00 ng/μL ($3,4 \times 10^5$ - $4,3 \times 10^7$ kob/mL) ve toplam mikroorganizma yükü için ise 3,72-952,50 ng/μL ($4,8 \times 10^5$ - $1,2 \times 10^8$ kob/mL) olarak tespit edilmiştir. İki hedef patojen mikroorganizmanın ve Universal bölge için DNA konsantrasyonu bazında regresyon denklemleri ise; *E. coli* O157:H7 için $y: -3,4994x + 24,996$, *S. enterica* için $y: -3,0195x + 22,552$ ve toplam mikrobiyal yük için $y: -3,227x + 20,141$ şeklinde hesaplanmıştır. Toplam mikroorganizma yükü bazında regresyon denklemleri ise; *E. coli* O157:H7 için $y: -3,4994x + 42,602$, *S. enterica* için $y: -3,0195x + 38,534$ ve toplam mikrobiyal yük için $y: -3,227x + 36,622$ şeklinde hesaplanmıştır.

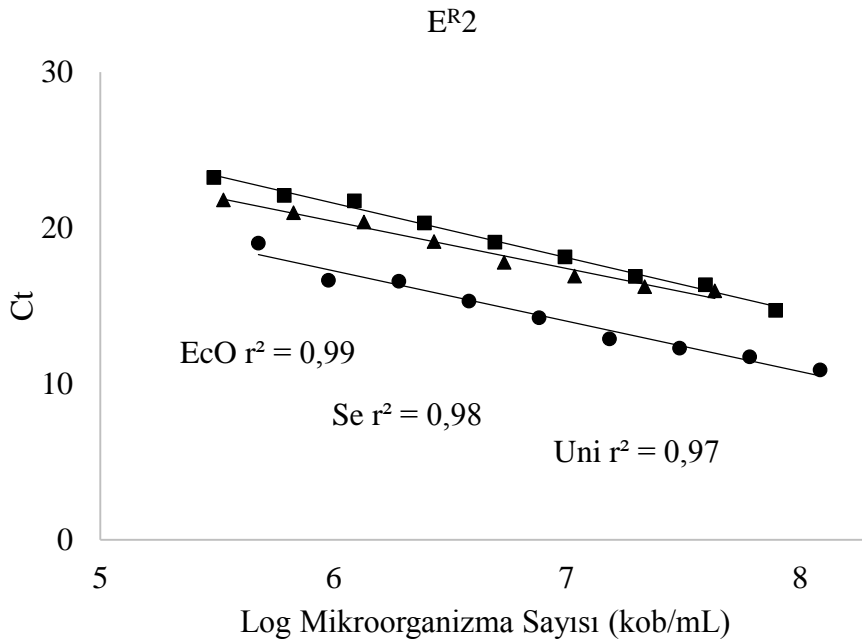


Şekil 4.48. E^R2 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki. ■: EcO, ▲: Se, ●: Uni kalibrasyon eğrileri

E. coli O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. enterica* patojen mikroorganizmaları eş zamanlı olarak tanımlayan yeni bir Multiplex Real Time PCR protokolü oluşturulmuştur. Bu protokolde *E. coli* O157:H7 için *invA* ve *S. enterica* için *fbE* hedef genlerinin ikisi de

0,99 hassasiyet ile karakterize edilmiştir (Suo ve ark., 2010). Bu çalışmada da *E. coli* O157:H7 için *stx2* geni ve *S. enterica* için *ttr* geni sırasıyla 0,99 ve 0,98 hassasiyet ile tanımlanmıştır. Çalışmalar birbirleri ile benzerlik göstermektedir.

E. coli O157:H7 ve *S. enterica* mikrobiyal patojenleri gıda kaynaklı patojenler içerisinde yaygın olarak bilinen patojenlerdir. Bu patojenler birçok Multipleks Real Time PCR uygulamalarında tanımlanmıştır (Omiccioli ve ark., 2009; Kawasaki ve ark., 2010; Suo ve ark., 2010; Elizaquível ve ark., 2012). Bu çalışmada *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojen mikroorganizmaların eş zamanlı tanımlaması yapılmıştır. Literatür çalışmalarda bu patojenlere (*E. coli* O157:H7 ve *S. enterica*) ilaveten genellikle *L. monocytogenes* patojeni de karakterize edilmiştir. Sadece *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* identifikasyonu yapılan yeni bir protokole rastlanmamıştır.



Şekil 4.49. ER2 grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki. ■: EcO, ▲: Se, ●: Uni kalibrasyon eğrileri

4.2.2.3. ER3 grubu için Multipleks Real Time PCR

Farklı primer, DNA konsantrasyonları ve PCR koşullarında farklılıklar denenerek en uygun konsantrasyon ve koşullar Multipleks Real Tim PCR için belirlenmiştir. Her bir patojen için 1'er µL DNA, 1'er µL ileri primeri (10 µM), 1'er µL geri primeri (10 µM), 1'er µL prob (10 µM) kullanılmıştır. Ayrıca, 3 µL PCR buffer (10X), 3 µL dNTP (2 mM), 0,5 µL universal ileri primeri (10 µM), 0,5 µL universal geri primeri (10 µM), 0,5 µL universal prob

(10 µM), 1 µL DNA, 0,3 µL Taq DNA Polymeraz (5 U/µL) eklenmiş ve nükleaz içermeyen steril H₂O ile 30 µL tamamlanarak yapılmıştır. PCR şartları ise 95 °C'de 5 dakika ve 40 döngü, 95 °C 30 saniye ve 50 °C'de 1 dakika şeklinde yapılmıştır. Amplifikasyonlar sonucunda *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen bakterilerin yer aldığı E^{R3} grubu için yeni bir Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirilmiştir.

E^{R3} grubu içerisinde yer alan patojen mikroorganizmalara ait DNA'ları izole edilmiş ve elde edilen DNA'dan seri dilusyonlar hazırlanmıştır. Bu seyreltilmiş DNA'lar çizilecek kalibrasyon eğrisinin noktalarını oluşturmaktadır. Hazırlanan seyreltilmiş DNA'lar E^{R3} grubu için belirlenen PCR şartlarında analiz edilmiş ve elde edilen veriler değerlendirilmiştir. E^{R3} grubu içerisinde yer alan patojen mikroorganizmalara ait DNA konsantrasyonu, mikroorganizma sayıları ve analizler sonrası elde edilen Ct değerleri Çizelge 4. 16'da belirtilmiştir.

Seyreltilmiş DNA'ların analizi sonucunda amplifikasyonlar ve kalibrasyon eğrisi incelenmiş, amplifikasyonu düzgün olmayan ve kalibrasyon eğrisinde tercih edilen alanın dışında kalan noktalar çıkarılmıştır. Böylece elde edilen kalibrasyon eğrileri her patojen mikroorganizma ve universal bölge için farklı sayıda noktalardan oluşmuş ve farklı korelasyon katsayıları ile temsil edilmiştir (Şekil 4.50 ve 4.51). E^{R3} grubu için geliştirilen bu yeni metot geniş dinamik aralıkları sahiptir. *B. melitensis* 0,81-104,20 ng/µL ($2,7 \times 10^6$ - $3,4 \times 10^8$ kob/mL), *C. sakazakii* 2,40-307,70 ng/µL ($2,4 \times 10^5$ - $3,1 \times 10^7$ kob/mL), *L. monocytogenes* 2,27-290,20 ng/µL ($7,4 \times 10^5$ - $9,5 \times 10^7$ kob/mL) ve toplam mikroorganizma yükü için ise 5,49-702,10 ng/µL ($3,6 \times 10^6$ - $4,7 \times 10^8$ kob/mL) metodun dinamik aralıklarıdır. Hedef genlerin amplifikasyonu sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon denklemleri DNA konsantrasyonu bazında; *B. melitensis* (y: $-4,4843x + 26,006$), *C. sakazakii* (y: $-5,6228x + 25,988$), *L. monocytogenes* (y: $-4,461x + 25,437$) ve toplam mikroorganizma yükü için (y: $-4,1728x + 22,964$) belirlenmiştir. Mikroorganizma sayısı bazında ise; *B. melitensis* (y: $-4,4843x + 54,825$), *C. sakazakii* (y: $-5,6228x + 54,144$), *L. monocytogenes* (y: $-4,461x + 50,03$) ve toplam mikroorganizma yükü için (y: $-4,1728x + 47,256$) tespit edilmiştir.

Sonuç olarak *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojenleri ve toplam mikroorganizmalar için DNA konsantrasyonu ve mikrobiyal yükler ile Ct değerleri arasındaki ilişki oluşturulan kalibrasyon eğrileri ile belirlenmiştir. Korelasyon katsayıları E^{R3} grubuna yer alan patojenleri karakterize etmek için oluşturulan metodun hassasiyetini göstermiştir. Böylece bu patojen mikroorganizmalar ve toplam mikroorganizmaları

kantitatif olarak tanımlayabilen güncel, yeni, özgül bir Multipleks Real Time PCR metodu oluşturulmuştur.

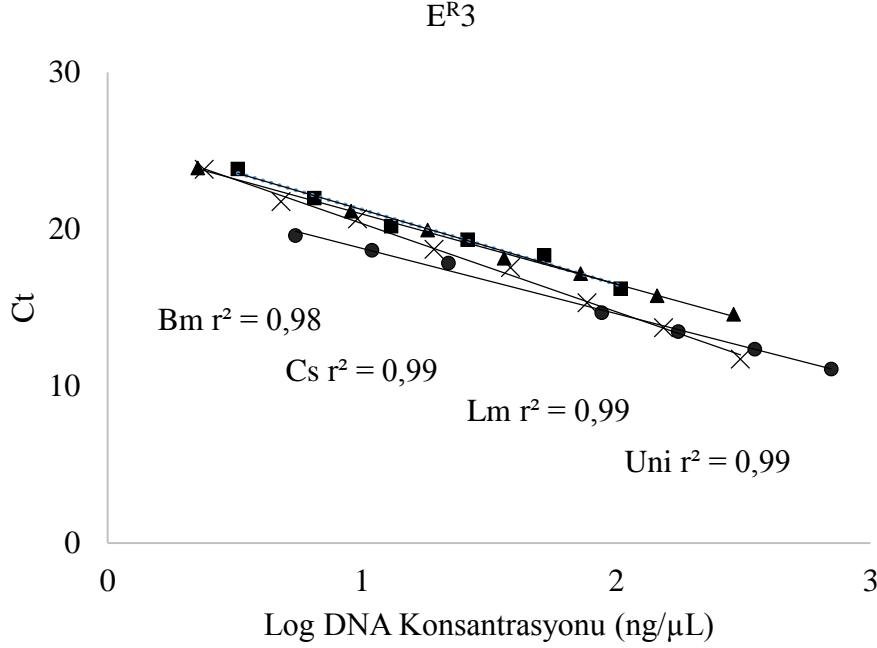
Çizelge 4.16. E^{R3} grubu için standart DNA dilusyonları ve amplifikasyon sonucu elde edilen değerler

DNA Dilusyonu	Hedef Patojen	Ct	DNA	M.S. (x10 ⁵)
E ^{R3} 1X	Bm	16,21	104,20	3400
	Cs	11,74	307,70	310
	Lm	14,58	290,20	950
	Uni	11,10	702,10	4700
E ^{R3} 1:2X	Bm	18,35	52,10	1700
	Cs	13,73	153,85	160
	Lm	15,76	145,10	470
	Uni	12,36	351,05	2300
E ^{R3} 1:4X	Bm	19,35	26,05	850
	Cs	15,32	76,93	78
	Lm	17,19	72,55	240
	Uni	13,48	175,53	1200
E ^{R3} 1:8X	Bm	20,21	13,02	420
	Cs	17,57	38,46	39
	Lm	18,15	36,28	120
	Uni	14,70	87,76	580
E ^{R3} 1:16X	Bm	22,00	6,51	210
	Cs	18,74	19,23	20
	Lm	19,95	18,14	59
	Uni		43,88	290
E ^{R3} 1:32X	Bm	23,86	3,26	110
	Cs	20,67	9,62	9,8
	Lm	21,15	9,07	30
	Uni	17,85	21,94	150
E ^{R3} 1:64X	Bm	-	1,63	53
	Cs	21,78	4,81	4,9
	Lm	-	4,53	15
	Uni	18,66	10,97	73
E ^{R3} 1:128X	Bm	25,71	0,81	27
	Cs	23,84	2,40	2,4
	Lm	23,92	2,27	7,4
	Uni	19,60	5,49	36

-: Amplifikasyon sonucu başarılı olmayan, Ct değeri elde edilemeyen DNA standardı, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/mL)

B. melitensis, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmalarını eş zamanlı olarak tanımlayabilen herhangi bir Multipleks Real Time PCR metodu bulunmamıştır. E^{R3} metodu bu özelliği ile *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* mikrobiyal patojenlerini eş zamanlı kalitatif ve kantitatif olarak belirleyebilen ilk Multipleks Real Time PCR metodu olduğu görülmüştür. *B. melitensis* patojeni ile ilgili Multipleks Real

Time PCR uygulamaları sınırlı olmakla birlikte genellikle klinik örneklerde *Brucella* türleri arasında uygulanmıştır (Probert ve ark., 2004; Queipo-Ortuno ve ark., 2009; Sidor ve ark., 2013). Aynı şekilde *C. sakazakii* mikrobiyal patojen için pek fazla Multipleks Real Time PCR metoduna rastlanmamıştır. *C. sakazakii* ve *S. enterica* patojenleri internal kontrol varlığında eş zamanlı olarak yeni bir Multipleks Real Time PCR metodu ile belirlenmiştir.

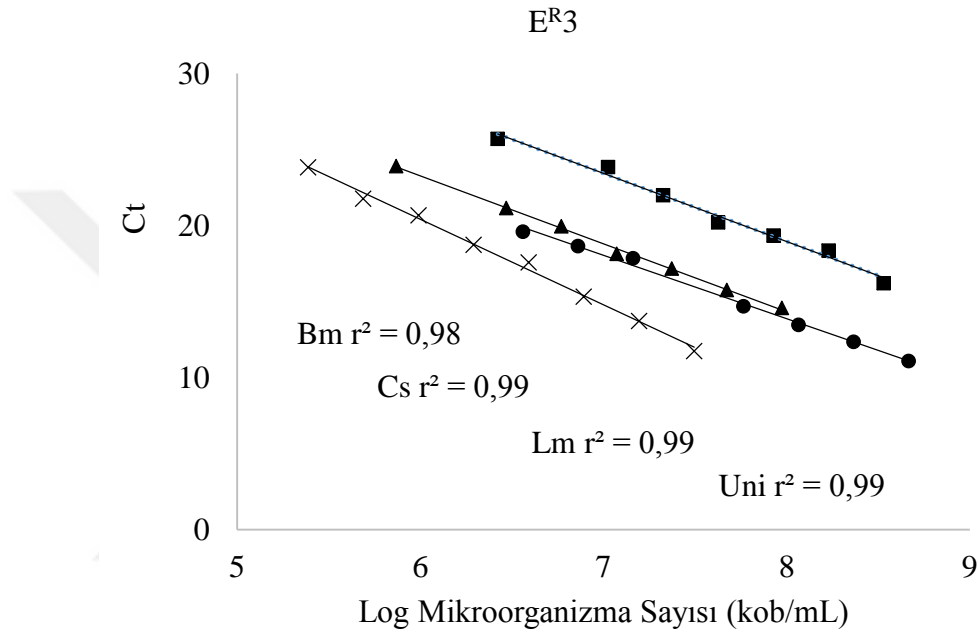


Şekil 4.50. E^{R3} grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik DNA konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişki. ■: Bm, ×: Cs, ▲: Lm, ●: Uni kalibrasyon eğrileri

C. sakazakii patojeninin kantitatif analiz için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin dinamik aralıkları 10^3 - 10^8 kob/mL aralığında değişkenlik göstermiştir (Hyeon ve ark., 2010). Bu çalışmada olduğu gibi *mms* geninin amplifiye edilmesi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,99 olarak tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* mikrobiyal patojeni ise Multipleks Real Time PCR ile en çok tanımlanan gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Genellikle *S. enterica* ve *E. coli* O157:H7 patojen mikroorganizmaları ile birlikte tanımlanan *L. monocytogenes* patojeninin *Listeria* türleri ile de eş zamanlı olarak tanımlanmıştır (Hein ve ark., 2001; Rodríguez-Lázaro ve ark., 2004; Omiccioli ve ark., 2009; Suo ve ark., 2010; Ruiz-Rueda ve ark., 2011; Garrido ve ark., 2013).

Bu çalışmada olduğu gibi birçok çalışmada *hly* geni amplifiye edilen hedef bölge olarak belirlenmiştir (Omiccioli ve ark., 2009; Suo ve ark., 2010; Ruiz-Rueda ve ark., 2011;

Garrido ve ark., 2013). *hly* virülans geninin amplifikasyonuna bağlı olarak *L. monocytogenes* patojeninde yer aldığı yeni bir Multipleks Real Time PCR protokolü geliştirilmiştir. Bu protokolda *L. monocytogenes* için 10^1 - 10^8 kob/mL dinamik aralığında 0,998 hassasiyet ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Zhang ve ark., 2015). Bu çalışmada ise farklı dinamik aralığında 0,99 hassasiyet ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Farklı bir çalışmada ise 10^0 - 10^6 hücre/reaksiyon aralığında ve 0,99 korelasyon katsayısı ile *L. monocytogenes* patojeni kantitatif olarak analiz edilmiştir (Elizaquível ve ark., 2011).



Şekil 4.51. E^{R3} grubu için oluşturulan çoklu kalibrasyon eğrisi. Eşik döngü değerine (Ct) karşı logaritmik mikroorganizma sayısı arasındaki doğrusal ilişki. ■: Bm, ×: Cs, ▲: Lm, ●: Uni kalibrasyon eğrileri

4.2.2.4. E^{R4} grubu için Multipleks Real Time PCR

E^{R4} grubunda bulunan *A. hydrophila*, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojen mikroorganizmaları için Multipleks Real Time PCR protokolü oluşturmak amaçlanmıştır. Ancak *A. hydrophila* ve *B. cereus* patojenleri Unipleks Real Time PCR analizleri ile amplifiye edilememiştir. Bu patojenler için farklı PCR koşulları denenmiş, farklı primer ve problemler kullanılarak analizler tekrarlanmış ama sonuç değişmemiştir. Bu nedenle E^{R4} grubu sadece *K. pneumoniae* mikroorganizmasını içermektedir ve Bulgular ve Tartışma 4.2.1.8 kısmındaki *K. pneumoniae* için belirlenen Unipleks Real Time PCR protokolü E^{R4} grubu için geçerli olmaktadır.

4.3. Oluşturulan Moleküler Metotların Gıda Örneklerinde Uygulanabilirliğinin Araştırılması

İnsanlarda hastalığa neden olan yüksek risk potansiyeline sahip çoğu patojen mikroorganizma gıdalar aracılığı ile vücuda alınmaktadır. Bitkide, hayvanda, toprakta veya suda bulunabilen patojenler gıdaların üretim ve işleme sürecinde gıdalara bulaşarak mikrobiyal kontaminasyon oluşturabilmekte ve bu gıda ürünlerinin tüketilmesi ile de insanlarda hastalığa neden olabilmektedir. Kontamine olan gıdalar et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, deniz ürünleri ve taze sebze ve meyveler gibi gıda ürünlerini içermektedir (Nannapaneni, 2012). Patojenlerin zor çevre koşullarında bile kendilerine özgü adaptasyon mekanizmalarına sahip olmaları, insan popülasyonlarındaki artış, yaşam tarzındaki değişiklikler, gıda temininin küreselleşmesi ve yeni coğrafik alanlara patojenlerin yayılması mikrobiyal patojenlerin hastalık oluşturmaya katkıda bulunan en önemli etkenlerdir (Oyarzabal, 2012). Gıdalarda mikrobiyal patojenlerin varlığı gıda güvenliği ve kalitesi yönünden büyük sorun oluşturduğu için gıda zincirinin her aşamasında potansiyel problemlerin belirlenmesi ve önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu nedenle gıdaların basit, güvenilir yöntemler ile analiz edilmesi ihtiyacı oluşmaktadır. Ayrıca mikrobiyal kontaminasyonda filogenetik olarak yakın ilişkili suşları ayırt edebilmek, doğru tanımlamak ve çeşitli patojenik suşları tespit edebilmek analiz yönteminde aranan özellikler arasında yer almaktadır (Nannapaneni, 2012).

Moleküler teknikler gıdalarda bulunan patojenleri teşhis etmek ve mikrobiyal kontaminasyon derecelerini belirleyebilmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin hibridasyonuna dayalı olan bu metotlar içinde en çok uygulanan teknikler ise yüksek duyarlılığı ve çok yönlülüğü ile PCR bazlı tekniklerdir. Çalışmanın bu kısmında geliştirilen bu protokollerin gıda örneklerinde uygulanabilirliği araştırılmış ve aynı zamanda patojen mikroorganizmaların gıdalardaki potansiyelleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, E1 ve E2 grubunda bulunan mikroorganizmalar için gıda grubu olarak et ve et ürünleri belirlenmiş ve bu gruptan ise sığır, koyun ve tavuk eti örnekleri analiz edilmek üzere seçilmiştir. E3 grubunda yer alan mikroorganizmalar için süt ve süt ürünleri grubundan süt ve peynir örnekleri tercih edilmiştir. E4 grubu içerisinde planlanan üç mikroorganizmanın bir tanesi (*K. pneumoniae*) tanımlanabildiği için toplanan su örneklerinde sadece *K. pneumoniae* varlığı ve mikrobiyal yükü belirlenmiştir. Toplanan gıda örneklerinin Materyal ve Metot 3.5’de ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi izolasyonları yapılmış ve izole edilen

kromozomal DNA'lar yeni oluşturulan Multipleks Konvansiyonel PCR ve Multipleks Real Time PCR metotları ile analiz edilmiştir.

4.3.1. Et ve et ürünlerinde patojen varlığının geliştirilen E^M1-2 ve E^R1-2 protokolleri ile belirlenmesi

E^M1-2 ve E^R1-2 protokolleri et ve et ürünlerinde hedef mikrobiyal patojenleri tanımlamak ve mikroorganizma yükünü belirlemek için geliştirilmiştir. Geliştirilen bu manuel (E^M1-2) ve Real Time (E^R1-2) PCR metotları toplanan koyun, sığır ve tavuk eti numunelerinde kullanılarak patojen mikroorganizmaların (*C. perfringens*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica*) varlığı tespit edilmiştir. Et numunelerinden alınan laboratuvar örnekleri (1 gr) zenginleştirilerek toplam kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri kalıp DNA olarak kullanılarak E^M1-2 ve E^R1-2 PCR protokolleri (Bulgular Tartışma 4.1.3.1- 4.1.3.2 ve 4.2.2.1- 4.2.2.2 belirtildiği gibi) ile analiz edilmiştir. E^R1-2 Multipleks Real Time PCR analizlerinin ardından cihazın yazılımı aracılığı ile elde edilen Ct değerleri daha önce oluşturulan metotların kalibrasyon eğrileri çizilerek elde edilen regresyon denkleminde kullanılarak mikrobiyal yükleri belirlenmiştir. Ayrıca internal kontrol olarak kullanılan universal 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu ile de PCR koşullarının doğruluğu teyit edilmiştir.

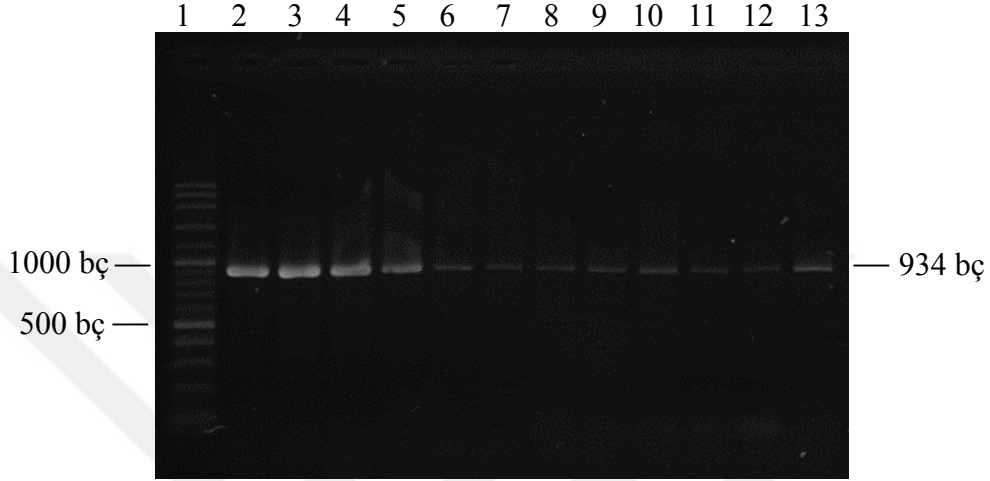
E^R1 protokolü ile mikrobiyal yük için regresyon denklemleri *C. perfringens* y: -4,4715x + 43,851, *E. faecalis* y: -3,3967x + 39,827 ve *S. aureus* y: -3,1604x + 41,728 olarak tespit edilmiştir. E^R2 protokolü için ise *E. coli* O157:H7 y: -3,4994x + 42,602 ve *S. enterica* y: -3,0195x + 38,534 regresyon denklemleri belirlenmiştir. Analiz sonuçlarından elde edilen Ct değerleri (y) denklemlerde yerine koyularak mikroorganizma sayıları (x) belirlenmiştir.

4.3.1.1. Koyun eti numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E^M1-2 ve E^R1-2 protokolleri ile belirlenmesi

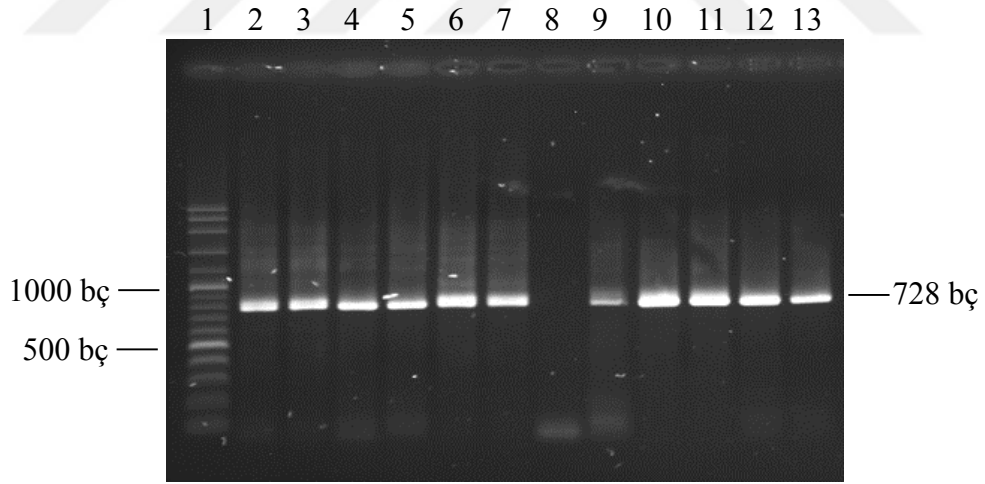
E^M1 ve E^M2 protokolleri ile belirlenmesi

Koyun eti numunelerinde E^M1 ve E^M2 protokolleri ile manuel PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonuçları incelendiğinde beklenen patojenlere özgü bant uzunlukları dışında spesifik olmayan PCR ürünleri gözlenmiştir. Patojen mikroorganizmalara özgü primerlerin koyun eti numunelerinde özgünlüğünü kontrol etmek ve gıda örneklerindeki varlığını belirlemek amacıyla unipleks PCR analizleri yapılmıştır. Analiz edilen koyun eti numunelerinde *C. perfringens*, *S. aureus* (E^M1 grubu) ve *E. coli*

O157:H7 (E^M2 grubu) patojenlerinin varlığı unipleks reaksiyonlar ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (Şekil 4.52-4.53-4.54). Ancak *E. faecalis* (E^M1 grubu) ve *S. enterica* (E^M2 grubu) mikrobiyal patojenlerinin tekli PCR analizlerinde çok sayıda amplifikasyon ürünü gözlenmiştir (Şekil 4.55-4.56). Gıda örneklerinin karışık matrisi ve *E. faecalis* ve *S. enterica* özgü primerlerin yeterince özgün olmaması beklenmeyen amplifikasyon ürünlerinin oluşmasına sebep olabilir.



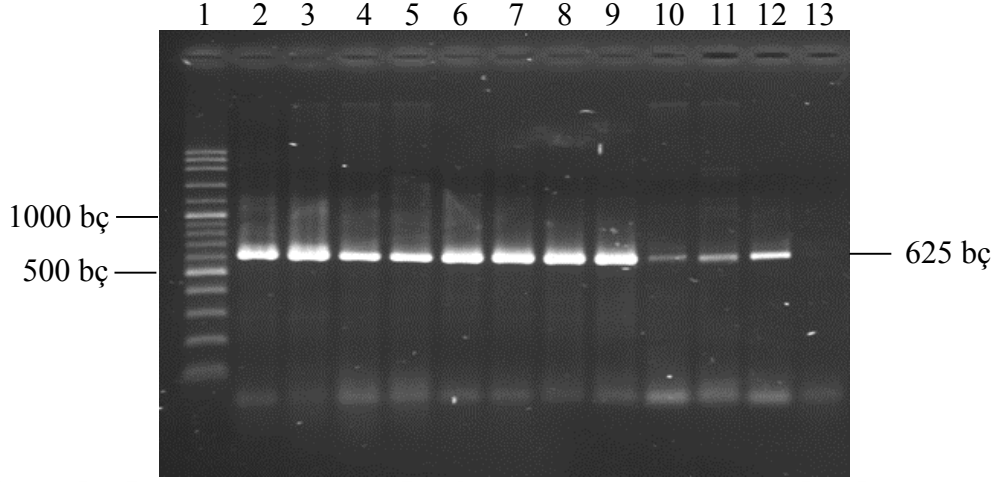
Şekil 4.52. *C. perfringens* (934 bç) patojen mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Koyun eti örnekleri



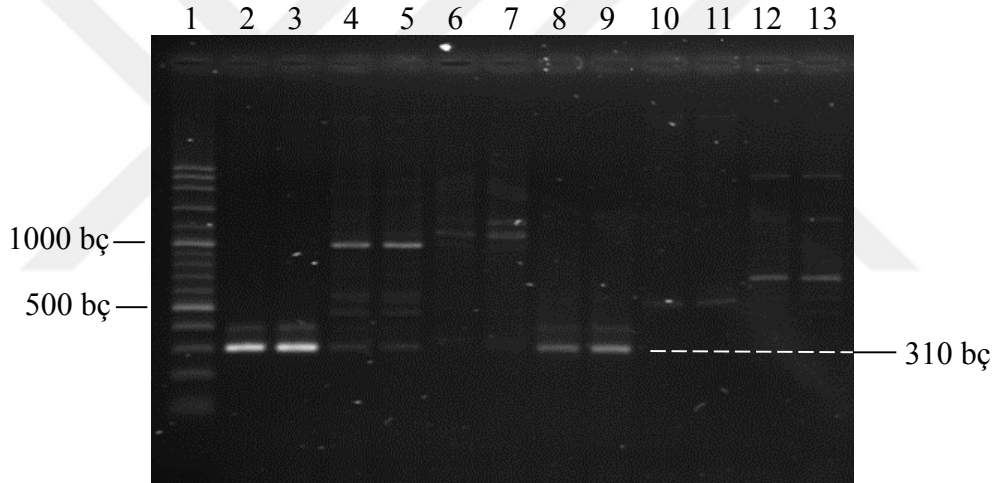
Şekil 4.53. *S. aureus* (728 bç) patojen mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Koyun eti örnekleri

Sonuç olarak koyun eti numunelerinde E^M1 ve E^M2 Multipleks PCR protokollerinin uygulanabilirliği sınırlı kalmış ve hedef patojenlerin varlığı (*E. faecalis* ve *S. enterica* hariç) Unipleks PCR analizleri ile belirlenmiştir. Tekli PCR ile analiz edilen toplam 41 adet koyun eti numunesinin 40 örneğinde *C. perfringens* patojeni, 39 örneğinde *S. aureus* patojeni ve 41 örneğinde *E. coli* O157:H7 patojeni tespit edilmiştir. Sonuçların bir kısmı Şekil 4.52, Şekil

4.53 ve Şekil 4. 54'de gösterilmiştir. Koyun eti numunelerinin patojenlerin varlığı ile kontamine olmuş gıda ürünü olduğu ve potansiyel tehlike oluşturduğu görülmüştür.



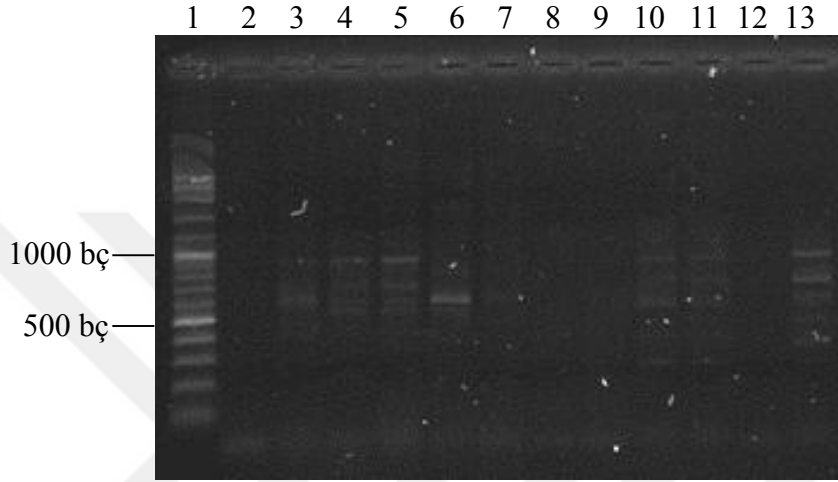
Şekil 4.54. *E. coli* O157:H7 (625 bç) mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Koyun eti örnekleri



Şekil 4.55. *E. faecalis* (310 bç) patojen mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Koyun eti örnekleri

Hedeflenen E^M1 grubuna özgü patojenlerin Multipleks PCR ile eş zamanlı olarak tanımlanması ve gıda numunelerinde mikrobiyal yüklerinin belirlenmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *C. perfringens* mikrobiyal patojeni ile ilgili Multipleks çalışmalar fazla olmamakla birlikte genellikle bu patojenin toksin ve enterotoksin genleri üzerine yapılmıştır. Tavuk, tay, domuz ve kuzu gibi hayvanlardan ve insanlardan elde edilen izolatlar ile alfa, beta, epsilon ve iota toksin genlerinin identifikasyonu yapılarak izolatlarda toksigenik tiplendirme yapılmıştır (Meer ve Songer, 1997; Yoo ve ark., 1997; Kanakaraj ve ark., 1998; Garmory ve ark., 2000; Baums ve ark., 2004).

E. faecalis için yapılan Multipleks PCR çalışmalarında ise genellikle klinik izolatlarda enterokokların *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3* gibi vankomisine direnç genleri araştırılmıştır (Patel ve ark., 1997; Kariyama ve ark., 2000). Bununla birlikte klinik izolatlarda *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *S. aureus* ve *S. epidermidis* mikroorganizmalarının *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *ddl* ve *nuc* gibi spesifik genler ile tür seviyesinde tanımlamaları yapılarak glikopeptid dirençli genleri belirlenmiştir (Depardieu ve ark., 2004).



Şekil 4.56. *S. enterica* (403 bç) mikroorganizmasının koyun eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Koyun eti örnekleri

E^{M2} grubunun hedef patojenleri *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp. patojen mikroorganizmaları multipleks PCR ile belirlenmiştir (Gilbert ve ark., 2003; Park ve ark., 2011; Sjöling ark., 2015). Bu hedef patojenler 159 bç (*C. jejuni*), 252 bç (*E. coli* O157:H7) ve 360 bç (*Salmonella* spp.) uzunluğundaki amplikonlarla üçlü PCR ile tanımlanmış ve yeni bir Multipleks PCR protokolü oluşturulmuştur. Protokol etler (domuz, kıyama, hindi ve pişmiş tavuk göğsü dilimleri), meyveler (kavun, üzüm, karpuz ve çilek), sebzeler (marul, havuç, brokoli ve mantar) ve süt ürünlerinde (süt, çedar peyniri ve yoğurt) uygulanmış ve patojenlerin gıdalardaki mikrobiyal potansiyeli araştırılmıştır. Aynı zamanda standart mikrobiyolojik analizler ile her bakterinin konsantrasyonu belirlenmiş ve protokol valide edilmiştir. Geliştirilen protokolda farklı mikroorganizmaların ya da gıda matriksinin analizlerde girişim oluşturmadığı ve dolayısıyla yanlış sonuçlara neden olmadığı tespit edilmiştir (Gilbert ve ark., 2003). *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* patojenlerinin de içinde bulunduğu ishale neden olan bazı mikrobiyal patojenler için 3 ayrı platformda Multipleks PCR protokolleri geliştirilmiş ve klinik örneklerde uygulanmıştır. Kanlı ishale neden olan hedef patojenler virülans genlerine özgü primerler ile aynı Multipleks PCR

platformunda analiz edilmiştir. Toplam 54 örnekten 14 klinik izolat pozitif sonuç vermiştir. Pozitif örnekler genellikle bir patojenin varlığı ile tespit edilmiş, sadece birkaç örnekte iki patojen eş zamanlı olarak belirlenmiştir (Sjöling ve ark., 2015).

Multipleks PCR tekniğinin ileri derece optimize edilmesi gereken bir teknik olduğu düşünülmektedir. Özellikle örneklerin analizinde olası problemleri elemine etmek amacıyla PCR etkinliğini artırıcı ve inhibitörleri elemine edebilen maddelerin analizlere dahil edilmesi başarılı sonuçların elde edilmesine olanak sağlayabilir (Park ve ark., 2011).

E^R1 ve E^R2 protokolleri ile belirlenmesi

E^R1 ve E^R2 grubu içerisinde yer alan patojen mikroorganizmalar en çok et ve et ürünlerinde rastlanmakta, belirli enfeksiyon dozunda hastalık oluşturabilmektedir. Bu patojen mikroorganizmaların koyun eti örneklerindeki dinamiği E^R1 ve E^R2 Multipleks Real Time PCR protokolleri ile tespit edilmiştir. Koyun eti numunelerinde karaciğer dokusu (14 adet) ve boyun bölgesi (26 adet) ve şüpheli bulunan doku olarak üç farklı dokuda toplam 41 adet örnek analiz edilmiştir. Numunelerden alınan laboratuvar örneklerinin (1 gr) zenginleştirme işlemi sonrası kromozomal DNA izolasyonları yapılmış ve toplam DNA konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür. E^R1 ve E^R2 protokolleri ile Multipleks Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen Ct değerleri regresyon denklemlerinde yerine koyularak mikroorganizma sayıları hesaplanmıştır. Koyun eti örnekleri arasında mikroorganizma sayısı olarak geniş bir dinamik aralık gözlenmiştir. *C. perfringens* patojen mikroorganizması 2,0x10¹ kob/g ile K04-B1 örneğinde en düşük ve 8,6x 0⁵ kob/g ile K07-B1 örneğinde en fazla mikrobiyal yüke sahip olduğu görülmüştür. Patojenin koyun eti örneklerinde ortalama 8,1x10⁴ kob/g mikroorganizma yüküne sahip olduğu bulunmuştur. Sadece bir örneğin (K13-K2) *C. perfringens* patojeni ile kontamine olmadığı tespit edilmiştir. *E. faecalis* patojen mikroorganizmasının koyun eti örneklerinde potansiyeli belirlenmiş ve toplam 41 örnekten sadece 3 örnekte *E. faecalis* kontaminasyonu görülmemiştir. Bu patojenin koyun eti örneklerinde belirlenebildiği en düşük değer 1,5x10³ kob/g ve en yüksek değer ise 3,9x10⁷ kob/g olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.17 ve 4.18).

Çizelge 4.17. Koyun eti numunelerinin (boyun bölgeleri) E^R1 ve E^R2 Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>C. perfringens</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. enterica</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
K02-B1	901,95	32,01	4,5x10 ²	-	-	28,42	1,6x10 ⁴	20,34	2,3x10 ⁶	9,71	5,6x10 ⁹
K03-B1	778,75	31,39	6,1x10 ²	-	-	22,01	1,7x10 ⁶	27,1	2,7x10 ⁴	30,74	6,1x10 ²
K03-B2	602,88	34,06	1,5x10 ²	15,61	1,3x10 ⁷	39,02	7,2x10 ⁰	22,37	6,0x10 ⁵	22,35	3,7x10 ⁵
K04-B1	697,15	38,02	2,0x10 ¹	19,77	8,0x10 ⁵	37,12	2,9x10 ¹	19,44	4,1x10 ⁶	9,68	5,8x10 ⁹
K04-B2	536,23	20,27	1,9x10 ⁵	16,02	1,0x10 ⁷	34,14	2,5x10 ²	21,68	9,5x10 ⁵	8,05	2,0x10 ¹⁰
K05-B1	356,13	21,81	8,5x10 ⁴	29,06	1,5x10 ³	28,27	1,8x10 ⁴	18,66	7,0x10 ⁶	13,33	3,6x10 ⁸
K06-B1	415,15	25,41	1,3x10 ⁴	21,21	3,0x10 ⁵	39,77	4,2x10 ⁰	20,3	2,4x10 ⁶	9,87	5,0x10 ⁹
K07-B1	796,58	17,31	8,6x10 ⁵	-	-	13,72	7,2x10 ⁸	20,93	1,6x10 ⁶	21,35	7,9x10 ⁵
K07-B2	873,64	23,21	4,1x10 ⁴	17,92	2,8x10 ⁶	36,83	3,5x10 ¹	20,95	1,5x10 ⁶	29,72	1,3x10 ³
K08-B1	754,93	24,56	2,1x10 ⁴	20,56	4,7x10 ⁵	29,25	8,8x10 ³	17,68	1,3x10 ⁷	22,26	3,9x10 ⁵
K08-B2	475,60	24,58	2,0x10 ⁴	18,55	1,8x10 ⁶	16,41	1,0x10 ⁸	20,39	2,2x10 ⁶	9,69	5,7x10 ⁹
K09-B1	562,80	27,84	3,8x10 ³	17,86	2,9x10 ⁶	34,7	1,7x10 ²	17,86	1,2x10 ⁷	12,99	4,6x10 ⁸
K09-B2	325,48	23,59	3,4x10 ⁴	19,65	8,7x10 ⁵	16,62	8,8x10 ⁷	22,92	4,2x10 ⁵	12,16	8,7x10 ⁸
K10-B1	629,33	23,41	3,7x10 ⁴	19,46	9,9x10 ⁵	-	-	21,15	1,3x10 ⁶	8,93	1,0x10 ¹⁰
K10-B2	364,08	24,99	1,6x10 ⁴	15,47	1,5x10 ⁷	37,28	2,5x10 ¹	26,05	5,3x10 ⁴	9,19	8,4x10 ⁹
K11-B1	1018,15	22,69	5,4x10 ⁴	19	1,4x10 ⁶	13,68	7,4x10 ⁸	20,29	2,4x10 ⁶	25,02	4,8x10 ⁴
K16-B1	247,48	27,04	5,8x10 ³	18,18	2,4x10 ⁶	24,99	2,0x10 ⁵	20,26	2,4x10 ⁶	8,89	1,1x10 ¹⁰
K16-B2	299,50	27,88	3,7x10 ³	17,49	3,8x10 ⁶	37,33	2,5x10 ¹	14,96	7,9x10 ⁷	9,43	7,0x10 ⁹
K17-B1	777,35	18,41	4,9x10 ⁵	16,73	6,3x10 ⁶	22,50	1,2x10 ⁶	14,94	8,0x10 ⁷	21,84	5,4x10 ⁵
K17-B2	410,53	18,41	4,9x10 ⁵	14,03	3,9x10 ⁷	11,87	2,8x10 ⁹	18,61	7,2x10 ⁶	21,07	9,8x10 ⁵
K18-B1	328,68	25,43	1,3x10 ⁴	19,32	1,1x10 ⁶	11,10	4,9x10 ⁹	19,67	3,6x10 ⁶	11,21	1,8x10 ⁹
K18-B2	471,10	19,71	2,5x10 ⁵	19,15	1,2x10 ⁶	15,65	1,8x10 ⁸	20,63	1,9x10 ⁶	11,41	1,5x10 ⁹
K19-B1	569,18	22,77	5,2x10 ⁴	14,35	3,2x10 ⁷	26,08	8,9x10 ⁴	14,89	8,3x10 ⁷	20,50	1,5x10 ⁶
K19-B2	548,25	21,29	1,1x10 ⁵	16,21	9,0x10 ⁶	15,62	1,8x10 ⁸	25,94	5,8x10 ⁴	10,71	2,6x10 ⁹
K20-B1	487,00	27,64	4,2x10 ³	17,27	4,4x10 ⁶	12,15	2,3x10 ⁹	23,89	2,2x10 ⁵	22,87	2,5x10 ⁵
K20-B2	614,69	29,03	2,1x10 ³	16,67	6,6x10 ⁶	23,21	7,2x10 ⁵	30,54	2,8x10 ³	20,54	1,5x10 ⁶
Min.	247,48	17,31	2,0x10 ¹	14,03	1,5x10 ³	11,10	4,1x10 ⁰	14,89	2,8x10 ³	8,05	6,1x10 ²
Maks.	1018,15	38,02	8,6x10 ⁵	29,06	3,9x10 ⁷	39,77	4,9x10 ⁹	30,54	8,3x10 ⁷	30,74	2,0x10 ¹⁰
Ort.	570,87	21,27	1,1x10 ⁵	18,24	6,8x10 ⁶	25,11	4,8x10 ⁸	20,86	1,2x10 ⁷	15,90	3,3x10 ⁹

B; Boyun bölgesi, -; Patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/µL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/g)

Çizelge 4.18. Koyun eti numunelerinin (karaciğer ve şüpheli doku) E^R1 ve E^R2 Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>C. perfringens</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. enterica</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
K01-K1	558,08	22,92	4,8x10 ⁴	19,77	8,1x10 ⁵	36,16	5,8x10 ¹	25,23	9,2x10 ⁴	20,61	1,4x10 ⁶
K01-K2	833,15	33,52	2,0x10 ²	15,51	1,4x10 ⁷	30,87	2,7x10 ³	24,79	1,2x10 ⁵	10,06	4,3x10 ⁹
K02-K1	595,68	23,43	3,7x10 ⁴	18,87	1,5x10 ⁶	26,14	8,6x10 ⁴	30,89	2,2x10 ³	8,9	1,1x10 ¹⁰
K05-K1	382,15	19,42	2,9x10 ⁵	21,96	1,8x10 ⁵	20,82	4,1x10 ⁶	25,99	5,6x10 ⁴	10,77	2,5x10 ⁹
K06-K1	410,73	26,79	6,5x10 ³	19,27	1,1x10 ⁶	14,07	5,6x10 ⁸	23,2	3,5x10 ⁵	19,41	3,5x10 ⁶
K12-K1	444,85	24,59	2,0x10 ⁴	20,06	6,6x10 ⁵	31,42	1,8x10 ³	15,85	4,4x10 ⁷	8,66	1,3x10 ¹⁰
K12-K2	469,50	30,43	1,0x10 ³	18,28	2,2x10 ⁶	35,77	7,7x10 ¹	22,83	4,5x10 ⁵	8,97	9,9x10 ⁹
K13-K1	285,28	32,36	3,7x10 ²	25,13	2,1x10 ⁴	24,47	2,9x10 ⁵	24,55	1,4x10 ⁵	16,4	3,4x10 ⁷
K13-K2	855,30	-	-	18,67	1,7x10 ⁶	9,87	1,2x10 ¹⁰	22,62	5,1x10 ⁵	23,04	2,2x10 ⁵
K14-K1	412,33	24,93	1,7x10 ⁴	20,57	4,7x10 ⁵	-	-	21,93	8,1x10 ⁵	15,31	7,9x10 ⁷
K14-K2	851,13	26,19	8,9x10 ³	17,99	2,7x10 ⁶	27,25	3,8x10 ⁴	13,98	1,5x10 ⁸	10,44	3,2x10 ⁹
K15-K1	455,25	25,03	1,6x10 ⁴	24,16	4,1x10 ⁴	14,45	4,3x10 ⁸	24,35	1,6x10 ⁵	25,75	2,7x10 ⁴
K15-K2	403,75	26,43	7,9x10 ³	19,66	8,7x10 ⁵	11,56	3,5x10 ⁹	22,21	6,7x10 ⁵	11,01	2,1x10 ⁹
K21-K	480,48	31,2	6,8x10 ²	21,01	3,5x10 ⁵	12,47	1,8x10 ⁹	24,82	1,2x10 ⁵	13,49	3,2x10 ⁸
K11-U1	267,35	26,48	7,7x10 ³	20,04	6,7x10 ⁵	19,05	1,5x10 ⁷	19,25	4,7x10 ⁶	8,49	1,4x10 ¹⁰
Min.	267,35	19,42	2,0x10 ²	15,51	2,1x10 ⁴	9,87	5,8x10 ¹	13,98	2,2x10 ³	8,49	2,7x10 ⁴
Maks.	855,30	33,52	2,9x10 ⁵	25,13	1,4x10 ⁷	36,16	1,2x10 ¹⁰	30,89	1,5x10 ⁸	25,75	1,4x10 ¹⁰
Ort.	513,67	26,69	3,3x10 ⁴	20,06	1,8x10 ⁶	22,45	1,3x10 ⁹	22,83	1,4x10 ⁷	14,09	4,0x10 ⁹

K; Karaciğer dokusu, U; Bilinmeyen lezyon, -; Patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/g)

Örneklerde *S. aureus* patojen mikroorganizması ise 9-39 eşik değer (Ct) döngüleri arasında sonuç vermiştir. Bu patojenin koyun eti örneklerinde mikrobiyal yük bazında ise $4,2 \times 10^0$ - $1,2 \times 10^{10}$ kob/g olarak geniş bir dinamik aralığa sahip olduğu görülmüştür. Koyun eti örneklerinde E^R1 grubu *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* patojen mikroorganizmalarının potansiyelleri karşılaştırıldığında *S. aureus* patojenin önemli derecede üstünlüğü fark edilmektedir. *E. faecalis* patojeni ise *C. perfringens* ile çok farklı olmamakla birlikte varlığı en düşük patojen olarak gözlenmiştir.

E^R2 protokolü ile analiz edilen koyun eti örneklerinde *E. coli* O157:H7 patojen mikroorganizması toplamda 41 örnek analiz edilmiş ve tüm örneklerde pozitif sonuç elde edilmiştir. *E. coli* O157:H7 için Ct değerleri yaklaşık 13-30 arasında değişiklik göstermektedir. Bu patojenin koyun eti örneklerinde $2,2 \times 10^3$ - $1,5 \times 10^8$ kob/g mikroorganizma sayısı ile geniş bir dinamik aralığa sahip olduğu görülmüştür. *S. enterica* patojen mikroorganizması ise $6,1 \times 10^2$ - $2,0 \times 10^{10}$ kob/g aralığında tespit edilmiştir.

Koyun eti numunelerinin 26 tanesi boyun bölgesinden, 14 tanesi karaciğer dokusundan ve 1 tanesi ise şüpheli görülen dokudan alınmış örneklerdir. *C. perfringens* ve *E. faecalis* mikrobiyal patojenleri ortalama olarak en yüksek boyun bölgesinde ve *S. aureus* ise karaciğer dokusunda tespit edilmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* ise her iki dokuda da yakın mikrobiyal yüke sahip olduğu belirlenmiştir. Şüpheli bulunan doku ise ortalama değerler içinde yer almış, diğer dokulardan (boyun ve karaciğer) aykırı bir sonuç oluşturmamıştır. Boyun bölgesinden alınan örneklerde mikrobiyal yükün fazla miktarda bulunması hayvan kesimi sırasında gerçekleşen bir kontaminasyon sonucu gerçekleşmiş olabilir. Karaciğer vücutta besinlerin işlendiği bir yer olup, kan yoluyla mide bağırsak sisteminden gelen faydalı molekülleri ilgili organlara ve faydasız molekülleri ise böbreğe gönderen bir organdır. Bu nedenle patojen mikroorganizmaların karaciğer dokularında daha fazla bulunması beklenmektedir.

Patojen mikroorganizmaların gıdalarda hastalık oluşturabilmek için belirli miktarlarda bulunmaktadır. Bu miktar enfeksiyon dozu olarak bilinmekte ve patojenden patojene hatta kişiden kişiye bile değişiklik gösterebilmektedir. Enfeksiyon dozu *C. perfringens* için 10^5 - 10^8 kob/g, *E. faecalis* için en az 10^7 kob/g ve *S. aureus* için ise 10^7 - 10^9 kob/g arasında değişiklik göstermektedir. *E. coli* O157:H7 patojeni 10^1 - 10^2 kob/g olarak çok düşük miktarlarda hastalık oluşturabilirken *S. enterica* patojeni ise 10^0 - 10^9 kob/g olarak geniş bir enfeksiyon dozu aralığına sahiptir. E^R1 protokolü ile analiz edilen

koyun eti örneklerinde *C. perfringens* patojeni en yüksek 10^5 kob/g, *E. faecalis* patojeni 10^7 kob/g ve *S. aureus* ise 10^{10} kob/g, olarak tespit edilmiştir. E^{R2} protokolü ile analiz edilen koyun eti örneklerinde mikroorganizma sayısı ise *E. coli* O157:H7 patojeni 10^3 - 10^7 kob/g arasında değişmekte olup *S. enterica* ise ortalama 10^2 - 10^9 kob/g olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak analiz edilen örnekler arasında hedef patojenler için belirlenen mikroorganizma sayılarının hastalık oluşturabilecek düzeyde olduğu görülmüştür. Ayrıca gıda koteksinin yayınladığı mikrobiyolojik kriterler tebliğinde patojen mikroorganizmaların gıdalarda en fazla bulunabileceği en üst limitler belirtilmiş ve *C. perfringens* ve *S. aureus* için 10^3 - 10^4 kob/g değerleri aşılması istenmeyen limit değerler olarak bildirilmiştir. *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için ise bu değer 0/25 g olarak çok düşük miktarda belirlenmiştir. E^{R1} ve E^{R2} protokolleri ile analiz edilen koyun eti örneklerinde bu limitleri aşan örneklerin varlığı tespit edilmiştir.

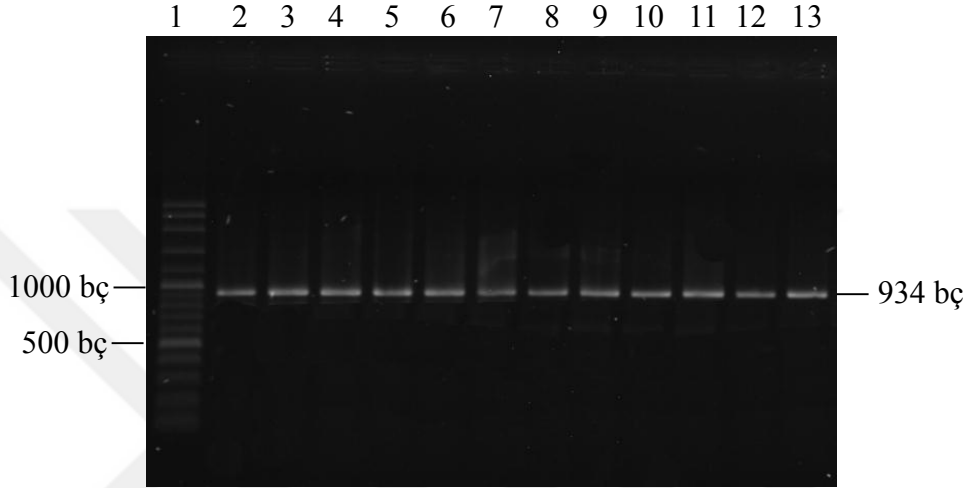
4.3.1.2. Sığır eti numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E^{M1-2} ve E^{R1-2} protokolleri ile belirlenmesi

E^{M1} ve E^{M2} protokolleri ile belirlenmesi

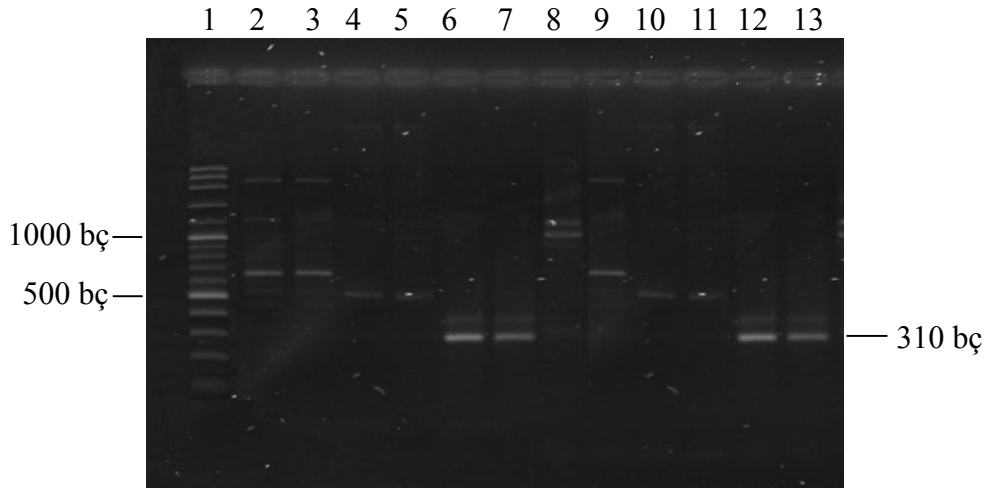
Sığır eti numunelerinde hedef patojen mikroorganizmaların varlığı tespit etmek amacıyla E^{M1} ve E^{M2} protokolleri ile Multipleks PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde hedef patojen mikroorganizmalar sığır eti izolatlarında özgün olarak edilememiştir. Multipleks PCR analizlerinde birçok spesifik olmayan amplifikasyon ürünü oluşması nedeniyle Unipleks PCR analizleri yapılmıştır. Tekli analizlerde koyun eti numunelerinde olduğu gibi *C. perfringens*, *S. aureus* (E^{M1} grubu) ve *E. coli* O157:H7 (E^{M2} grubu) patojenlerinin varlığı spesifik PCR ürünleri ile belirlenmiş, ancak *E. faecalis* (E^{M1} grubu) ve *S. enterica* (E^{M2} grubu) birçok amplifikasyon ürününün oluşma ile başarılı bir şekilde tespit edilememiştir. Sonuçların bir kısmı Şekil 4.57, 4.58, 4.59, 4.60 ve 4.61'de gösterilmiştir. Toplam 40 adet sığır eti numunesinden 27 numunede *C. perfringens* patojeninin sığır etlerini kontamine ettiği gözlenmiştir. Bununla birlikte *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 patojenlerinin de sığır eti numunelerin tümüne (40 adet) bulaştığı PCR analizi sonucuyla tespit edilmiştir.

E^{M1} tanımlanması planlanan üç patojenden biri olan *E. faecalis* patojeni spesifik olarak tespit edilememiş ve bu sorunun primer kaynaklı olduğu düşünülmüştür. *E. faecalis* ve *S. aureus* patojenlerinin çoklu PCR analizlerinde eş zamanlı olarak tanımlandığı çalışmalar mevcuttur (Mehrotra ve ark., 2000; Ramos-Trujillo ve ark.,

2003). Bu iki patojenin klinik izolatlarda aynı anda belirlenmesindeki amaç olası bir genetik transfer durumunun araştırılması ve dolayısı ile enterokoklara özgü vankomisin direnç genlerinin metisiline dirençli *S. aureus* patojeninde bulunabilme potansiyelinin belirlenmesidir. Yine klinik izolatlarda *E. faecalis* patojeni ile ilgili cins ve tür bazında ve *S. aureus* ile ilgili ise metisiline direnç genlerinin identifikasyonu ile ilgili Multipleks PCR analizleri yapılmıştır (Perez-Roth ve ark., 2001; Strommenger ve ark., 2003; Jackson ve ark., 2004; Layton ve ark., 2009).

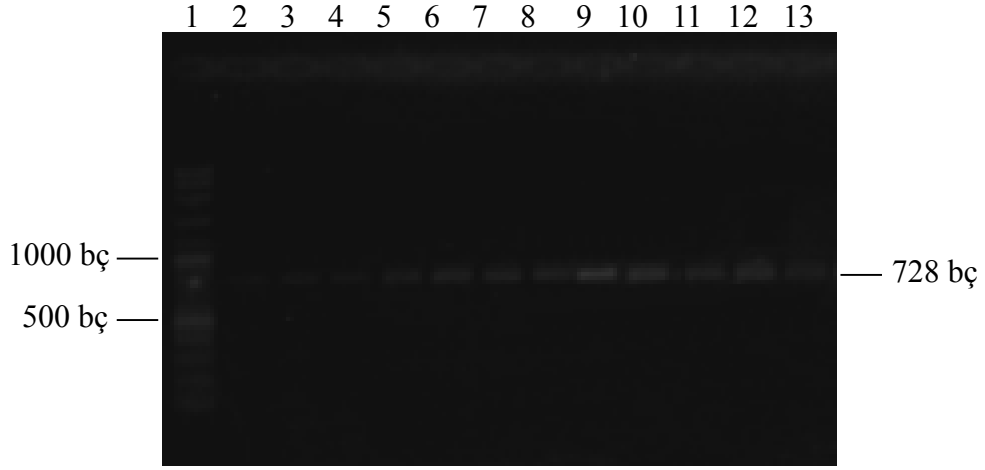


Şekil 4.57. *C. perfringens* (934 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Sığır eti örnekleri

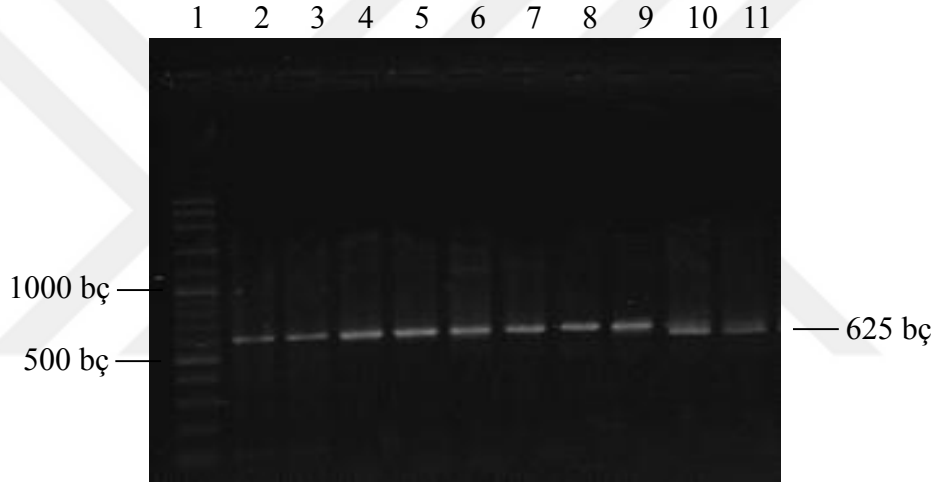


Şekil 4.58. *E. faecalis* (310 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Sığır eti örnekleri

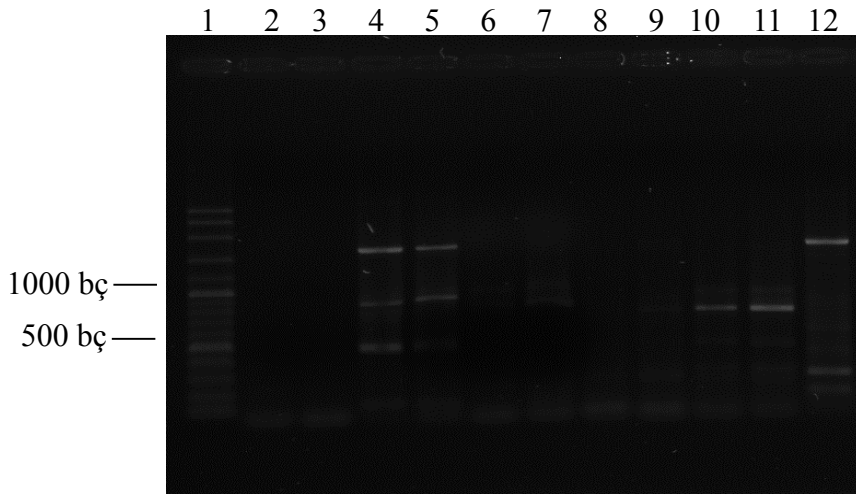
E^M2 grubunda tanımlanması hedeflenen *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* serotipleri için farklı Multipleks PCR ve Multipleks Real Time PCR stratejileri geliştirilmiştir. Hedef patojenler için seçilen primerler her iki protokolde de kullanılmış, SYBR-Green teknolojisi ile de kantitatif analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.59. *S. aureus* (728 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Sığır eti örnekleri



Şekil 4.60. *E. coli* O157:H7 (625 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-11: Sığır eti örnekleri



Şekil 4.61. *S. enterica* (403 bç) mikroorganizmasının sığır eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-12: Sığır eti örnekleri

Su örneklerinde protokollerin uygulanabilirliği araştırılmış, Unipleks PCR analizlerinde her patojen spesifik olarak tanımlanabilmiş ama Multipleks PCR analizlerinde *Salmonella* türlerine özgü primerlerin düşük DNA konsantrasyonda primer dimeri oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca analizler sırasında örnek matriksinden kaynaklı inhibitörleri elemine etmek amacıyla PCR etkinliğini artırıcı maddeler (Bovine Serum Albumin, BSA) kullanılmıştır (Park ve ark., 2011). Bu çalışmada da hem Multipleks PCR hem de Multipleks Real Time PCR protokolleri oluşturulmuş, gıda örneklerinde uygulanabilirliği araştırılmış ancak *E. faecalis* ve *S. enterica* primerlerinin ve gıda matriksinin PCR verimini etkilediği düşünülmüştür.

E^R1 ve E^R2 protokolleri ile belirlenmesi

Toplanan 40 farklı sığır eti numunesinden alınan örneklerin (1 gr) zenginleştirilmesi ve DNA izolasyonu uygulamalarından sonra toplam DNA konsantrasyonları ölçülmüş, takiben E^R1 ve E^R2 protokolleri ile Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda sığır eti numunelerinin eşik değer döngüleri (Ct) elde edilmiştir. Hedef patojenlerin E^R1 ve E^R2 protokolleri oluşturulurken belirlenen regresyon denklemlerinde (Bulgular Tartışma 4.3.1’de belirtildiği gibi) Ct değerleri (y) kullanılmış, her bir hedef patojenin mikroorganizma sayıları hesaplanarak mikrobiyal potansiyelleri belirlenmiştir.

Sığır eti numuneleri boyun bölgesi (19), karaciğer dokusu (17) ve şüpheli bulunan dokular (4) olarak 3 farklı dokudan toplanmıştır. Geliştirilen protokoller ile numuneler analiz edildiğinde *C. perfringens* (12 adet) ve *E. faecalis* (3 adet) patojenlerinin bulaşmadığı sığır eti numunesinin olduğu tespit edilmiştir. *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenlerinin bütün numunelerde varlığı tespit edilmiş ve kontaminasyon dereceleri belirlenmiştir (Çizelge 4.19 ve 4.20). Boyun, karaciğer ve şüpheli dokularda hedef mikrobiyal patojenlerin kontaminasyon dereceleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.19. Sığır eti numunelerinin (boyun bölgeleri) E^R1 ve E^R2 Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>C. perfringens</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. enterica</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
S01-B1	441,60	32,48	3,5x10 ²	36,79	7,8x10 ⁰	16,3	1,1x10 ⁸	33,43	4,2x10 ²	10,33	3,5x10 ⁹
S02-B1	513,20	18,95	3,7x10 ⁵	16,68	6,6x10 ⁶	27,68	2,8x10 ⁴	17,82	1,2x10 ⁷	8,3	1,7x10 ¹⁰
S03-B1	536,85	30,16	1,2x10 ³	21,65	2,2x10 ⁵	16,77	7,8x10 ⁷	13,07	2,7x10 ⁸	15,38	7,5x10 ⁷
S04-B1	214,00	-	-	27,04	5,8x10 ³	20,93	3,8x10 ⁶	26,79	3,3x10 ⁴	11,91	1,1x10 ⁹
S05-B1	100,65	17,26	8,9x10 ⁵	21,18	3,1x10 ⁵	24,94	2,0x10 ⁵	25	1,1x10 ⁵	8,98	9,9x10 ⁹
S05-B2	211,40	19,12	3,4x10 ⁵	23,73	5,5x10 ⁴	20,37	5,7x10 ⁶	34,65	1,9x10 ²	22,34	3,7x10 ⁵
S09-B1	231,60	20,34	1,8x10 ⁵	35,51	1,9x10 ¹	11,53	3,6x10 ⁹	24,01	2,1x10 ⁵	32,45	1,7x10 ²
S10-B1	229,30	-	-	24,61	3,0x10 ⁴	14,76	3,4x10 ⁸	11,24	9,1x10 ⁸	12,74	5,6x10 ⁸
S10-B2	300,10	20,66	1,5x10 ⁵	-	-	14,14	5,3x10 ⁸	9,3	3,3x10 ⁹	12,22	8,3x10 ⁸
S11-B1	298,00	-	-	28,81	1,8x10 ³	26,92	4,8x10 ⁴	23	4,0x10 ⁵	7,41	3,3x10 ¹⁰
S11-B2	354,25	-	-	28,18	2,7x10 ³	18,77	1,8x10 ⁷	12,8	3,3x10 ⁸	7,45	3,2x10 ¹⁰
S16-B1	321,30	-	-	25,84	1,3x10 ⁴	33,73	3,4x10 ²	32,92	5,8x10 ²	21,66	6,2x10 ⁵
S17-B1	317,50	27,7	4,1x10 ³	26,88	6,5x10 ³	31,7	1,5x10 ³	12,15	5,0x10 ⁸	11,83	1,1x10 ⁹
S17-B2	403,45	27,18	5,4x10 ³	29,93	8,2x10 ²	36,06	6,2x10 ¹	11,57	7,4x10 ⁸	28,4	3,6x10 ³
S18-B2	284,40	-	-	22,79	1,0x10 ⁵	15,46	2,0x10 ⁸	20,16	2,6x10 ⁶	11,6	1,3x10 ⁹
S19-B1	371,05	15,48	2,2x10 ⁶	24,18	4,0x10 ⁴	26,59	6,2x10 ⁴	26,97	2,9x10 ⁴	23,35	1,7x10 ⁵
S19-B2	421,35	1,45	3,0x10 ⁹	32,1	1,9x10 ²	16,4	1,0x10 ⁸	16,26	3,4x10 ⁷	11,79	1,2x10 ⁹
S20-B1	671,55	24,99	1,7x10 ⁴	25,27	1,9x10 ⁴	23,06	8,0x10 ⁵	11,02	1,1x10 ⁹	24,32	8,2x10 ⁴
S20-B2	668,60	27,36	4,9x10 ³	22,28	1,5x10 ⁵	29,12	9,7x10 ³	32,33	8,6x10 ²	9,2	8,3x10 ⁹
Min.	100,65	15,48	3,5x10 ²	16,68	7,8x10 ⁰	11,53	6,2x10 ¹	9,30	1,9x10 ²	7,41	1,7x10 ²
Maks.	671,55	32,48	2,2x10 ⁶	36,79	6,6x10 ⁶	36,06	3,6x10 ⁹	34,65	3,3x10 ⁹	32,45	3,3x10 ¹⁰
Ort.	362,64	23,47	3,5x10 ⁵	26,30	4,2x10 ⁵	22,38	2,6x10 ⁸	20,76	3,7x10 ⁸	15,35	5,7x10 ⁹

B; Boyun bölgesi, -; Patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/g)

Çizelge 4.20. Sığır eti numunelerinin (karaciğer ve şüpheli doku) E^R1 ve E^R2 Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>C. perfringens</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. enterica</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
S01-K1	495,75	-	-	29,01	1,5x10 ³	23,49	5,9x10 ⁵	21,25	1,3x10 ⁶	9,88	5,0x10 ⁹
S02-K1	250,50	20,36	1,8x10 ⁵	20,26	5,8x10 ⁵	22,75	1,0x10 ⁶	34,89	1,6x10 ²	9,87	5,0x10 ⁹
S03-K1	399,70	-	-	22,1	1,7x10 ⁵	19,66	9,6x10 ⁶	15,24	6,6x10 ⁷	17,1	2,0x10 ⁷
S06-K1	82,30	20,69	1,5x10 ⁵	39,33	1,4x10 ⁰	18,98	1,6x10 ⁷	14,73	9,2x10 ⁷	22,33	3,7x10 ⁵
S06-K2	166,60	20,28	1,9x10 ⁵	19	1,4x10 ⁶	21,16	3,2x10 ⁶	15,3	6,3x10 ⁷	10,24	3,8x10 ⁹
S07-K1	87,05	18,88	3,8x10 ⁵	27,02	5,9x10 ³	23,6	5,4x10 ⁵	24,13	1,9x10 ⁵	26,35	1,7x10 ⁴
S07-K2	177,30	17,52	7,7x10 ⁵	24,51	3,2x10 ⁴	17,97	3,3x10 ⁷	27,26	2,4x10 ⁴	12,49	6,8x10 ⁸
S08-K1	135,60	-	-	16,91	5,6x10 ⁶	16,88	7,2x10 ⁷	12,77	3,3x10 ⁸	10,63	2,8x10 ⁹
S08-K2	154,00	-	-	-	-	16,35	1,1x10 ⁸	16,94	2,1x10 ⁷	12,25	8,1x10 ⁸
S09-K2	244,55	17,95	6,2x10 ⁵	-	-	18,57	2,1x10 ⁷	24,54	1,4x10 ⁵	31,55	3,3x10 ²
S12-K1	82,65	38,36	1,7x10 ¹	28,58	2,0x10 ³	32,94	6,0x10 ²	26,29	4,6x10 ⁴	22,24	4,0x10 ⁵
S14-K1	185,25	34,6	1,2x10 ²	26,54	8,1x10 ³	28,93	1,1x10 ⁴	13,4	2,2x10 ⁸	23,27	1,8x10 ⁵
S14-K2	125,50	22,15	7,1x10 ⁴	23,06	8,6x10 ⁴	24,64	2,5x10 ⁵	20,23	2,5x10 ⁶	10,38	3,4x10 ⁹
S15-K1	370,00	25,78	1,1x10 ⁴	17,04	5,1x10 ⁶	15,73	1,7x10 ⁸	22,02	7,6x10 ⁵	14,74	1,2x10 ⁸
S15-K2	212,35	28,2	3,2x10 ³	29,01	1,5x10 ³	25,92	1,0x10 ⁵	12,78	3,3x10 ⁸	20,95	1,1x10 ⁶
S16-K2	345,80	-	-	27,66	3,8x10 ³	34,94	1,4x10 ²	23,28	3,3x10 ⁵	28,15	4,4x10 ³
S18-K1	332,25	-	-	23,4	6,9x10 ⁴	34,88	1,5x10 ²	33,76	3,4x10 ²	18,55	6,7x10 ⁶
S04-U1	223,75	19,46	2,9x10 ⁵	22,7	1,1x10 ⁵	21,16	3,2x10 ⁶	35,66	9,7x10 ¹	10,15	4,0x10 ⁹
S12-U1	235,40	26,87	6,3x10 ³	24,56	3,1x10 ⁴	25	2,0x10 ⁵	17,52	1,5x10 ⁷	11,22	1,8x10 ⁹
S13-U1	310,90	20,89	1,4x10 ⁵	28,42	2,3x10 ³	33,56	3,8x10 ²	23,69	2,5x10 ⁵	37,73	3,0x10 ⁰
S13-U2	473,15	-	-	31,63	2,6x10 ²	23,91	4,3x10 ⁵	17,75	1,3x10 ⁷	12,65	6,0x10 ⁸
Min.	82,30	17,52	1,7x10 ¹	16,91	1,4x10 ⁰	15,73	1,4x10 ²	12,77	9,7x10 ¹	9,87	3,0x10 ⁰
Maks.	495,75	38,36	7,7x10 ⁵	39,33	5,6x10 ⁶	34,94	1,7x10 ⁸	35,66	3,3x10 ⁸	37,73	5,0x10 ⁹
Ort.	242,40	23,71	2,0x10 ⁵	25,30	6,9x10 ⁵	23,86	2,1x10 ⁷	21,59	5,5x10 ⁷	17,75	1,3x10 ⁹

K; Karaciğer dokusu, U; Bilinmeyen lezyon, -; Analizlerde patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/g)

Mikrobiyal kontaminasyon *C. perfringens*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 patojenleri için boyun bölgelerinde daha fazla gözlenmişken *E. faecalis* ve *S. enterica* patojenleri 3 farklı dokuda da benzer kontaminasyon miktarı göstermiştir. E^R1 protokolü ile analiz edilen *C. perfringens* patojeni sığır eti örneklerinde $1,7 \times 10^1$ kob/g ve $2,2 \times 10^6$ kob/g ile geniş bir spektruma sahiptir. Bu patojenin mikrobiyal yükü dokular bazında karşılaştırıldığında en düşük değer $1,7 \times 10^1$ kob/g ile karaciğer dokularından ve en yüksek değer 3×10^9 kob/g ile de boyun bölgesinden alınan sığır eti örneklerinde saptanmıştır. *E. faecalis* patojeninin S6-K1 numunesinde $1,4 \times 10^0$ kob/g ile en düşük değeri tespit edilmiştir. S2-B1 numunesi ise $6,6 \times 10^6$ kob/g ile en yüksek mikroorganizma potansiyeline sahip numune olarak saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında karaciğer dokusunda en düşük boyun bölgesinde ise en yüksek *E. faecalis* mikroorganizması bulunduğu gözlenmiştir. *S. aureus* patojen mikroorganizması sığır eti örneklerinde $6,2 \times 10^1$ ile $3,6 \times 10^9$ kob/g arasında geniş bir dinamik aralığa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu patojen diğer dokulara kıyasla boyun bölgesinde en düşük ve en yüksek miktarlarda saptanmıştır.

E^R2 protokolü ile analiz edilen *E. coli* O157:H7 patojeninin kontaminasyon derecesi $9,7 \times 10^1$ - $3,3 \times 10^9$ kob/g aralığında tespit edilmiştir. S4U1 numaralı örnekte en düşük ve S10B2 numaralı örnekte ise en yüksek *E. coli* O157:H7 patojeni olduğu belirlenmiştir. *S. enterica* ise sığır eti örneklerinde $3,0 \times 10^0$ kob/g ile S13U1 numaralı örnekte en düşük mikroorganizma sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. S11B1 örneğinin ise $3,3 \times 10^{10}$ kob/g ile en yüksek *S. enterica* patojenini bulduran örnek olduğu görülmüştür. Sığır eti örneklerinde *S. enterica* patojeninin mikrobiyal kontaminasyon derecesi bakımından geniş bir dinamik aralıkta değişim gösterdiği gözlenmiştir.

E^R1 grubunda buluna üç hedef patojeninin eş zamanlı olarak Multipleks Real Time PCR tekniği ile identifikasyonunun yapılmadığı belirlenmiştir. *C. perfringens* patojeninin genellikle toksin genleri ile ilgili çalışmalarda Multipleks Real Time PCR uygulamaları yapılmıştır. *E. faecalis* patojeni ise herhangi bir Multipleks Real Time PCR metodunda tanımlanmadığı görülmüştür. Bu nedenle E^R1 Multipleks Real Time protokolünün hedef patojenleri eş zamanlı olarak karakterize eden ve aynı zamanda *E. faecalis* patojeni için ilk Multipleks Real Time PCR çalışmasıdır. *S. aureus* patojen mikroorganizması için ise yaygın olarak Multipleks Real Time PCR uygulamalarında tanımlanmış, E^R1 Multipleks Real Time protokolünde bu patojen için alternatif bir protokol oluşturmuştur.

C. perfringens hayvan, insan ve gıdalardan izole edilen örneklerde toksin genlerinin karakterize edilmesiyle çoklu Real Time PCR analizlerinde teşhis edilmiş ve örneklerdeki potansiyeli belirlenmiştir (Albini ve ark., 2008; Grant ve ark., 2008; Gurjar ve ark., 2008; Wang ve ark., 2011). Bu patojenin toksin tiplendirilmesi için insan ve hayvan izolatlarının analizi ile konvansiyonel ve Real Time PCR metotları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçların bu iki metot için birbirlerine % 100 uyumlu olduğu tespit edilmiştir. İlâveten Unipleks Real Time PCR ve Multipleks Real Time PCR analizleri yapılarak aynı örneklerden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış, Multipleks Real Time PCR sonuçlarının genel olarak biraz daha düşük olduğu saptanmıştır. PCR’da bireysel rekabetin sonuçların düşük olmasına neden olduğu düşünülmüştür (Albini ve ark., 2008). Farklı bir Multipleks Real Time PCR protokolü ile çeşitli hayvan ve insan izolatlarında toksin genleri 241 pozitif örnekten *cpa* (% 28,2), *cpb* (% 2,5), *ia* (% 2,5), *etx* (% 1,6), *cpb2* (% 68) ve *cpe* (% 4,5) genleri tespit edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında *cpb2* geni kaynaklı beta2 toksin üreten suşların *C. perfringens* ile ilişkili ishale seyreden vakalarda önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür (Gurjar ve ark., 2008). Bu çalışmada ise *C. perfringens* mikrobiyal patojeni alfa toksin geni olan *plc* (*cpa*) geninin amplifikasyonu ile tanımlanmıştır. E^R1 protokolü ile analiz edilen sığır eti numunelerinde *cpa* geninin amplifikasyonu ile *C. perfringens* patojeninin mikrobiyal potansiyeli % 70 (40 örnekten 28 örnekte pozitif sonuç ile) olarak belirlenmiştir.

E. faecalis patojenin su örneklerinde geliştirilen Real Time PCR ile potansiyelleri araştırılmıştır. 16S rRNA geni hedef gen bölgesi olarak seçilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin dinamik aralığı 10¹-10⁵ kob/reaksiyon, belirleme limiti 6 kob/reaksiyon ve korelasyon katsayısı ise 0,98’den büyük bulunmuştur (Domingo ve ark., 2003). Yine su örneklerinde 23S rRNA geninin amplifikasyonuna bağlı olarak bu patojenin mikrobiyal potansiyeli araştırılmıştır (He ve ark., 2005). Geliştirilen E^R1 protokolünde ise 16S rRNA hedef bölge olarak belirlenmiş ve sığır eti örneklerinde *E. faecalis* patojeninin kontaminasyon derecesi tespit edilmiştir. Farklı 500 et örneği ve 100 yumurta örneğinde vankomisine dirençli genlerin varlığı tespit edilmek istenmiş ve izolatlarda 53 suşun *E. faecalis* patojeni olduğu belirlenmiştir. Multipleks PCR ve Real Time PCR uygulamaları ile suşlarda *vanA* ve *vanB* direnç genleri araştırıldığında *E. faecalis* patojeninde bu genin varlığına rastlanmamıştır (Gousia ve ark., 2015). Gıda örneklerinde virülans genlerinin varlığı ile enterokokların potansiyeli araştırılmıştır. Geliştirilen Real Time PCR protokolünde *ace*, *esp* ve *gelE* virülans genleri belirleme limiti saf kültür ve et örneklerinde 10² kob/mL veya 10² kob/g ve

peynir örneklerinde ise 10^3 kob/g olarak tespit edilmiştir (Abouelnaga ve ark., 2016). Gıda örneklerinde *E. faecalis* patojeni ile ilgili Real Time PCR uygulamalarının sınırlı sayıda olduğu görülmüştür. E^{R1} protokolü *E. faecalis* patojeninin gıdalardaki potansiyelini araştırmak için alternatif bir metot oluşturmaktadır.

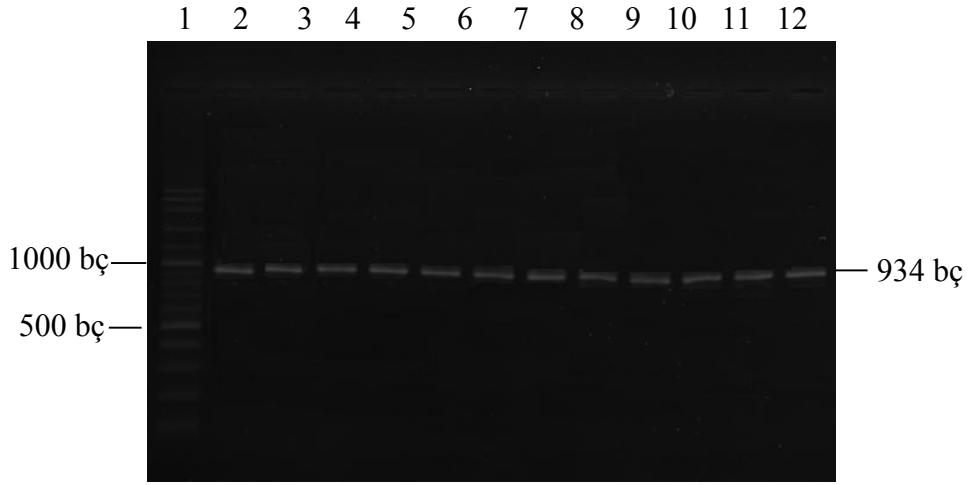
E. coli O157:H7 ve *S. enterica* mikrobiyal patojenleri Multipleks Real Time PCR uygulamalarında tanımlanan patojenler arasında yer almaktadır. Et ürünlerinde *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. patojen mikroorganizmaların varlığı geliştirilen Multipleks Real Time PCR metodu ile araştırılmıştır. *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp. için 10^2 - 10^6 hücre/mL dinamik aralığında 0,99 hassasiyete sahip kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. İlaveten farklı domuz örneklerinde yapay olarak kontaminasyon ile 20 saat zenginleştirmeden sonra 1 kob/25 g belirleme limitine kadar inebilmişlerdir (Kawasaki ve ark., 2010). Yine et ürünlerinde farklı bir Real Time PCR protokolü ile aynı hedef patojenler yapay kontaminasyonda 20 saat zenginleştirmeden sonra 2 kob/10 g en düşük belirlenme limiti olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tavuk, hindi ve domuzunda bulunduğu toplam 26 taze et ürününde patojenlerin mikrobiyal yükleri belirlenmiştir. Örneklerden 15 tanesi (% 57,7) bir ya da iki patojen için pozitif sonuç vermiştir. Geri kalan örneklerdeki hedef patojenlerin varlığı internal kontrolün amplifiye olması ile birlikte negatif olarak sonuçlanmıştır. Pozitif örneklerde *Salmonella* % 30,8 ve *E. coli* O157:H7 ise % 11,5 oranları ile belirlenmiştir. Ayrıca Multipleks Real Time PCR sonuçları kültürel metotlar ile doğrulanmıştır (Suo ve ark., 2010).

4.3.1.3. Tavuk eti numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E^{M1-2} ve E^{R1-2} protokolleri ile belirlenmesi

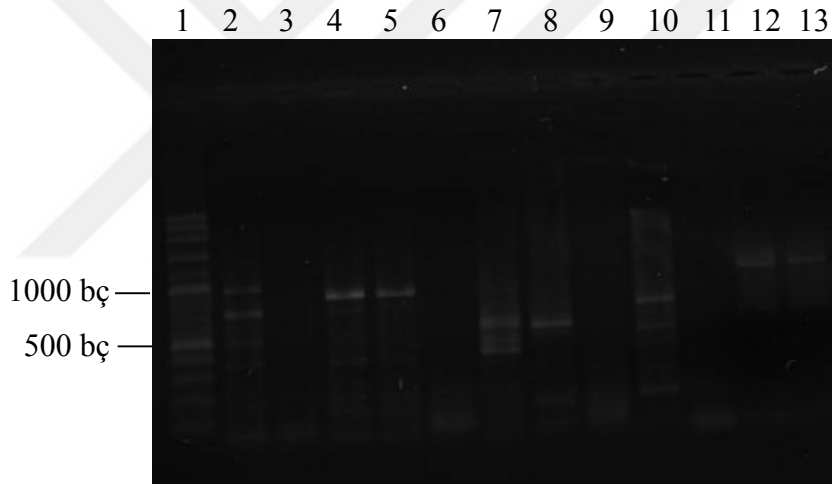
E^{M1} ve E^{M2} protokolleri ile belirlenmesi

Toplam 30 adet tavuk eti numunesi geliştirilen E^{M1} ve E^{M2} Multipleks PCR protokolleri ile analiz edilmiştir. Hedef patojen mikroorganizmalar koyun ve sığır eti numunelerinde olduğu gibi tespit edilememiştir. Unipleks PCR ile *C. perfringens*, *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 (E^{M2} grubu) tanımlanırken, *E. faecalis* (E^{M1} grubu) ve *S. enterica* (E^{M2} grubu) patojenleri birçok spesifik olmayan PCR ürününün oluşması nedeniyle tanımlanamamıştır. Tavuk eti numuneleri için Tekli PCR analiz sonuçlarının bir kısmı gösterilmiştir (Şekil 4.62, 4.63, 4.64, 4.65, 4.66). Tekli PCR analizleri sonucunda tavuk eti örneklerinde (30 adet) *C. perfringens* (22 adet), *S. aureus* (28 adet) ve *E. coli* O157:H7 (29

adet) mikrobiyal patojenlerin tespit edilmiş ve patojenlerin tavuk eti numunelerini kontamine ettiği belirlenmiştir.

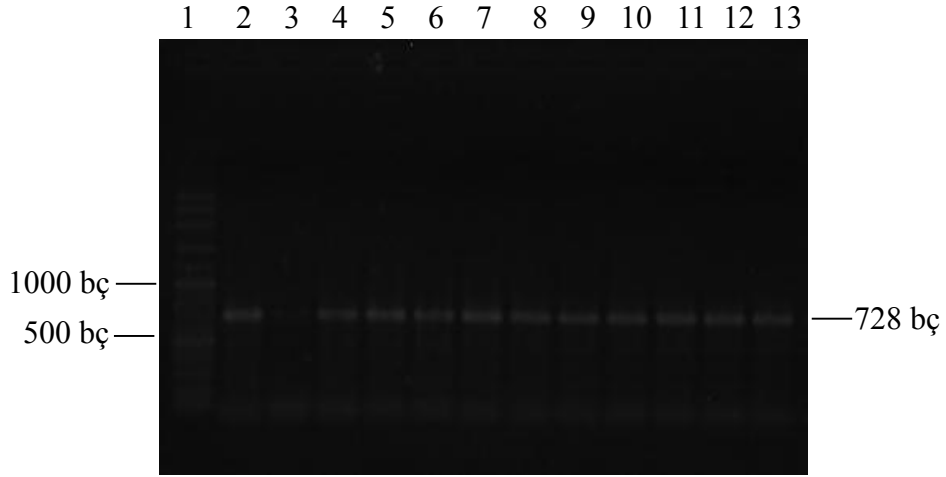


Şekil 4.62. *C. perfringens* (934 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Tavuk eti örnekleri

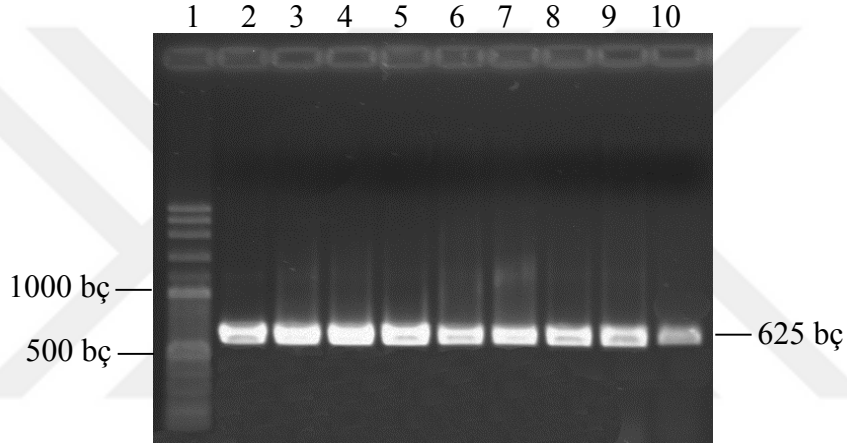


Şekil 4.63. *E. faecalis* (310 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Tavuk eti örnekleri

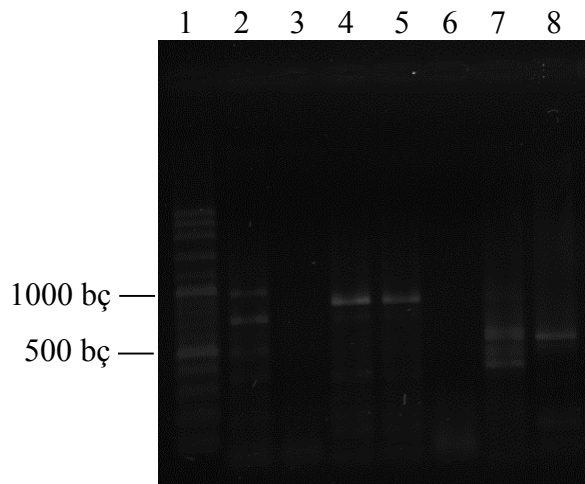
Bu hedef patojenler ile ilgili yapılan Multipleks PCR çalışmaları genellikle klinik örneklerde yapılmış ve hedef genlerin identifikasyonu ile patojenler tanımlanmıştır. Çalışmanın bu kısmında ise klinik örneklere göre daha karmaşık bir matrikse sahip gıda örnekleri hedef mikroorganizmalar geliştirilen E^M1 ve E^M2 Multipleks PCR yöntemleri ile analiz edilmiş ancak tekli PCR amplifikasyonunda başarılı şekilde tanımlanmıştır. Bu problemin gıda matriksinden kaynaklı ya da primer kaynaklı olduğu sanılmaktadır. Metodun gıda örneklerinde optimizasyonu ve gerekir ise mikroorganizmalar için yeni primerlerin belirlenmesi ya da tasarlanması gerekmektedir.



Şekil 4.64. *S. aureus* (728 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-13: Tavuk eti örnekleri



Şekil 4.65. *E. coli* O157:H7 (625 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-10: Tavuk eti örnekleri



Şekil 4.66. *S. enterica* (403 bç) mikroorganizmasının tavuk eti numunelerinde Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-8: Tavuk eti örnekleri

E^R1 ve E^R2 protokolleri ile belirlenmesi

Geliştirilen E^R1 ve E^R2 protokolleri ile tavuk eti numuneleri analiz edilmiş, protokollerin uygulanabilirliği ve hedef patojen mikroorganizmaların kontaminasyon dereceleri araştırılmıştır. Analiz edilen tavuk eti örneklerinde (30 adet) *C. perfringens* ve *E. faecalis* patojenleri 8 örnekte, *S. aureus* patojeni 1 örnekte ve *E. coli* O157:H7 patojeni ise 3 örnekte tespit edilememiştir. *S. enterica* patojeni ise bütün tavuk eti örneklerinde varlığı ile kontaminasyon oluşturmuştur. *C. perfringens* patojeni ortalama $7,2 \times 10^5$ kob/g ile tavuk numunelerinde en düşük mikrobiyal yüke sahip patojen olarak tespit edilmiştir. *S. aureus* ($3,2 \times 10^9$ kob/g) ve *S. enterica* ($5,8 \times 10^9$ kob/g) ise en yüksek mikroorganizma sayısı ile tavuk eti örneklerinde varlığını göstermiştir. *E. faecalis* ve *E. coli* O157:H7 patojen mikroorganizmalarının kontaminasyon dereceleri ortalama olarak 10^1 - 10^9 kob/g arasında değişen geniş bir spektruma sahiptir. Tavuk eti numunelerinde *C. perfringens* ve *E. faecalis* % 73 oranında, *S. aureus* % 96,6 oranında, *E. coli* O157:H7 % 90 oranında ve *S. enterica* % 100 oranında pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.21).

E^R1 grubu içerisinde yer alan *S. aureus* diğer patojenlere göre yaygın olarak bilinen bir patojen olup birçok Multipleks Real Time uygulamalarında diğer gıda patojenleri ile beraber karakterize edilmiştir. Gıda örneklerinde *E. coli*, *C. perfringens*, *S. aureus* ve *B. cereus* patojenleri eş zamanlı olarak yeni bir Multipleks Real Time PCR metodu ile tanımlanmıştır. Tüm bakteriyel DNA'lar için tek bir izolasyon adımı ve seçici olmayan basit bir zenginleştirme uygulaması ile kısa bir süre içinde sonuçlar elde edilmiş ve kültürel metotlar ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Gıda örneklerinde 35 kob/g belirleme limiti ve 0,97 korelasyon katsayısı ile metodun hassasiyeti tespit edilmiştir (Köppel ve ark., 2016). *S. aureus*, *S. enterica*, *B. cereus* ve *Vibrio parahaemolyticus* gıda patojenleri sırası ile SAOUHSC_02297, *invA*, *hbl* ve *tlhA* genlerinin amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak karakterize edilmiştir. Oluşturulan bu yeni metotta *S. aureus* için en düşük belirlenebilen limit 0,99 hassasiyette 10^2 kob/mL olarak tespit edilmiştir (Cheng ve ark., 2012).

Çizelge 4.21. Tavuk eti numunelerinin E^R1 ve E^R2 Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>C. perfringens</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. enterica</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
T01	141,85	27,79	3,9x10 ³	10,75	3,6x10 ⁸	14,54	4,0x10 ⁸	17,36	1,6x10 ⁷	15,34	7,7x10 ⁷
T02	92,00	-	-	-	-	25,82	1,1x10 ⁵	38,87	1,2x10 ¹	10,06	4,3x10 ⁹
T03	124,45	35,52	7,3x10 ¹	8,99	1,2x10 ⁹	34,74	1,6x10 ²	10,8	1,2x10 ⁹	7,75	2,5x10 ¹⁰
T04	67,00	-	-	34,31	4,2x10 ¹	23,35	6,5x10 ⁵	19,53	3,9x10 ⁶	7,28	3,6x10 ¹⁰
T05	62,50	19,95	2,2x10 ⁵	24,48	3,3x10 ⁴	20,73	4,4x10 ⁶	28,71	9,3x10 ³	25,16	4,3x10 ⁴
T06	44,50	-	-	20,93	3,7x10 ⁵	16,68	8,4x10 ⁷	15,16	6,9x10 ⁷	12,96	4,7x10 ⁸
T07	86,05	-	-	-	-	35,22	1,1x10 ²	15,23	6,6x10 ⁷	10,14	4,1x10 ⁹
T08	64,90	16,57	1,3x10 ⁶	-	-	23,06	8,0x10 ⁵	11,32	8,7x10 ⁸	8,22	1,8x10 ¹⁰
T09	49,60	23,54	3,5x10 ⁴	21,56	2,4x10 ⁵	28,72	1,3x10 ⁴	15,24	6,6x10 ⁷	14,55	1,4x10 ⁸
T10	52,55	25,93	1,0x10 ⁴	-	-	22,96	8,7x10 ⁵	10,81	1,2x10 ⁹	10,94	2,2x10 ⁹
T11	63,25	35,13	8,9x10 ¹	19,16	1,2x10 ⁶	28,93	1,1x10 ⁴	-	-	7,64	2,7x10 ¹⁰
T12	83,30	23,2	4,2x10 ⁴	30,76	4,7x10 ²	34,3	2,2x10 ²	14,98	7,8x10 ⁷	8,26	1,7x10 ¹⁰
T13	178,50	13,05	7,7x10 ⁶	23,47	6,5x10 ⁴	32,27	9,8x10 ²	22,15	7,0x10 ⁵	14,78	1,2x10 ⁸
T14	104,10	35,36	7,9x10 ¹	-	-	30,24	4,3x10 ³	12,76	3,4x10 ⁸	9,77	5,4x10 ⁹
T15	207,80	23,42	3,7x10 ⁴	11,9	1,7x10 ⁸	38,67	9,3x10 ⁰	15,06	7,4x10 ⁷	8,97	9,9x10 ⁹
T16	290,95	30,41	1,0x10 ³	14,39	3,1x10 ⁷	16	1,4x10 ⁸	12,99	2,9x10 ⁸	8,51	1,4x10 ¹⁰
T17	285,05	13,76	5,4x10 ⁶	12,64	1,0x10 ⁸	26,83	5,2x10 ⁴	23,02	3,9x10 ⁵	14,00	2,1x10 ⁸
T18	177,80	20,09	2,1x10 ⁵	34,23	4,4x10 ¹	10,94	5,5x10 ⁹	-	-	20,88	1,1x10 ⁶
T19	185,80	34,69	1,1x10 ²	12,25	1,3x10 ⁸	24,4	3,0x10 ⁵	10,6	1,4x10 ⁹	10,70	2,6x10 ⁹
T20	135,85	-	-	13,89	4,3x10 ⁷	26,56	6,3x10 ⁴	11,37	8,4x10 ⁸	14,12	2,0x10 ⁸

Çizelge 4.21'nin devamı

Örnek	DNA	<i>C. perfringens</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. enterica</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
T21	145,20	20,19	2,0x10 ⁵	14,53	2,8x10 ⁷	14,07	5,6x10 ⁸	26,31	4,5x10 ⁴	28,38	3,7x10 ³
T22	136,40	20,08	2,1x10 ⁵	14,45	3,0x10 ⁷	13,94	6,2x10 ⁸	21,88	8,4x10 ⁵	21,35	7,9x10 ⁵
T23	114,45	23,61	3,4x10 ⁴	27,07	5,7x10 ³	15,7	1,7x10 ⁸	13,33	2,3x10 ⁸	10,73	2,6x10 ⁹
T24	158,65	18,8	4,0x10 ⁵	15,92	1,1x10 ⁷	-	-	11,23	9,2x10 ⁸	14,64	1,3x10 ⁸
T25	105,95	28,47	2,7x10 ³	17,41	4,0x10 ⁶	12,57	1,7x10 ⁹	26,49	4,0x10 ⁴	29,32	1,8x10 ³
T26	226,75	26,61	7,2x10 ³	-	-	7,21	8,3x10 ¹⁰	20,15	2,6x10 ⁶	10,95	2,2x10 ⁹
T27	164,05	35,83	6,2x10 ¹	35,13	2,4x10 ¹	15,36	2,2x10 ⁸	-	-	10,81	2,4x10 ⁹
T28	141,65	-	-	31,31	3,2x10 ²	13,68	7,4x10 ⁸	34,97	1,5x10 ²	22,61	3,0x10 ⁵
T29	198,20	-	-	-	-	15,76	1,6x10 ⁸	17,07	2,0x10 ⁷	25,39	3,6x10 ⁴
T30	212,20	-	-	-	-	21,49	2,5x10 ⁶	10,81	1,2x10 ⁹	23,7	1,3x10 ⁵
Min.	44,50	13,05	6,2x10 ¹	8,99	2,4x10 ¹	7,21	9,3x10 ⁰	10,60	1,2x10 ¹	7,28	1,8x10 ³
Maks.	290,95	35,83	7,7x10 ⁶	35,13	1,2x10 ⁹	38,67	8,3x10 ¹⁰	38,87	1,4x10 ⁹	29,32	3,6x10 ¹⁰
Ort.	136,71	25,09	7,2x10 ⁵	20,43	9,6x10 ⁷	22,23	3,2x10 ⁹	18,11	3,3x10 ⁸	14,60	5,8x10 ⁹

-; Analizlerde patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/µL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/g)

Geliştirilen E^{R1} protokolünde ise *S. aureus* patojeni için *nuc* geni hedef bölge olarak seçilmiştir. Ayrıca *S. aureus* patojeni et ve et ürünlerinde Multipleks Real Time PCR yöntemi ile çok fazla tanımlanmadığı ve dolayısıyla E^{R1} protokolünün yine alternatif bir protokol olduğu görülmüştür. E^{R2} gurubunda yer alan *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenleri için geliştirilen Multipleks Real Time PCR protokolü ile farklı et ürünlerinde mikrobiyal kontaminasyon dereceleri araştırılmıştır. Toplam 152 farklı et örneğinde yaklaşık *E. coli* O157:H7 patojeni % 19,07 ve *Salmonella* spp., için ise % 34,21 ile potansiyelleri tespit edilmiştir (Garrido ve ark., 2010). Et ve et ürünleri dışında sebze, süt ve peynir gibi farklı gıda ürünlerinde de Multipleks Real Time PCR protokolleri geliştirilmiştir (Omiccioli ve ark., 2009; Elizaquível ve ark., 2012; Yang ve ark., 2013; Delbeke ve ark., 2015).

4.3.2. Süt ve süt ürünlerinde patojen varlığının geliştirilen E^{M3} ve E^{R3} protokolleri ile belirlenmesi

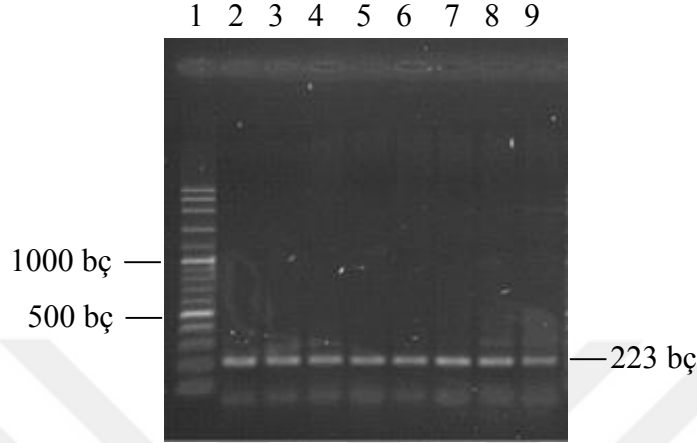
E^{M3} ve E^{R3} protokolleri süt ve süt ürünlerinde hedef mikrobiyal patojenleri tanımlamak ve mikroorganizma yükünü belirlemek için geliştirilmiştir. Geliştirilen bu manuel (E^{M3}) ve Real Time (E^{R3}) PCR metotları toplanan peynir ve süt numunelerinde kullanılarak patojen mikroorganizmaların (*B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes*) varlığı tespit edilmiştir. Peynir ve süt numunelerinden alınan laboratuvar örnekleri (1 g/ mL) zenginleştirilerek kromozomal DNA izolasyonu yapılmış ve toplam DNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Elde edilen DNA örnekleri kalıp DNA olarak kullanılarak E^{M3} ve E^{R3} PCR protokolleri ile analiz edilmiştir. E^{R3} Multipleks Real Time PCR protokolünde belirlenen regresyon denklemleri mikroorganizma sayısı için $y: -4,4843x + 54,825$ (*B. melitensis*), $y: -5,6228x + 54,144$ (*C. sakazakii*) ve $y: -4,461x + 50,03$ (*L. monocytogenes*) olarak bulunmuştur. Eşik değer döngüsü olan Ct (y) değerleri bu denklemlerde yerlerine koyularak mikroorganizma sayıları (x) hesaplanmıştır. Böylece hedef patojen mikroorganizmaların kontaminasyon dereceleri belirlenmiştir.

4.3.2.1. Peynir numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E^{M3} ve E^{R3} protokolleri ile belirlenmesi

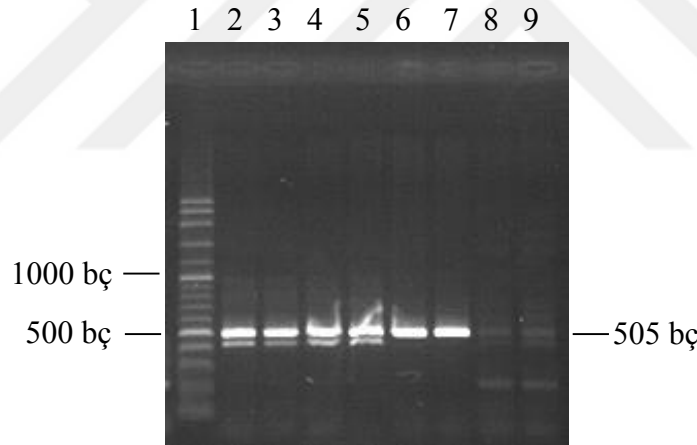
E^{M3} protokolü ile belirlenmesi

Geliştirilen E^{M3} Multipleks PCR protokolü ile 20 peynir numunesi *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmalarının varlığını tespit etmek ve metodun gıda örneklerinde uygulanabilirliğini test etmek amacıyla analiz edilmiştir. Üçlü

PCR analizlerinde hedef mikrobiyal patojenler spesifik olarak tespit edilememiş ve tekli PCR analizlerinde *B. melitensis* ve *L. monocytogenes* başarılı bir şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.67, 4.69). *C. sakazakii* ise üçlü PCR analizlerinde tanımlanamamış, takiben tekli PCR analizlerinde yaklaşık 400 ve 500 bç uzunluklarında spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.68).



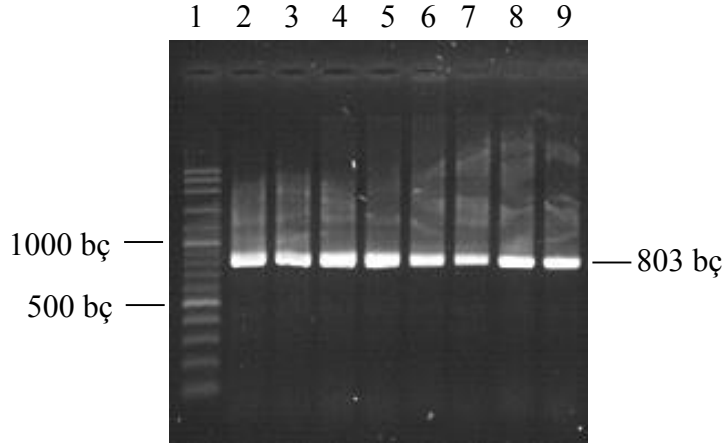
Şekil 4.67. *B. melitensis* (223 bç) mikroorganizmasının peynir numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-9: Peynir örnekleri



Şekil 4.68. *C. sakazakii* (505 bç) mikroorganizmasının peynir numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-9: Peynir örnekleri

Sonuç olarak E^M3 Multipleks PCR protokolünün peynir örneklerinde uygulanabilirliği sınırlı kalmıştır. Metodun gıda örneklerinin analizi için optimize edilmesi ve özellikle *C. sakazakii* özgü primerlerin gıda örneklerinin karışık matriksi dikkate alınarak yeniden tasarlanması gerekmektedir.

Gıdalarda patojenlerin varlığı ise Tekli PCR analizleri ile belirlenmiş ve peynir numunelerinin *B. melitensis* (17 adet) ve *L. monocytogenes* (19 adet) ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.69. *L. monocytogenes* (803 bç) mikroorganizmasının peynir numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-9: Peynir örnekleri

E^{M3} Multipleks PCR metodu ile gıda örneklerinde hedef patojenlerin tanımlanmasının üçlü PCR tepkimelerinde *C. sakazakii* mikroorganizmasından kaynaklı olarak sınırlandığı görülmüştür. Hedef patojenleri tanımlayan başka bir üçlü Multipleks PCR protokollerine rastlanmamıştır. Bu çalışmada E^{M3} protokolü hedef patojenleri eş zamanlı olarak tanımlayan ilk protokol olarak görülmektedir ama gıda numunelerinde uygulanabilirliği *C. sakazakii* patojenine özgü primerlerin gıda matrisinden dolayı kısıtlanmıştır. Bununla beraber *C. sakazakii* mikrobiyal patojeni çoklu PCR analizlerinde hedef organizma olarak yer almadığı görülmüştür. *B. melitensis* ise klinik izolatlarda diğer *Brucella* türleri ile çoklu PCR analizlerinde tanımlanmıştır (García-Yoldi ve ark., 2006; Hinic ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2011; López-Goñi ve ark., 2011). İlaveten aynı primerler kullanılarak *Brucella* türleri için konvansiyonel Multipleks PCR ve Multipleks Real Time PCR olarak iki protokol geliştirilmiştir (Hinic ve ark., 2008). Bu çalışmada da hedef patojenler için farklı primerler kullanılarak konvansiyonel Multipleks PCR ve Multipleks Real Time PCR protokolü oluşturulmuştur. Ayrıca genellikle klinik örneklerdeki *Brucella* mikroorganizmalarının potansiyeli belirlendiği görülmüştür ancak bu çalışmada farklı olarak gıda örnekleri analiz edilmiştir.

L. monocytogenes mikrobiyal patojeninin identifikasyonu için birçok Multipleks PCR metodu geliştirilmiştir. Bu patojenin serovarlarını (1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b gibi) ayırabilmek ve teşhis etmek amacıyla çoklu PCR protokolleri geliştirilmiş, klinik ve gıda izolatlarında bu serovarların varlığı araştırılmıştır (Doumith ve ark., 2004; Wei ve ark., 2005; Kerouanton ve ark., 2010; Chenal-Francisque ve ark., 2015). Bunun yanı sıra *L. monocytogenes* cins bazında ve tür bazında spesifik ve virülans genlerin varlığı ile birçok

Multipleks PCR uygulamasında da yer almıştır (Bubert ve ark., 1999; Chen ve Knabel, 2007; Kaur ve ark., 2007; Liu ve ark., 2007; Liu ve ark., 2015; Tao ve ark., 2016).

E^{R3} protokolü ile belirlenmesi

Peynir numuneleri E^{R3} protokolü hedef patojenlerin (*B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes*) kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarında elde edilen Ct değerleri kullanılarak regresyon denklemi ile patojenlerin mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir. Toplam 20 peynir numunesinde *B. melitensis* ve *C. sakazakii* 3 örnekte ve *L. monocytogenes* 1 örnekte negatif olarak bulunmuştur. Peynir numunelerinde % 85 (*B. melitensis* ve *C. sakazakii*) ve % 95 (*L. monocytogenes*) oranında hedef patojenler mikrobiyal kontaminasyon oluşturmuştur. *B. melitensis* ortalama $4,9 \times 10^9$ kob/g ile peynir numunelerinde en yüksek mikrobiyal yüke sahip mikroorganizmadır. *L. monocytogenes* ve *C. sakazakii* ise sırasıyla $5,4 \times 10^7$ ve $3,1 \times 10^6$ kob/g ile *B. melitensis* patojeninden sonra en yüksek mikrobiyal kontaminasyon oluşturmuştur. *L. monocytogenes* $8,1 \times 10^1$ - $8,1 \times 10^8$ kob/g olarak en düşük ve en yüksek mikroorganizma sayısı ile peynir örneklerinde geniş bir mikrobiyal aralığı sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.22).

B. melitensis, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmaları en çok süt ve süt ürünlerinde görülmekte ve gıdalarda hastalık oluşturabilmesi için gerekli enfeksiyon dozları 10^1 - 10^3 kob/g arasında değişmektedir. Türk Gıda Koteksi yönetmeliğine göre ise sadece *L. monocytogenes* patojeni için 0/25 g-mL olarak gıdalarda bulunabilme limiti verilmiştir. E^{R3} protokolü ile analiz edilen peynir örneklerinde bulunan patojen mikroorganizmalar ortalama olarak bu değerlerin üstünde tanımlanmıştır.

Multipleks Real Time PCR teknoloji ile *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojen mikroorganizmalarını eş zamanlı olarak tanımlayabilen bir çalışma yapılmamıştır. E^{R3} protokolü ise bu üç hedef patojeni için eş zamanlı tanımlayabilen ilk Multipleks Real Time PCR metodu niteliği taşımaktadır. E^{R3} grubunda yer alan hedef mikroorganizmalar aynı anda Multipleks Real Time PCR teknoloji ile tanımlanmasa da ayrı olarak farklı Multipleks Real Time PCR uygulamalarında tanımlanmıştır. *B. melitensis* patojeni için sınırlı sayıda çalışma olduğu gözlenmiş ve genellikle *Brucella* türleri arasında araştırmalar yapılmıştır. Süt ve süt ürünlerinde *B. melitensis* ve *Brucella* spp., belirlemek amacıyla Real Time PCR metotları oluşturulmuştur. Sığır ve manda sütü olmak üzere toplam 215 süt örneği, 6 yoğurt örneği ve 4 krema örneğinde ELİSA ve Real Time PCR olmak üzere iki farklı metotla *B. melitensis* patojeninin varlığı araştırılmıştır. Analiz sonuçlarında en az

bir metot da 38 örnek pozitif ve 177 örnekte ya ELİSA analizinde ya da Real Time PCR analizinde negatif sonuç vermiştir. Sığır sütünde 9 ve manda sütünde 7 örnekte Real Time PCR protokolü ile *B. melitensis* patojeni tanımlanmıştır (Wareth ve ark., 2014).

Çizelge 4.22. Peynir numunelerinin E^R3 Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>B. melitensis</i>		<i>C. sakazakii</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
P01	459,75	12,26	3,1x10 ⁹	30,73	1,5x10 ⁴	39,94	1,8x10 ²
P02	832,70	18,6	1,2x10 ⁸	24,06	2,2x10 ⁵	35,66	1,7x10 ³
P03	936,00	16,85	2,9x10 ⁸	28,76	3,3x10 ⁴	34,26	3,4x10 ³
P04	944,05	25,12	4,2x10 ⁶	23,03	3,4x10 ⁵	19,1	8,6x10 ⁶
P05	117,17	12,62	2,6x10 ⁹	28,45	3,7x10 ⁴	21,85	2,1x10 ⁶
P06	402,55	11,83	3,8x10 ⁹	21,32	6,9x10 ⁵	10,31	8,1x10 ⁸
P07	555,05	9,2	1,5x10 ¹⁰	16,18	5,6x10 ⁶	30,79	2,1x10 ⁴
P08	923,65	16,3	3,9x10 ⁸	14,13	1,3x10 ⁷	30,75	2,1x10 ⁴
P09	358,80	24,48	5,8x10 ⁶	17,64	3,1x10 ⁶	24,82	4,5x10 ⁵
P10	385,05	7,35	3,8x10 ¹⁰	25,5	1,2x10 ⁵	19,07	8,8x10 ⁶
P11	307,70	33,46	5,8x10 ⁴	16	6,1x10 ⁶	28,7	6,1x10 ⁴
P12	721,35	13,83	1,4x10 ⁹	13,08	2,0x10 ⁷	29,35	4,3x10 ⁴
P13	502,10	27,96	9,8x10 ⁵	-	-	28,65	6,2x10 ⁴
P14	368,50	16,31	3,9x10 ⁸	32,78	6,3x10 ³	32,97	6,7x10 ³
P15	330,55	-	-	26,38	8,7x10 ⁴	24,81	4,5x10 ⁵
P16	577,55	12,61	2,6x10 ⁹	27,09	6,5x10 ⁴	-	-
P17	848,75	-	-	20,91	8,1x10 ⁵	41,53	8,1x10 ¹
P18	474,95	-	-	-	-	13,21	1,8x10 ⁸
P19	168,40	14,55	9,5x10 ⁸	-	-	16,84	2,8x10 ⁷
P20	452,10	13,39	1,7x10 ⁹	17,76	3,0x10 ⁶	31,14	1,7x10 ⁴
Min.	117,17	7,35	5,8x10 ⁴	13,08	6,3x10 ³	10,31	8,1x10 ¹
Maks.	944,05	33,46	3,8x10 ¹⁰	32,78	2,0x10 ⁷	41,53	8,1x10 ⁸
Ort.	533,34	16,87	4,2x10 ⁹	22,58	3,1x10 ⁶	27,04	5,4x10 ⁷

-; Analizlerde patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/g)

Yine manda sütünde Real Time PCR ile *Brucella* türleri araştırılmıştır. Bruselloz enfeksiyonuna yakalanmış hayvanlar ve sağlıklı hayvanlardan toplam 109 süt örneği toplanmıştır. Real Time PCR analizi sonucunda sağlıklı manda sütlerinin hepsi (20 adet) ve enfeksiyona yakalanmış manda sütlerinden 20 örnekte amplifikasyon gözlenmemiştir. Bununla birlikte enfeksiyona yakalanmış manda sütlerinden 27 süt örneği analizlerde pozitif sonuç vermiştir. Bu süt örnekleri aynı zamanda serolojik ve kültürel metotlar ile de analiz edilmiş, en hassas sonuçlar Real Time PCR ile alınmıştır (Amoroso ve ark., 2011).

E^R3 protokolü ile peynir numuneleri Multipleks Real Time PCR analizlerinde patojenler için pozitif sonuçlar elde edilmiş ve peynir numunelerinin kontamine olduğu anlaşılmıştır. *B. melitensis* patojeni için genellikle cins yada tür bazında, klinik izolatlarda,

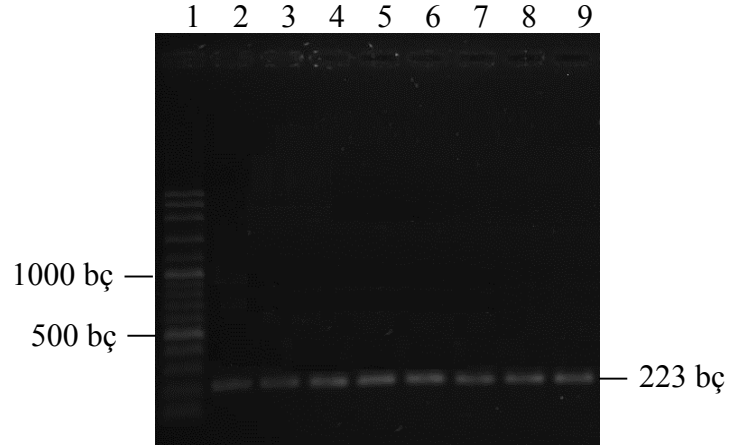
nadiren Multipleks Real Time PCR ve fazla sayıda olmayan Real Time PCR protokolleri geliştirilmiştir (Probert ve ark., 2004; Hinic ve ark., 2008; Queipo-Ortuno ve ark., 2009; Winchell ve ark., 2010; Doosti ve Dehkordi, 2011).

4.3.2.2. Süt numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E^{M3} ve E^{R3} protokolleri ile belirlenmesi

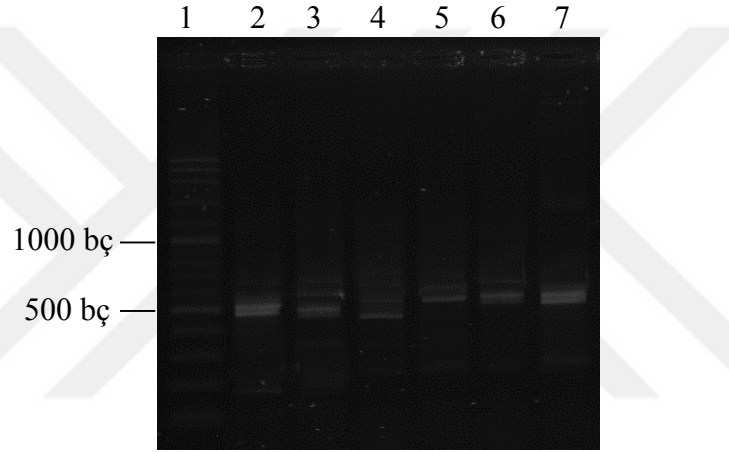
E^{M3} protokolü ile belirlenmesi

B. melitensis, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojenlerinin süt numunelerinde varlığını belirlemek için E^{M3} Multipleks PCR protokolü ile analizler gerçekleştirilmiştir. Çoklu PCR analizlerinde peynir örneklerinde olduğu gibi spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşması nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Tekli PCR analizlerinde ise yine *B. melitensis* ve *L. monocytogenes* tespit edilmişken *C. sakazakii* patojeni birden fazla PCR ürünü ile özgün olarak belirlenememiştir (Şekil 4.70, 4.71, 4.72). Gıda matrisi ile yeterince spesifik olmayan *C. sakazakii* primerleri etkileşimi girmiş ve fazla amplifikasyon ürünü oluşumuna neden olmuş olabilir. Tekli PCR analizlerinde *B. melitensis* ve *L. monocytogenes* toplam 25 süt numunesinin 24 adedinde pozitif olarak sonuç vermiştir. Böylece süt numunelerine hedef patojenlerin (*B. melitensis* ve *L. monocytogenes*) bulaşarak mikrobiyal kontaminasyon oluşturduğu tespit edilmiştir.

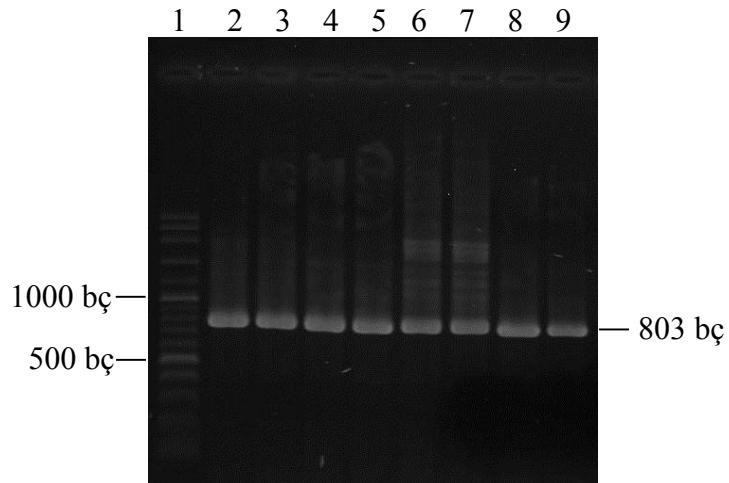
E. coli O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* gibi gıda kaynaklı mikrobiyal patojenler *L. monocytogenes* ile birlikte eş zamanlı olarak Multipleks PCR protokolleri ile karakterize edilmiş ve gıdalarda patojenlerin varlığı tespit edilmiştir (Jofre ve ark., 2005; Kawasaki ve ark., 2005; Kim ve ark., 2007; Mukhopadhyay ve Mukhopadhyay, 2007; Germini ve ark., 2009). Yeni geliştirilen bir Multipleks PCR metodunda *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* ve *S. aureus* patojenleri çeşitli tüketime hazır gıdalarda eş zamanlı olarak tanımlanmıştır. Mikrobiyal patojenlere özgü 6 çift primer ile beraber toplam bakteriyel DNA'yı belirlemek amacıyla internal kontrol olarak 16S rRNA genine özgü primerler de analizlere dahil edilmiştir. Metodun hassasiyetini belirlemek amacıyla 10¹ -10⁸ kob/mL aralığında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Zenginleştirmeden sonra (12 s) yapay olarak kontamine edilmiş gıda örneklerinde 10⁰ kob/mL'ye kadar patojenler tespit edilebilmiştir (Lee ve ark., 2014).



Şekil 4.70. *B. melitensis* (223 bç) mikroorganizmasının süt numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-9: Süt örnekleri



Şekil 4.71. *C. sakazakii* (505 bç) mikroorganizmasının süt numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-7: Süt örnekleri



Şekil 4.72. *L. monocytogenes* (803 bç) mikroorganizmasının süt numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-9: Süt örnekleri

Yine benzer şekilde 5 gıda kaynaklı patojenin (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. ve *Yersinia enterocolitica*) gıda örneğinde belirleme limiti 10^3 kob/mL olarak belirlenmiştir (Guan ve ark., 2013). *L. monocytogenes* mikrobiyal patojeni yaygın olarak bilinen *Salmonella* spp., *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7 patojenleri ile birlikte eş zamanlı olarak genellikle et ve et ürünlerinde karakterize edilmiştir. Bu çalışmada ise *L. monocytogenes* patojeni *C. sakazakii* ve *B. melitensis* ile birlikte çoklu PCR protokolü ile tanımlanmış, süt ve süt ürünlerinde uygulanabilirliği araştırılmıştır. Bu yönü ile diğer protokollerden farklılık göstermektedir.

E^R3 protokolü ile belirlenmesi

E^R3 protokolü ile 25 farklı süt numunesinden örnekler alınarak analiz edilmiş ve hedef patojenler için Ct değerleri belirlenmiştir. Elde edilen Ct değerleri kullanılarak regresyon denklemi ile mikroorganizma sayıları hesaplanmıştır. *B. melitensis* ve *L. monocytogenes* 1 adet örnekte negatif sonuç oluşturmuştur. *C. sakazakii* ise tüm üst örneklerinde pozitif olarak belirlenmiştir. *B. melitensis* $9,0 \times 10^9$ kob/mL ile en yüksek ve *C. sakazakii* ise $8,7 \times 10^4$ kob/mL ile en düşük mikrobiyal yüke sahip patojen olarak tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* patojeni ise yaklaşık 10^1 - 10^8 kob/mL ile diğer patojenlere oranla en geniş dinamik aralığa sahip mikroorganizmadır. Süt numunelerine mikrobiyal kontaminasyon derecesi *B. melitensis* ve *L. monocytogenes* % 96 ve *C. sakazakii* ise % 100 oranında bulunmuştur (Çizelge 4.23).

E^R3 grubunda yer alan *C. sakazakii* ile ilgili Multipleks Real Time PCR uygulamaları araştırıldığında çok fazla çalışma bulunmayıp, bu patojenin potansiyeli genellikle bebek mamalarında araştırılmıştır. 2010 yılında *C. sakazakii* ve *Salmonella* eş zamanlı bebek mamasında tanımlanmıştır. Bu iki patojen için geliştirilen Multipleks Real Time PCR metodunda yanlış negatif sonuçları elemine etmek amacıyla internal kontrol kullanılmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,99 olarak bulunmuş, yapay olarak bebek mamaları kontamine edilerek ise metodun belirleme limiti her iki patojen içinde zenginleştirme olmadan 10^3 kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bebek mamasında patojenlerin potansiyelleri belirlenmemiştir (Hyeon ve ark., 2010). Bu çalışmada da benzer şekilde internal kontrol kullanılmış ve tüm Real Time PCR analizlerinde pozitif sonuç elde edilmiştir. *C. sakazakii* ile ilgili Real Time PCR analizlerinde ise yeni geliştirilen protokollerin hassasiyetini ve yapay olarak kontamine edilen bebek mamalarında en düşük

belirleme limiti tespit edilmiştir (Seo ve Brackett, 2005; Liu ve ark., 2006; Yi ve ark., 2010; Soler ve ark., 2011; Jun-Ichi ve ark., 2012; Cai ve ark., 2013).

Çizelge 4.23. Süt numunelerinin E^{R3} Multipleks Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>B. melitensis</i>		<i>C. sakazakii</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Ct	M.S.	Ct	M.S.	Ct	M.S.
St 01	304,60	12,46	2,8x10 ⁹	37,93	7,7x10 ²	30,07	3,0x10 ⁴
St 02	389,30	10,52	7,5x10 ⁹	22,77	3,8x10 ⁵	34,48	3,1x10 ³
St 03	499,80	7,79	3,1x10 ¹⁰	35,55	2,0x10 ³	40,22	1,6x10 ²
St 04	486,20	8,62	2,0x10 ¹⁰	23,18	3,2x10 ⁵	22,98	1,2x10 ⁶
St 05	291,30	15,68	5,3x10 ⁸	41,39	1,9x10 ²	37,46	6,6x10 ²
St 06	470,10	8,61	2,0x10 ¹⁰	25,16	1,4x10 ⁵	26,83	1,6x10 ⁵
St 07	502,30	8,26	2,4x10 ¹⁰	37,92	7,7x10 ²	36,46	1,1x10 ³
St 08	505,10	9,28	1,4x10 ¹⁰	35,86	1,8x10 ³	35,89	1,5x10 ³
St 09	114,90	20,51	4,5x10 ⁷	29,6	2,3x10 ⁴	29,39	4,2x10 ⁴
St 10	258,23	-	-	37,46	9,3x10 ²	34,47	3,1x10 ³
St 11	390,10	13,3	1,8x10 ⁹	30,41	1,7x10 ⁴	32,11	1,0x10 ⁴
St 12	249,00	14,68	8,9x10 ⁸	31,86	9,2x10 ³	16,14	4,0x10 ⁷
St 13	247,80	13,01	2,1x10 ⁹	42,21	1,3x10 ²	30,44	2,5x10 ⁴
St 14	574,60	9,12	1,5x10 ¹⁰	40,18	3,0x10 ²	-	-
St 15	596,60	8,87	1,8x10 ¹⁰	25,96	1,0x10 ⁵	33,84	4,3x10 ³
St 16	262,10	15,72	5,2x10 ⁸	25,93	1,0x10 ⁵	41,99	6,3x10 ¹
St 17	103,90	28,04	9,4x10 ⁵	21,96	5,3x10 ⁵	32,05	1,1x10 ⁴
St 18	685,60	9,88	1,0x10 ¹⁰	39,6	3,9x10 ²	41,1	1,0x10 ²
St 19	885,20	8,30	2,4x10 ¹⁰	24,97	1,5x10 ⁵	15,47	5,6x10 ⁷
St 20	410,10	12,74	2,4x10 ⁹	28,67	3,4x10 ⁴	20,68	3,8x10 ⁶
St 21	208,90	28,27	8,3x10 ⁵	24,7	1,7x10 ⁵	36,97	8,5x10 ²
St 22	696,90	8,97	1,7x10 ¹⁰	25,57	1,2x10 ⁵	19,23	8,0x10 ⁶
St 23	161,00	26,93	1,7x10 ⁶	27,59	5,3x10 ⁴	32,2	9,9x10 ³
St 24	198,60	27,66	1,1x10 ⁶	37,07	1,1x10 ³	21,59	2,4x10 ⁶
St 25	342,70	11,89	3,7x10 ⁹	34,99	2,5x10 ³	13,62	1,5x10 ⁸
Min.	103,90	7,79	8,3x10 ⁵	21,96	1,3x10 ²	13,62	6,3x10 ¹
Maks.	885,20	28,27	3,1x10 ¹⁰	42,21	5,3x10 ⁵	41,99	1,5x10 ⁸
Ort.	393,40	14,13	9,0x10 ⁹	31,54	8,7x10 ⁴	29,82	1,1x10 ⁷

-; Analizlerde patojen varlığı negatif çıkan örnekler, DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/mL)

Bu çalışmada ise süt ve peynir numunelerinden oluşan toplam 45 örnekte *C. sakazakii* patojeninin potansiyeli belirlenmiştir. E^{R3} protokolü ile analiz edilen peynir ve süt örneklerinde sadece 3 (% 6,6) peynir örneğinde negatif sonuç elde edilmiş ve diğer örneklerde *C. sakazakii* patojeni % 93,3 kontaminasyon derecesi ile tespit edilmiştir. *C. sakazakii* süt ve peynir örnekleri için çoklu Real Time PCR uygulamalarında bu çalışma ile ilk defa tespit edildiği görülmüştür. E^{R3} grubunda yer alan, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar arasında yaygın olarak bilinen *L. monocytogenes* mikrobiyal patojeni ile ilgili birçok Multipleks Real Time protokolü tanımlanmıştır. Peynir ve sütte eş zamanlı

olarak *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* mikrobiyal patojenlerin potansiyeli araştırılmıştır. *L. monocytogenes* koyun sütü ve peynirinde pozitif sonuç vermemiştir (Amaglian ve ark., 2016). Yine *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* patojenleri için geliştirilen Multipleks Real Time PCR metodunda yapay olarak kontamine edilmiş yağsız sütlerde 6 saat zenginleştirme işlemi sonunda her iki patojen içinde belirleme limiti 1×10^0 kob/mL'ye kadar düşmüştür (Singh ve ark., 2012). *L. monocytogenes* patojeni et ve et ürünleri ve sebze gibi diğer gıda örneklerinde de çoklu Real Time PCR uygulamalarında tanımlanmıştır (Elizaquível ve ark., 2012; Garrido ve ark., 2013; Xiao ve ark., 2014; Skerniskyte ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015; He ve ark., 2016). Bu çalışmada ise E^{R3} protokolü ile analiz edilen toplam 45 örnekten 1 süt örneği ve 1 peynir örneğinde (% 4,4) negatif sonuç oluşturarak örneklerin *L. monocytogenes* patojen ile kontamine olmadığı belirlenmiş ve 43 örnekte (% 95,5) *L. monocytogenes* analizinde pozitif sonuç oluşturarak patojenin varlığı tespit edilmiştir.

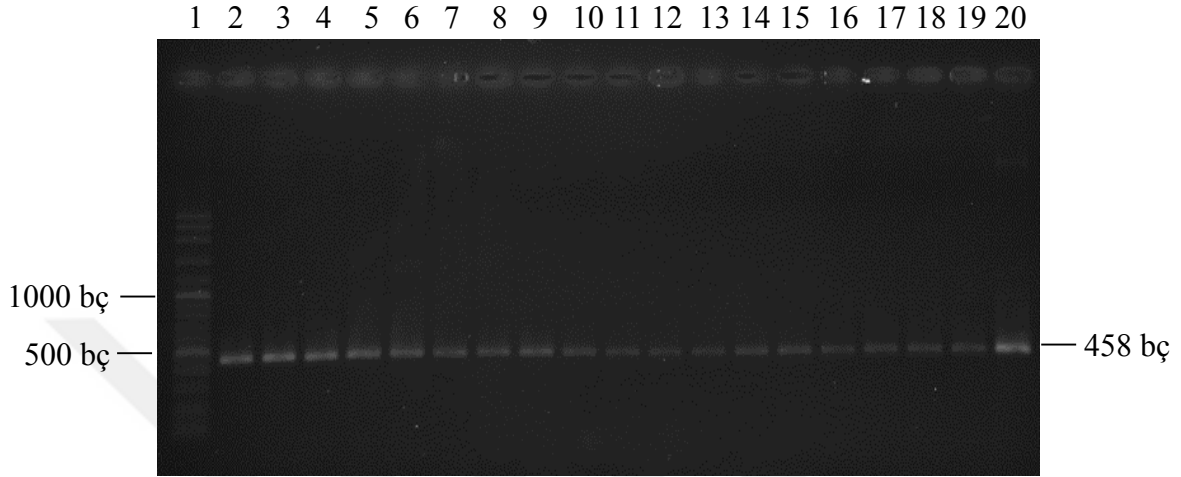
4.3.3. Su numunelerinde patojen varlığının geliştirilen E^{M4} ve E^{R4} protokolleri ile belirlenmesi

E^{M4} ve E^{R4} protokolleri su numunelerinde hedef mikrobiyal patojeni tanımlamak ve mikroorganizma yükünü belirlemek için geliştirilmiştir. Geliştirilen bu manuel (E^{M4}) ve Real Time (E^{R4}) PCR metotları toplanan su numunelerinde kullanılarak patojen mikroorganizmanın (*K. pneumoniae*) varlığı tespit edilmiştir. Su numunelerinden alınan laboratuvar örnekleri (1 mL) zenginleştirilerek toplam kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri kalıp DNA olarak kullanılarak E^{M4} ve E^{R4} PCR protokolleri ile analiz edilmiştir. E^{R4} protokolü ile *K. pneumoniae* için hedef gen amplifikasyonu sonucu 0,995 hassasiyetle Unipleks Real Time PCR metodu uygulanmıştır. Hedef gen için mikroorganizma sayısı $y: -3,7162x + 45,126$ regresyon denklemleri ile hesaplanmıştır. Analiz sonucu elde edilen Ct değerleri (y) denklemlerde yerine koyulmuş ve örneklerdeki mikroorganizma sayıları tespit edilmiştir.

4.3.3.1. E^{M4} protokolü ile belirlenmesi

A. hydrophila, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* E^{M4} grubu içerisinde yer alan patojen mikroorganizmalardır ve PCR analizlerinde 16S rRNA hedef bölgesinin çoğaltılması ile tanımlanması amaçlanmıştır. Ancak E^{M4} grubu için yapılan metot optimizasyon çalışmalarında primerlerin özgün olmayıp birbirleri ile etkileşimi girdiği düşünülmüş ve

sadece *K. pneumoniae* patojeni için Unipleks PCR metodu oluşturulmuştur. *K. pneumoniae* patojen mikroorganizmasının farklı bölgelerden toplanan su örneklerinde varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan Unipleks PCR analizleri sonucunda toplam 20 farklı su numunesinde *K. pneumoniae* patojen mikroorganizması kalitatif olarak tanımlanmış ve bütün numunelerde varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.73).



Şekil 4.73. *K. pneumoniae* (458 bç) patojeninin su numuneleri Unipleks PCR görüntüsü. 1: Markır, 2-19: Su örnekleri, 20: Referans patojen

K. pneumoniae patojeni hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu en önemli patojenler arasında yer almaktadır. Bu nedenle bu patojen ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle klinik izolatlarda özellikle patojenite ile ilişkili kapsül tiplerini belirlemek ve direnç genlerini tespit etmek için yapılan PCR tanımlamalardır (Diancourt ve ark., 2005; Leavitt ve ark., 2007; Turton ve ark., 2010).

K. pneumoniae patojeninin 16S-23S rDNA transkribe olan iç boşluklar (internal transcribed spacer, ITS) bölgesinin amplifikasyonuna bağlı olarak bebek mamasında yeni bir PCR metodu ile tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2008). Su örneklerinde ise ilgili çalışmalara rastlanmamış, bu nedenle *K. pneumoniae* mikrobiyal patojenin su örneklerindeki potansiyeli ilk olarak bu çalışmada belirlendiği görülmüştür.

4.3.3.2. E^R4 protokolü ile belirlenmesi

E^R4 Real Time PCR metodu sadece *K. pneumoniae* patojenini tanımlamak üzere geliştirilmiş ve toplam 20 adet su örneğinde 3 tekrarlı olarak analizler gerçekleştirilmiştir. *K. pneumoniae* patojeninin su örneklerindeki dinamik aralığı $1,0 \times 10^4$ - $4,0 \times 10^9$ kob/mL arasında değişiklik göstermektedir (Çizelge 4.24). Analiz edilen su örneklerinin % 100 oranda *K. pneumoniae* patojeni ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

K. pneumoniae hastane kaynaklı bir patojen olup en çok klinik örneklerde tanımlanmıştır. Bununla birlikte memelerin sindirim sistemi ve yüzey suları, bitki ve toprak gibi çevresel kaynaklarda bu patojenin habitatları arasında yer almaktadır (Podschun ve ark., 2001).

Bu çalışmada yüzey su örneklerinde *K. pneumoniae* mikrobiyal patojenin potansiyeli Real Time PCR teknoloji ile tespit edilmiştir. Yapılan Real Time PCR ve Multipleks Real Time PCR uygulamaları incelendiğinde, genellikle klinik örneklerde *K. pneumoniae* suşlarında karbapenem direnç genlerinin karakterize edildiği görülmüştür (Cole ve ark., 2009; Chen ve ark., 2011; Chen ve ark., 2012; Singh ve ark., 2012).

Çizelge 4.24. Su numunelerinin E^{R4} Real Time PCR sonuçları

Örnek	DNA	<i>K. pneumoniae</i>	
		Ct	M.S.
Su 01	567,20	18,15	1,8x10 ⁷
Su 02	577,00	18,67	1,3x10 ⁷
Su 03	233,40	28,86	2,4x10 ⁴
Su 04	761,90	10,79	1,7x10 ⁹
Su 05	503,10	17,61	2,5x10 ⁷
Su 06	307,50	22,01	1,7x10 ⁶
Su 07	190,30	21,62	2,1x10 ⁶
Su 08	202,00	21,47	2,3x10 ⁶
Su 09	167,10	20,22	5,0x10 ⁶
Su 10	366,90	23,10	8,4x10 ⁵
Su 11	994,30	9,45	4,0x10 ⁹
Su 12	794,10	10,80	1,7x10 ⁹
Su 13	412,80	20,56	4,1x10 ⁶
Su 14	543,30	18,46	1,5x10 ⁷
Su 15	751,90	11,57	1,1x10 ⁹
Su 16	648,30	10,79	1,7x10 ⁹
Su 17	259,80	28,19	3,6x10 ⁴
Su 18	100,20	30,19	1,0x10 ⁴
Su 19	313,30	22,34	1,4x10 ⁶
Su 20	692,70	11,09	1,4x10 ⁹
Min.	100,20	9,45	1,0x10 ⁴
Maks.	994,30	30,19	4,0x10 ⁹
Ort.	476,44	18,80	5,9x10 ⁸

DNA; Ölçülen Toplam DNA konsantrasyonu (ng/μL), M.S.; Hesaplanan mikroorganizma sayısı (kob/mL)

K. pneumoniae mikroorganizmasının da yer aldığı hastane kaynaklı patojenleri tanımlamak için Multipleks PCR ve Multipleks Real Time PCR protokolleri geliştirilmiştir. Toplam 300 klinik örnek test edilmiş, konvansiyonel PCR ile 46 örnek ve Multipleks Real

Time PCR ile 43 örnek amplifikasyonu sonucu pozitif olarak belirlenmiştir. Multipleks Real Time PCR ile negatif sonuç veren diğer 3 izolatın primer kaynaklı olarak farklılık oluşturduğu düşünülmüştür. Sonuçlar ise kültürel yöntemler ile doğrulanmıştır (Anbazhagan ve ark., 2011). Bu çalışmada su örnekleri konvansiyonel PCR ve Real Time PCR ile analiz edilmiş, iki farklı uygulamadan elde edilen sonuçlar birbiri ile % 100 uyumlu bulunmuştur.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaygın olarak bilinen on iki farklı gıda kaynaklı patojen mikroorganizmanın (*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteridis* ve *Staphylococcus aureus*) Konvansiyonel PCR ve Real Time PCR yaklaşımları ile karakterize edebilmek için geliştirilen yöntemler ve gıda örneklerinde bu yöntemlerin uygulanabilirliği ile ilgili sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

On iki farklı patojen mikroorganizmalara ait referans suşlar temin edilmiştir. Referans patojen suşlar kendilerine özgü inkubasyon koşullarında büyütülmüş, Konvansiyonel PCR yöntemi ile tanımlanmış ve nükleotid dizileme ile türlerin doğruluğu teyit edilmiştir.

Konvansiyonel PCR ile tanımlamada literatürlerden seçilen tür seviyesinde 16S rRNA bölgesine özgü primerler kullanılmıştır. *E. coli* O157:H7 referans suşunun tanımlaması ise *flic* gen bölgesinin amplifikasyonu ile yapılmıştır. Tüm referans patojen suşların moleküler tanımlamaları başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. PCR tanımlamasını takiben PCR ürünlerinin ileri ve geri yönde nükleotid dizilemesi yapılmış ve konsensus diziler oluşturulmuştur. Konsensus diziler Blast programı kullanılarak Genbank veri tabanında yer alan diziler ile benzerlikleri karşılaştırılmış ve türlerin doğruluğu % 99-100 benzerlik ile teyit edilmiştir.

Patojen mikroorganizmalar en çok bulunduğu gıdalar ve enfeksiyon dozları dikkate alınarak 4 grup oluşturulmuş ve E1, E2, E3 ve E4 olarak isimlendirilmiştir. E1 grubu (*C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus*) et ve et ürünlerinde yüksek enfeksiyon dozunda bulunan ve E2 grubu (*C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica*) ise yine et ve et ürünlerinde düşük dozunda bulunan patojen mikroorganizmalardır. E3 grubu (*B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes*) süt ve süt ürünlerinde yüksek dozda enfeksiyona neden olan bakterilerden oluşturulmuştur. E4 grubu (*A. hydrophila*, *B. cereus* ve *K. pneumoniae*) genellikle su ve sebzelerden bulaşarak hastalığa neden olan patojenleri kapsayacak şekilde oluşturulmuştur.

Bu patojen mikroorganizmalar için gruplar baz alınarak E^M1, E^M2, E^M3 ve E^M4 olarak isimlendirilen yeni Multipleks Konvansiyonel PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Öncelikle primerlerin grup içerisinde özgünlükleri biyoinformatik olarak kontrol edilmiş ve

spesifik olmayan primerlerin yerine yeni primerler (Bc2R, Cp2R, Kp2F ve Sa2R) tasarlanmıştır. Bu yeni tasarlanan primerler hedef patojenler için ileriki çalışmalarda alternatif olarak sunulmuştur.

Multipleks Konvansiyonel PCR optimizasyon aşamasında primer ve konsantrasyonları başta olmak üzere PCR koşullarında çeşitli modifikasyonlar uygulanmıştır. Kalıp DNA olarak steril suda çözülmüş koloniler ve kit kullanılarak izole edilen kromozomal DNA'lar kullanılmış ve metot optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. E^{M1} grubu optimizasyonu sonucunda *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* mikrobiyal patojenleri başarılı bir şekilde tanımlanmıştır.

E^{M2} grubu optimizasyonu sonucunda *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* referans patojenlerinin aynı reaksiyonda mikrobiyal tanımlaması gerçekleştirilmiştir. E^{M2} grubu içerisinde planlanan *C. jejuni* ise multipleks reaksiyonlarda tanımlanamamış ve bu nedenle E^{M2} grubuna dahil edilememiştir.

E^{M3} grubu optimizasyonu sonucunda *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* referans suşlarının amplifikasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. E^{M3} yöntemi önceki çalışmalar incelendiğinde hedef patojenler için ilk Multipleks PCR yöntemi olduğu görülmüştür.

E^{M4} grubu optimizasyonunda ise *A. hydrophila*, *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojenleri için tekli PCR amplifikasyonlarda ve *B. cereus* ve *K. pneumoniae* patojenleri için ikili PCR amplifikasyonlarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Hedef patojenleri karakterize etmek için Taqman belirleme teknoloji kullanılarak Real Time PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Öncelikle patojenlere özgü virülans genler hedef bölge olarak seçilmiş ve bu bölgelere özgü primer ve proplar belirlenmiştir. Takiben hedef patojen mikroorganizmaların kromozomal DNA izolasyonları ve mikroorganizma sayımları yapılmıştır. Real Time PCR analizlerinden önce Kalıp DNA konsantrasyonu ve mikroorganizma sayısı arasındaki korelasyon incelenmiştir. Farklı sayıda koloni bulunduran kültürlerden izole edilen DNA miktarı ile koloni sayıları ilişkilendirilmiş ve aralarında güçlü bir korelasyon ($r^2=0.99$) tespit edilmiştir. Böylece DNA konsantrasyonu ile elde edilen amplifikasyonların mikroorganizma sayısı içinde uygulanabilir nitelikte olduğu belirlenmiştir.

Her bir patojen mikroorganizma için uygun PCR bileşenleri ve amplifikasyon şartları belirlenerek Unipleks Real Time PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. İlaveten

analizlerde internal amplifikasyon kontrolü için universal 16S rRNA bölgesinde amplifiye edilmiştir.

Real Time PCR ile kalıp DNA konsantrasyonu ve amplifikasyon arasındaki korelasyonu tespit etmek için izole edilen kromozomal DNA'lardan seri seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltilen DNA dilusyonlarının analizleri sonucunda DNA konsantrasyonu ve eşik değer döngüleri (Ct değerleri) arasındaki logaritmik ilişkiyi belirleyen kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Ayrıca, izole edilen DNA'ların mikroorganizma sayımı yapıldığından mikroorganizma sayısının logaritmik değerine karşı Ct değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve mikroorganizma sayısı ile Ct değeri arasındaki ilişki belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları 0,98-0,99 arasında değişiklik göstermiştir. Bu değer metodun hassasiyetini belirlemektedir.

Multipleks Real Time PCR uygulamasında ise E^{R1}, E^{R2}, E^{R3} ve E^{R4} olmak üzere 4 farklı reaksiyon oluşturulması planlanmıştır. Metot optimizasyonunda primer ve prob konsantrasyonları başta olmak üzere PCR koşullarında farklı değişiklikler yapılmış ve optimum koşullar belirlenmiştir. Seyreltilmiş DNA dilusyonlarının analizleri ile eşik değer döngüleri belirlenmiş ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.

E^{R1} protokolü optimizasyon sonucunda *C. perfringens*, *E. faecalis* ve *S. aureus* için 0,98-0,99 korelasyon katsayısı aralığında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. E^{R1} protokolü hedef patojenler için öncü Multipleks Real Time PCR yöntemidir. E^{R2} protokolü optimizasyon sonucunda *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* için 0,98-0,99 korelasyon katsayılarına sahip kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. E^{R3} protokolü optimizasyon sonucunda *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* ise 0,98-0,99 korelasyon katsayısı aralığında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. E^{R4} protokolü optimizasyon sonucunda ise *K. pneumoniae* mikrobiyal patojeni 0,99 hassasiyetle kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Çalışma kapsamında geliştirilen Multipleks Konvansiyonel PCR ve Multipleks Real Time PCR yöntemlerinin gıda örneklerinde uygulanabilirliğini test etmek ve gıdalardaki hedef patojen mikroorganizmaların potansiyellerini belirlemek amacıyla gıda örnekleri toplanmış ve analiz edilmiştir. E^{M1} ve E^{M2} protokollerini koyun, sığır ve tavuk eti örneklerinde uygulanabilirliği incelenmiştir. Protokoller ile analiz edilen et örneklerinin tanımlaması sınırlı kalmış, örnekler Tekli PCR protokollerinde tanımlanmıştır. E^{M3} protokolünün süt ve peynir örneklerinde uygulanabilirliği test edilmiştir. Geliştirilen protokol analiz edilen örneklerde hedeflendiği gibi üçlü olarak değil tekli PCR protokolü ile

tanımlanmıştır. E^M4 protokolünde ise 20 adet su numunesinde *K. pneumoniae* patojen mikroorganizmasının tanımlanması yapılmıştır. *K. pneumoniae* mikrobiyal patojeni analiz edilen su numunelerinde pozitif sonuç vermiş ve böylece analiz edilen su numunelerinin *K. pneumoniae* patojeni ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Gıda örneklerinin karışık matriksi özellikle primerlerin istenilen özgünlükte olmaması ile beraber fazla amplifikasyon ürünlerinin oluşmasına neden olmuştur. Örnek hazırlama sürecinde veya PCR analizi sırasında inhibisyona neden olan etmenlerin elemine edilmesi gerekmektedir. PCR etkinliğini artırıcı maddeler (DMSO ve BSA gibi) gıda matriksinden kaynaklı inhibitörleri elemine etmek için çözüm oluşturabilir.

Geliştirilen Multipleks Real Time PCR yöntemlerinde E^R1 ve E^R2 protokolleri için 41 adet koyun eti, 40 adet sığır eti ve 30 adet tavuk eti numunesi, E^R3 protokolü için ise 25 adet süt numunesi ve 20 adet peynir numunesi ve E^R4 protokolü için ise 20 adet su numunesi analiz edilmiştir. E^R1 protokolü ile analiz edilen koyun eti numunelerinde en çok *S. aureus* patojen mikroorganizması ($7,7 \times 10^8$ kob/g) belirlenmiştir. *E. faecalis* ($4,9 \times 10^6$ kob/g) ve *C. perfringens* ($8,1 \times 10^4$ kob/g) daha düşük mikrobiyal yük ile koyun eti örneklerinde tespit edilmiştir. Sığır eti örneklerinde mikrobiyal yük *C. perfringens* için $2,7 \times 10^5$ kob/g, *E. faecalis* için $5,6 \times 10^5$ kob/g ve *S. aureus* için $1,3 \times 10^8$ kob/g tespit edilmiştir. Tavuk eti örneklerinde ise $7,2 \times 10^5$ kob/g (*C. perfringens*), $9,6 \times 10^7$ kob/g (*E. faecalis*) ve $3,2 \times 10^9$ kob/g (*S. aureus*) patojen mikroorganizmalar için tespit edilen mikroorganizma sayılarıdır.

E^R2 protokolü ile analiz edilen et örneklerinde ise *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojen mikroorganizmaların potansiyeli belirlenmiştir. Sırasıyla, koyun eti örneklerinde $1,2 \times 10^7$ kob/g ve $3,6 \times 10^9$ kob/g, sığır eti örneklerinde $2,1 \times 10^8$ kob/g ve $3,4 \times 10^9$ kob/g ve tavuk eti örneklerinde ise $3,3 \times 10^8$ kob/g ve $5,8 \times 10^9$ kob/g ile *E. coli* O157:H7 ve *S. enterica* patojenlerinin gıdalardaki potansiyeli tespit edilmiştir. Et örneklerinde *S. enterica* patojeninin *E. coli* O157:H7 oranla daha yüksek miktarda mikrobiyal yüke sahip olduğu tespit edilmiştir.

E^R3 protokolü ile süt ve peynir örnekleri analiz edilmiş ve *B. melitensis*, *C. sakazakii* ve *L. monocytogenes* patojenleri karakterize edilmiştir. Süt örneklerinde *B. melitensis* için $4,2 \times 10^9$ kob/mL, *C. sakazakii* için $3,1 \times 10^6$ kob/mL ve *L. monocytogenes* için $5,4 \times 10^7$ kob/mL mikroorganizma sayısı belirlenmiştir. Peynir örneklerinde ise *B. melitensis* için $9,0 \times 10^9$ kob/g, *C. sakazakii* için $8,7 \times 10^4$ kob/g ve *L. monocytogenes* $1,1 \times 10^7$ kob/g mikrobiyal yük ile patojenler tespit edilmiştir. Süt ve peynir örneklerinde *B. melitensis* patojeni diğer patojenlere oranla daha yüksek mikrobiyal potansiyele sahip olduğu

görülmüştür. E^{M3} ve E^{R3} protokolleri ile süt ve peynir örneklerinde hedef patojenlerin potansiyeli belirlenmiş ve böylelikle *B. melitensis* ve *C. sakazakii* patojenlerinin farklı gıda örneklerindeki varlığı da değerlendirilmiş olmaktadır. E^{R4} protokolü ile *K. pneumoniae* patojeninin su örneklerindeki mikrobiyal yükü ise ortalama $5,9 \times 10^8$ kob/mL olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında hedef patojenler için E^{M1}, E^{M2}, E^{M3} ve E^{M4} olmak üzere dört Multipleks Konvansiyonel PCR yöntemi geliştirilmiştir. E^{M2} ve E^{M4} protokolleri hedeflenen üçlü patojen tanımlamaların da sınırlı kalmış, ikili ya da tekli olarak analiz edilmiştir. Bu sınırlamanın primer kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Geliştirilen PCR protokollerin gıda örneklerinde uygulanabilirliği incelenmiş ve gıda matriksinin karmaşıklığı nedeniyle tekli (E^{M1}, E^{M2} ve E^{M3}) pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmada aynı zamanda hedef mikrobiyal patojenleri tanımlayabilen ve kantitatif analiz edebilen Multipleks Real Time PCR yöntemleri (E^{R1}, E^{R2}, E^{R3} ve E^{R4}) geliştirilmiştir. Yöntemler çeşitli gıda örneklerinde uygulanmış ve patojen mikroorganizmaların potansiyelleri belirlenmiştir. Böylece geliştirilen Multipleks Real Time PCR yöntemlerin uygulanabilirliği ve etkinliği valide edilmiştir. Ayrıca standardize edilen Multipleks Konvansiyonel PCR (E^{M1}, E^{M2}, E^{M3} ve E^{M4}) ve Multipleks Real Time PCR yöntemler (E^{R1}, E^{R2}, E^{R3} ve E^{R4}) hedeflenen tanı kitlerinin temelini oluşturmaktadır. Optimize edilmiş PCR koşullarında geliştirilen manuel (E^{M1}, E^{M2}, E^{M3} ve E^{M4}) ve Real Time Tanı Kitleri (E^{R1}, E^{R2}, E^{R3} ve E^{R4}) ile izole edilen kromozomal DNA ve negatif kontrol eklenerek kısa sürede, tek bir reaksiyonda hedef patojenlerin hem kalitatif hem de kantitatif analizi yapılabilecektir. Böylece insan sağlığı ve ekonomik açıdan olumsuz etkilere yol açan gıda kaynaklı hastalıkların teşhis ve tedavisinde kolaylık sağlanarak gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçebilmek ve potansiyellerini belirlemek için katkıda bulunmuş olacaktır. Ayrıca geliştirilen tanı kitleri metotları gizli tutulan ticari kitalere alternatif bir yöntem oluşturacaktır ve özellikle rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için hızlı ve güvenilir alternatif bir yöntem niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschlaeger, N., Frey, J., Miserez, R., Abril, C. 2008. Real-Time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 127 (1-2): 179-85.
- Alves, J., Hirooka, E.Y., Oliveira, T. 2016. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat. *Food Science and Technology*, 72: 175-181.
- Amagliani, G., Petruzzelli, A., Carloni, E., Tonucci, F., Foglini, M., Micci, E., Ricci, M., Di Lullo, S., Rotundo, L., Brandi, G. 2016. Presence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* in Raw Ovine Milk Destined for Cheese Production and Evaluation of the Equivalence Between the Analytical Methods Applied. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13 (11): 626-632.
- Amoroso, M.G., Salzano, C., Cioffi, B., Napoletano, M., Garofalo, F., Guarino, A., Fusco, G. 2011. Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk. *Food Control*, 22 (8): 1466-1470.
- Anbazhagan, D., Mui, W.S., Mansor, M., Siok Yan, G., Yusof, M.Y., Sekaran, S.D. 2011. Development of Conventional and Real-Time Multiplex PCR Assays for The Detection of Nosocomial Pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (2): 448-458.
- Anderson, A.C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A., Al-Ahmad, A. 2016. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiology*, 6: 1534.
- Arias, C.A., Murray, B.E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 266-278.
- Aytaç, S.A., Taban, B.M. 2014. Food-Borne Microbial Diseases and Control: Food-Borne Infections and Intoxications. Food Processing: Strategies for Quality Assessment (Editorler: Malik, Z., Erginkaya, S., Erten, A.H.). Springer, NY. s. 191–224.
- Bai, S., Zhao, J., Zhang, Y., Huang, W., Xu, S., Chen, H., Fan, L.M., Chen, Y., Deng, X.W. 2010. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips. *Applied microbiology and biotechnology*, 86 (3): 983-90.
- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA Amplification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 271-275.
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., Roosens, N.H. 2013. Development and validation of qualitative SYBR-Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 4021-4037.

- Baumgartner, A., Grand, M., Liniger, M., Iversen, C. 2009. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 136 (2): 189-192.
- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R. 2004. Diagnostic Multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*, 100: 11-16.
- Beneduce, L., Fiocco, D., Spano, G. 2007. Development of PCR-based molecular tools for the detection of emerging food- and water-borne pathogenic bacteria. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Editorler: Méndez-Vilas, A.). Formatex, Spain. s. 569-576.
- Bhunia, A. 2008. General Mechanism of Pathogenesis for Foodborne Pathogens. Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis. Springer-Verlag, ISBN 978-0-387-74537-4, NY, 276s.
- Boer, E., Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50 (1999): 119-130.
- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S., Garin-Bastuji, B. 2009. Real-Time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of *IS711*, *bcs₃₁* and *per* target genes by Real-Time PCR. *Veterinary Microbiology*, 37 (1-2): 156-64.
- Brusa, V., Galli, L., Linares, L.H., Ortega, E.E., Lirón, J.P., Leotta, G.A. 2015. Development and validation of two SYBR green PCR assays and a multiplex real-time PCR for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat. *Journal of Microbiological Methods*, 119 (2015): 10-17.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W., Wagner, M. 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10): 4688-4692.
- Cagney, C., Crowley, H., Duffy, G., Sheridan, J.J., O'Brien, S., Camey, E. 2004. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and beef burgers from butcher shop and supermarkets in the Republic of Ireland. *Food Microbiology*, 21: 203-212.
- Cai, X.Q., Yu, H.Q., Ruan, Z.X., Yang, L.L., Bai, J.S., Qiu, D.Y., Jian, Z.H., Xiao, Y.Q., Yang, J.Y., Le, T.H., Zhu, X.Q. 2013. Rapid Detection and Simultaneous Genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula Using Real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) Analysis. *PLoS One*. 8 (6): e67082.
- Canals, R., McClelland, M., Santiviago, C.A., Polymenis, H.A. 2011. Genomics of *Salmonella* Species. Genomics of Foodborne Bacterial Pathogen (Editörler: Wiedmann, M., Zhang, W.). Springer, NY. s. 171-235.

- Capuano, F., Capparelli, R., Mancusi, A., Esposito, S., Corrado, F., Guarino, A. 2013. Detection of *Brucella* spp. in Stretched Curd Cheese as Assessed by Molecular Assays. *Journal of Food Safety*, 33 (2013): 145-148.
- Casabianca, A., Orlandi, C., Barbieri, F., Sabatini, L., Di Cesare, A., Sisti, D., Pasquaroli, S., Magnani, M., Citterio, B. 2015. Effect of starvation on survival and virulence expression of *Aeromonas hydrophila* from different sources. *Archives of Microbiology*, 197 (3): 431-438.
- Cawthorn, D.M., Botha, S., Witthuhn, R.C. 2008. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 127 (1): 129-138.
- Chen, J., Zhang, L., Paoli, G.C., Shi, C., Tu, S., Shi, X. 2010. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 137 (2): 168-174.
- Chen, L., Chavda, K.D., Mediavilla, J.R., Zhao, Y., Fraimow, H.S., Jenkins, S.G., Levi, M.H., Hong, T., Rojzman, A.D., Ginocchio, C.C., Bonomo, R.A., Kreiswirth, B.N. 2012. Multiplex Real-Time PCR for Detection of an Epidemic KPC Producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 Clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (6): 3444-3447.
- Chen, L., Mediavilla, J.R., Endimiani, A., Rosenthal, M.E., Zhao, Y., Bonomo, R.A., Kreiswirth, B.N. 2011. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection and Classification of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene (blaKPC) Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (2): 579-85.
- Chen, Y., Knabel, S.J. 2007. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Bacteria of the Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and Major Serotypes and Epidemic Clones of *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19): 6299-6304.
- Chen, Y., Song, K.Y., Brown, E.W., Lampel, K.A. 2010. Development of an Improved Protocol for the Isolation and Detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 73 (6): 1016-1022.
- Chenal-Francisque, V., Maury, M.M., Lavina, M., Touchon, M., Leclercq, A., Lecuit, M., Brisse, S. 2015. Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (10): 3355-3358.
- Cheng, C.Y., Huang, M.J., Chiu, H.C., Liou, S.M., Chou, C.C., Huang, C.C. 2012. Simultaneous Detection of Food Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* and *Vibrio parahaemolyticus* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20 (1): 66-73.
- Chon, J.W., Park, J.S., Hyeon, J.Y., Park, C., Song, K.Y., Hong, K.W., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Seo, K.H. 2012. Development of real-time PCR for the detection of

- Clostridium perfringens* in meats and vegetables. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (4): 530-534.
- Chu, W.H., Lu, C.P. 2005. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 28 (7): 437- 441.
- Citterio, B., Biavasco, F. 2015. *Aeromonas hydrophila* virulence. *Virulence*, 6 (5): 417-418.
- Cole, J.M., Schuetz, A.N., Hill, C.E., Nolte, F.S. 2012. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (2): 322-326.
- Compain, F., Babosan, A., Brisse, S., Genel, N., Audo, J., Ailloud, F., Kassis-Chikhani, N., Arlet, G., Decre, D. 2014. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52 (12): 4377-80.
- Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E., Gross, U. 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (4): 205-211.
- De Santis R., Ciammaruconi, A., Pomponi, A., Fillo, S., Lista, F. 2011. *Brucella*: Molecular Diagnostic Techniques in Response to Bioterrorism Threat. *Bioterrorism&Biodefense*, s2.
- Debeaumont, C., Falconnet, P.A., Maurin, M. 2005. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24 (12): 842-5.
- Dennis, M. Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P. 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 406-410.
- Depardieu, F., Perichon, B., Courvalin, P. 2004. Detection of the van Alphabet and Identification of *Enterococci* and *Staphylococci* at the Species Level by Multiple PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12): 5857-5860.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., Brisse, S. 2005. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (8): 4178-4182.
- Doosti, A., Dehkordi, P.G. 2011. Application of Real-Time PCR for Identification and Differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* In Cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 14 (2): 109-115.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8): 3819-3822.
- Elazhari, M., Elhabchi, D., Zerouali, K., Dersi, N., Elmalki, A. 2011. Prevalence and distribution of superantigen toxin genes in clinical community isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 2: 107.

- Elizaquível, P., Aznar, R. 2008. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiology*, 25 (5): 705-713.
- Elizaquível, P., Sánchez, G., Aznar, R. 2012. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25 (2012): 704-708.
- Elizaquívela, P., Gabaldónb, J.A., Aznara, R. 2011. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control*, 22 (2): 158-164.
- Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J. 1980. The Enterobacteriaceae Study Group. *Enterobacter sakazakii*: a new species of 'Enterobacteriaceae' isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30 (3): 569-584.
- Feeneyy, A., Kroppy, K.A., O'Connor, R., Sleator, R.D. 2014. *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut Microbes*, 5 (6): 711-718.
- Figueiredo, P., Ficht, T.A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C.A., Adams, L.A. 2015. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis Review of *Brucellae* Host Interactions. *The American Journal of Pathology*, 185 (6): 1505-1517.
- Forghani, F., Singh, P., Seo, K., Oh, D. 2016. A novel pentaplex real time (RT)- PCR high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing *Bacillus cereus* in food. *Food Control*, 60 (2016): 560-568.
- Forghani, F., Langaee, T., Eskandari, M., Seo, K., Chung, M., Oh, D. 2015. Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). *Food Control*, 55: 151-157.
- Fosheim, G.E., Nicholson, A.C., Albrecht, V.S., Limbago, B.M. 2011. Multipleks Real-Time PCR Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Associated Toxin Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (8): 3071-3073.
- Fratamico, P.M., Kawasaki, S. 2008. Applications of the Polymerase Chain Reaction for Detection, Identification, and Typing of Food-Borne Microorganisms. *Microbial Food Contamination* (2. Edition) (Editor: Wilson, C. L.). CRC Press Publishers, UK. s. 214-233.
- Fricke, M., Messelhäuser, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. 2007. Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6): 1892-1898.
- García-Yoldi, D., Marín, C.M., de Miguel, M.J., Muñoz, P.M., Vizmanos, J.L., López-Goñi, I. 2006. Multipleks PCR Assay for the Identification and Differentiation of all

Brucella Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry*, 4: 780-781.

- Gardner, T.J., Fitzgerald, C., Xavier, C., Klein, R., Pruckler, J., Stroika, S., McLaughlin, J.B. 2011. Outbreak of Campylobacteriosis associated with consumption of raw peas. *Clinical Infectious Diseases*, 53 (1): 26-32.
- Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R.W. 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiology and Infection*, 124 (1): 61-67.
- Garrido, A., Chapela, M., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G. 2013. In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 164 (1): 92-98.
- Garrido, A., Chapela, M.J., Román, B., Ferreira, M., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G. 2012. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Shigella xexneri* and *Listeria monocytogenes* in processed food samples. *European Food Research and Technology*, 234: 571-580.
- Garrido, A., Chapela, M., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G. 2013. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, 30 (1): 76-85.
- Gentil, O.G., Sonnard, V., Kandha, M.C., Marugg, J.D., Joosten, H.A. 2005. Simple and Rapid Cultural Method for Detection of *Enterobacter sakazakii* in Environmental Samples. *Journal of Food Protection*, 68 (1): 64-69.
- Germini, A., Masola, A., Carnevali, P., Marchelli, R. 2009. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. *Food Control*, 20 (2009): 733-738.
- Gierczynski, R., Jagielski, M., Rastawicki, W., Kaluzewski, S. 2007. Multiplex-PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying the cps loci for K1 and K2 capsule biosynthesis. *Polish Journal of Microbiology*, 56 (3): 153-156.
- Gilbert, C., Winters, D., O'Leary, A., Slavik, M. 2003. Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular and Cellular Probes*, 17 (4): 135-138.
- Gillespie, B.E., Oliver, S.P. 2005. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 88 (10): 3510-3518.
- Gilmour, M.W., Graham, M., Van Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., Trout-Yakel, K.M., Larios, O., Allen, V., Lee, B., Nadon, C. 2010. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*, 18 (11): 1-15.

- Grant, K.A., Kenyon, S., Nwafor, I., Plowman, J., Ohai, C., Halford-Maw, R., Peck, M.W., McLaughlin, J. 2008. The Identification and Characterization of *Clostridium perfringens* by Real-Time PCR, Location of Enterotoxin Gene, and Heat Resistance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5 (5): 629-639.
- Guan, Z.P., Jiang, Y., Gao, F., Zhang, L., Zhou, G.H., Guan, Z.J. 2013. Rapid and simultaneous analysis of five foodborne pathogenic bacteria using multiplex PCR. *European Food Research and Technology*, 237 (4): 627-637.
- Gurjar, A.A., Hegde, N.V., Love, B.C., Jayarao, B.M. 2008. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Molecular and Cellular Probes*, 22 (2): 90-95.
- Hadjinicolaou, A.V., Demetriou, V.L., Emmanuel, M.A., Kakoyiannis, C.K., Kostrikis, L.G. 2009. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiology*, 9 (1): 97.
- Haitao, L., Dongming, L., Jiguoi, G. 2011. Differentiation Between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by 16S rDNA-PCR and ERIC-PCR. *Journal of Northeast Agricultural University*, 18 (3): 12-15.
- Hanna, S.E., Connor, C.J., Wang, H.H. 2005. Real time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations. *Journal of Food Science*, 70 (3): 49-53.
- Hartman, L.J., Selby, E.B., Whitehouse, C.A., Coyne, S.R., Jaissle, J.G., Twenhafel N.A., Burke, R.L., Kulesh, D.A. 2009. Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: screening of nonhuman primates. *Journal of Molecular Diagnostics*, 11 (5): 464-471.
- Hassan, A.A., Akineden, Ö., Kress, C., Estuningsih, S., Schneider, E., Usleber, E. 2007. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 214-220.
- He, J.W., Jiang, S. 2005. Quantification of *Enterococci* and Human *Adenoviruses* in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5): 2250-2255.
- He, P., Zhu, G., Luo, J., Wang, H., Yan, Y., Chen, L., Gao, W., Chen, Z. 2016. Development and Application of a One-Tube Multiplex Real-Time PCR with Melting Curve Analysis for Simultaneous Detection of Five Foodborne Pathogens in Food Samples. *Journal of Food Safety*, 2016.
- He, Y., Chen, C.Y. 2010. Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Food Microbiology*, 27 (4): 439-446.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J.J., Fanning, S. 2010. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (4): 339-350.

- Hensel, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 95-102.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *BioTechnology*, 10 (4): 413-417.
- Hill, K., Caselitz, F., Moody, L. 1954. A case of acute, metastatic, myositis caused by a new organism of the family: Pseudomonadaceae; a preliminary report. *West Indian Medical Journal*, 3 (1): 9-11.
- Hill, W.E. 1996. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Critical reviews in food science and nutrition*, 36 (1-2): 123-73.
- Hinic, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Z., Makaya, P.V., Frey, J., Abril, C. 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of Microbiological Methods*, 75 (2): 375-378.
- Hu, Q., Lyu, D., Shi, X., Jiang, Y., Lin, Y., Li, Y., Qiu, Y., He, L., Zhang, R., Li, Q. 2014. A Modified Molecular Beacons–Based Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Eight Foodborne Pathogens in a Single Reaction and Its Application. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (3): 207-214.
- Hyeon, J.Y., Park, C., Choi, I.S., Holt, P.S., Seo, K.H. 2010. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (1): 177-181.
- Islam, N., Nagy, A., Garrett, W.M., Shelton, D., Cooper, B., Nou, X. 2016. Comparative proteomic analysis indicates that extracellular proteins released by 4 *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4 have different cellular origins and functions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016.
- Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (6): 1442-1447.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett J.B. 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8): 3558-3565.
- Jacobson, M.J., Johnson, E.A. 2011. Genomics of *Clostridium*. Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens (Editörler: Wiedmann, M., Zhang, W.) Springer, NY. s. 95-118.

- Jamali, H., Chai, L.C., Thong, K.L. 2013. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, 32 (2013): 19-24.
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M.A., Chamba, J.F., Bertrand, X., Serror, P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiology*, 31 (2): 191-198.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27 (6): 710-730.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2000. Foodborne Listeriosis. Modern Food Microbiology (7. Edition) (Editorler: Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A.). Springer, NY. s. 591-617.
- Jofre, A., Martina, B., Garriga, M., Hugas, M., Pla, M., Rodriguez-Lazaro, D., Aymerich, T. 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by Multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology*, 22 (1): 109-115.
- Jothikumar, N., Wang, X., Griffiths, M.W. 2003. Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66 (11): 2141-2145.
- Jun-Ichi, M., Takashi, S., Tomoko, Y., Keiji, I. 2012. Direct Real-Time PCR with Ethidium Monoazide: A Method for the Rapid Detection of Viable *Cronobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 9: 1548-1720.
- Kanakaraj, R., Harris, D.L., Glenn Songer, J., Bosworth, B. 1998. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Veterinary Microbiology*, 63 (1): 29-38.
- Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Chow, J.W., Clewell, D.B., Kumon, H. 2000. Simple and reliable Multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (8): 3092-3095.
- Kaur, S., Malik, S.V., Vaidya, V.M., Barbuddhe, S.B. 2007. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (5): 1889-1896.
- Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., Kawamoto, S. 2005. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat Samples. *Journal of Food Protection*, 68 (3): 551-556.
- Kawasaki, S., Fratamico, P.M., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., Kawamoto, S. 2010. Multiplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantification of *Salmonella* species, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground pork samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (5): 549-554.

- Kay, E.J., Gundogdu, O., Wren, B. 2011. Post-genome Analysis of the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens (Editorler: Wiedmann, M., Zhang, W.). Springer, NY. s. 55-94.
- Kerouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T.T., Brisabois, A. 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80 (2): 134-137.
- Kilic, A., Muldrew, K.L., Tang, Y.W., Basustaoglu, A.C. 2010. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66 (4): 349-355.
- Kim, J.S., Lee, G.G., Park, J.S., Jung, Y.H., Kwak, H.S., Kim, S.B., Nam Y.S., Kwon, S.T. 2007. A Novel Multiplex PCR Assay for Rapid and Simultaneous Detection of Five Pathogenic Bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 70 (7): 1656-1662.
- Koo, K., Jaykus, L.A. 2002. Detection of single nucleotide polymorphisms within the *Listeria* genus using an 'asymmetric' fluorogenic probe set and fluorescence resonance energy transfer based-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 513-517.
- Kotzekidou, P. 2013. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. *Food Microbiology*, 35 (2): 86-91.
- Köppel, R., Kuslyte, A.R., Tolido, I., Schmid, J., Marti, G. 2013. Nonaplex real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella* and enteropathogene *E. coli* after universal enrichment in food samples. *European Food Research and Technology*, 237: 315-322.
- Kumar, S., Tuteja, U., Sarika, K., Singh, D., Kumar, A., Kumar, O. 2011. Rapid Multipleks PCR assay for the simultaneous detection of the *Brucella* Genus, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (1): 89-92.
- Kurupati, P., Chow, C., Kumarasinghe, G., Poh, C.L. 2004. Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Culture Bottles by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (3): 1337-1340.
- LaGier, M.J., Joseph, L.A., Passaretti, T.V., Musser, K.A., Cirino, N.M. 2004. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Molecular and Cellular Probes*, 18: 275-282.
- Layton, B.A., Walters, S.P, Lam, L.H, Boehm, A.B. 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using Multipleks PCR. *Journal Applied Microbiology*, 109 (2): 539-547.
- Leavitt, A., Navon-Venezia, S., Chmelnitsky, I., Schwaber, M.J., Carmeli, Y. 2007. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*

- Strains in an Israeli Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (8): 3026-3029.
- Lee, M., Cherla, R.P., Tesh, V.L. 2010. Shiga Toxins: Intracellular Trafficking to the ER Leading to Activation of Host Cell Stress Responses. *Toxins*, 2: 1515-1535.
- Lee, N., Kwon, K.Y., Oh, S.K., Chang, H.J., Chun, H.S., Choi, S.W. 2014. A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean Ready-to-Eat Food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (7): 574-580.
- Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R. 2004. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiology*, 4:43.
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., Zhou, D. 2014. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9 (9): 1071-1081.
- Lim, J.S., Kim, M.R., Kim, W., Hong, K.W. 2011. Detection and Differentiation of Non-Emetic and Emetic *Bacillus cereus* Strains in Food by Real-Time PCR. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54 (1): 105-111.
- Lin, A., Sultan, O., Lau, H.K., Wong, E., Hartman, G., Lauzon, C.R. 2011. O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiology*, 28 (3): 478-483.
- Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J., Stanley, J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal Clinical Microbiology*, 35 (10): 2568-2572.
- Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., Huang, X. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal Microbiology Methods*, 65 (1): 21-31.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W., Ainsworth, A.J. 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal Microbiology Methods*, 71 (2): 133-40.
- Liu, Y., Liu, C., Zheng, W., Zhang, X., Yu, J., Gao, Q., Hou, Y., Huang, X. 2008. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (3): 230-235.
- Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., Shi, X. 2012. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control*, 27 (1): 87-93.
- Liu, H., Lu, L., Pan, Y., Sun, X., Hwang, C., Zhao, Y., Wu, V.C.H. 2015. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, 52: 78-84.

- López-Campos, G., Martínez-Suárez, J.V., Aguado-Urda, M., López-Alonso, V. 2012. Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens. Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens (Editor: Hartel, R.W.). Springer, US. s. 13-32.
- López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C.M., de Miguel, M.J., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Albert, D., Garin-Bastuji, B. 2011. New Bruce-ladder Multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology*, 154 (1-2): 152-155.
- Lungu, B., Waltman, W.D., Berghaus, R.D., Hofacre, C.L. 2012. Comparison of a Real-Time PCR Method with a Culture Method for the Detection of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Naturally Contaminated Environmental Samples from Integrated Poultry Houses. *Journal of Food Protection*, 75 (4): 743-747.
- Ma, K., Deng, Y., Bai, Y., Xu, D., Chen, E., Wu, H., Li, B., Gao, L. 2014. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*, 42: 87-93.
- Mackay, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (3): 190-212.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12): 7046-7052.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16: 47-51.
- Mason, W.J., Blevins, J.S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N., Smeltzer, M.S. 2001. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (9): 3332-3338.
- Medeiros, A.W., Pereira, R.I., Oliveira, D.V., Martins, P.D., d'Azevedo, P.A., Van der Sand, S., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1): 327-332.
- Meer, R.R., Songer, J.G. 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research*, 58 (7): 702-705.
- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (3): 1032-1035.
- Minami, J., Soejima, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. 2012. Direct Real-Time PCR with Ethidium Monoazide: A Method for the Rapid Detection of Viable *Cronobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 75 (9): 1572-1579.

- Mothershed, E.A., Whitney, A.M. 2006. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 363 (2006): 206-220.
- Mraheil, M.A., Barbuddhe, S., Hain, T., Chakraborty, T. 2013. *Listeria*. The Prokaryotes-Human Microbiology (Editorler: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F.). Springer, Berlin. s. 219-235.
- Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, U.K. 2007. Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 68 (1): 193-200.
- Mukhopadhyay, S., Ramaswamy, R. 2009. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45 (2): 666-677.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148: 257-266.
- Naharro, G., Riaño, J., de Castro, L., Alvarez, S., Luengo, J.M. 2009. *Aeromonas*. Molecular Detection of Foodborne Pathogens (Editor: Liu, D.) CRC Press, NY. s. 273-283.
- Nannapaneni, R. 2012. Methods for Identification of Bacterial Foodborne Pathogens. Microbial Food Safety (Editorler: Omar, A., Oyarzabal, O.A., Backert, S.). Springer, NY. s. 45-55.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castañoa, M.J., Solera, J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439: 231-250.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., Van Der Giessen, J., Kruse, H. 2010. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139 (1): 3-15.
- O' Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T. 2008. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiology*, 25 (1): 75-84.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Magnani, M. 2009. A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology*, 26 (6): 615-622.
- Oyarzabal, O.A. 2012. Emerging and Reemerging Foodborne Pathogens. Microbial Food Safety (Editorler: Omar, A., Oyarzabal, O.A., Backert, S.). Springer, NY. s. 3-10.
- Panangala, V.S., Shoemaker, C.A., Van Santen, V.L., Dybvig, K., Klesius, P.H. 2007. Multipleks-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74 (3): 199-208.

- Park, S.H., Hanning, I., Jarquin, R., Moore, P., Donoghue, D.J., Donoghue, A.M., Ricke, S.C. 2011. Multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. *FEMS Microbiology Letters*, 316 (1): 7-15.
- Park, S.H., Kim, H.J., Kim, J.H., Kim, T.W., Kim, H.Y. 2007. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using Multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (7): 1177-1182.
- Patel, R., Uh, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Cockerill, F.R. 1997. Multiplex PCR Detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 Genes in *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (3): 703-707.
- Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Villar, J., Méndez-Álvarez, S. 2001. Multiplex PCR for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (11): 4037-4041.
- Perkel, J.M. 2012. Overcoming the Challenges of Multiplex PCR. *Life Science Articles*, 44 (10): 32-34.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7): 3325-3327.
- Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E., McClelland, M. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. *Journal of Bacteriology*, 186 (17): 5883-5898.
- Prasad, D., Vidyarthi, A.S. 2009. DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. *African Journal of Biotechnology*, 8 (9): 1768-1775.
- Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L., Graves, M.H. 2004. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (3): 1290-1293.
- Queipo-Ortuno, M.I., Colmenero, J.D., Bermudez P., Bravo, M.J., Morata, P. 2009. Rapid Differential Diagnosis between Extrapulmonary Tuberculosis and Focal Complications of Brucellosis Using a Multiplex Real-Time PCR Assay. *PLoS One*. 4 (2): e4526.
- Ramos-Trujillo, E., Pérez-Roth, E., Méndez-Álvarez, S., Claverie-Martín, F. 2003. Multiplex PCR for simultaneous detection of *enterococcal* genes vanA and vanB and *staphylococcal* genes mecA, ileS-2 and femB. *International Microbiology*, 6 (2): 113-115.
- Redkar, R., Rose, S., Bricker, B., DelVecchio, V. 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes*, 15 (1): 43-52.

- Rijpens, N.P., Herman, L.M.F. 2002. Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens. *Journal of AOAC International*, 85 (4): 984-995.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Hernandez, M. 2013. Real-time PCR in Food Science: PCR Diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, 15: 39-44.
- Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., Scotti, M., Esteve, T., Vazquez-Boland, J.A., Pla, M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1366-1377.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463-5467.
- Sedgley, C.M., Nagel, A.C., Shelburne, C.E., Clewell, D.B., Appelbe, O., Molander, A. 2005. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Archives of Oral Biology*, 50 (6): 575-583.
- Seo, K.H., Brackett, R.E. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *Journal of Food Protection*, 68 (1): 59-63.
- Shannon, K., Lee, D.Y., Trevors, J., Beaudette, L. 2007. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 382 (1): 121-129.
- Sharma, V.K., Carlson, S.A. 2000. Simultaneous Detection of *Salmonella* Strains and *Escherichia coli* O157:H7 with Fluorogenic PCR and Single Enrichment-Broth Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12): 5472-5476.
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., Zhang, C. 2010. MPprimer: a program for reliable Multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*, 11: 143.
- Shipley, G.L. 2007. An introduction to real-time PCR. Real-time PCR (Editör: Dorak, M.T.), Taylor and Francis Group Publishers, NY. s. 1-37.
- Sidor, I.F., Dunn, J.L., Tsongalis, G.J., Carlson, J., Frasca, S. 2013. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25 (1): 72-81.
- Singh, J., Batish, V.K., Grover, S. 2009. A scorpion probe-based real-time PCR assay for detection of *E. coli* O157:H7 in dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 395-400.
- Singh, J., Batish, V.K., Grover, S. 2012. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 49 (2): 234-239.
- Singh, K., Mangold, K.A., Wyant, K., Schora, D.M., Voss, B., Kaul, K.L., Hayden, M.K., Chundi, V., Peterson, L.R. 2012. Rectal Screening for *Klebsiella pneumoniae*

- Carbapenemases: Comparison of Real-Time PCR and Culture Using Two Selective Screening Agar Plates. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (8): 2596-2600.
- Singh, P., Mustapha, A. 2014. Development of a real-time PCR melt curve assay for simultaneous detection of virulent and antibiotic resistant *Salmonella*. *Food Microbiology*, 44 (2014): 6-14.
- Singh, P., Mustapha, A. 2015. Multiplex real-time PCR assays for detection of eight Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food samples by melting curve analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 215 (2015): 101-108.
- Siu, L.K., Yeh, K.M., Lin, J.C., Fung, C.P., Chang, F.Y. 2012. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*, 12 (11): 881-887.
- Sjöling, A., Sadeghipoorjahromi, L., Novak, D., Tobias, J. 2015. Detection of major diarrheagenic bacterial pathogens by Multiplex PCR panels. *Microbiological Research*, 172: 34-40.
- Skanseng, B., Kaldhusdal, M., Rudi, K. 2006. Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 20 (5): 269-279.
- Skerniskyte, J., Armalyte, J., Kvietkauskaitė, R., Seputiene, V., Povilonis, J., Suziedeliene, E. 2015. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. by real-time multiplex PCR using amplicon DNA melting analysis and probe-based assay. *International Journal of Food Science and Technology*, 51 (2): 519-529.
- Soler, M., Ruiz-Rueda, O., Lopez-Siles, M., Calvo, L., Kaclikova, E., Garcia-Gil, J.L. 2011. A New Validated Real-Time PCR-Based Method for the Specific and Fast Detection of *Cronobacter* spp. in Infant Formula. *Food Analytical Methods*, 5 (2): 79-187.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., Witte, W. 2003. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (9): 4089-4094.
- Strydom, A., Cawthorn, D.M., Cameron, M., Witthuhn, R.C. 2012. Species of *Cronobacter* - A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International Dairy Journal*, 27 (1-2): 3-12.
- Sun, F., Wu, D., Qiu, Z., Jin, M., Wang, X., Li, J. 2010. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green for the specific detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula. *Food Control*, 21: 487-491.
- Suo, B., He, Y., Tu, S.I., Shi, X. 2010. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (6): 619-628.

- Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, Z. 2016. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. *Food Control*, 2016: 1-8.
- Thong, K.L., Lai, M.Y., Teh, C.S.J., Chua, K.H. 2011. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by Multiplex PCR. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 28 (1): 21-31.
- Tomaso, H., Kattar, M., Eickhoff, M., Wernery, U., Dahouk, S., Straube, E., Neubauer, H., Scholz, H.C. 2010. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of *Brucellae* in tissue using quantitative real-time PCR. *BMC Infectious Diseases*, 10: 100.
- Toplak, N., Kovac, M., Piskernik, S., Mozina, S.S., Jerse, B. 2012. Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 752-764.
- Trakhna, F., Harf-Monteil, C., Abdelnour, A., Maaroufi, A., Gadonna-Widehem, P. 2009. Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method. *Letters in Applied Microbiology*, 49 (2): 186-190.
- Trkov, M., Avgustin, G. 2003. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*, 80 (1): 67-75.
- Turton, J.F., Perry, C., Elgohari, S., Hampton, C.V. 2010. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 541-547.
- Ueda, S., Yamaguchi, M., Iwase, M., Kuwabara, Y. 2013. Detection of Emetic *Bacillus cereus* by Real-Time PCR in Foods. *Biocontrol Science*, 18 (4): 227-232.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnology advances*, 28 (2): 232-254.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynka, O., Vaseashta, A., Adley, C. 2012. Real Time Detection of Foodborne Pathogens Applications. *Food Quality Monitoring and Biosecurity, Technological Innovations in Sensing and Detection of Chemical, Biological, Radiological, Nuclear Threats and Ecological Terrorism* (Editorler: Vaseashta, A., Braman, E., Susmann, P.). Springer, Netherlands. s. 149-158.
- Vidana, R., Rashid, M.U., Ozenci, V., Weintraub, A., Lund, B. 2016. The origin of endodontic *Enterococcus faecalis* explored by comparison of virulence factor patterns and antibiotic resistance to that of isolates from stool samples, blood cultures and food. *International Endodontic Journal*, 49: 343-351.
- Wang, G., Zhou, J., Zheng, F., Lin, G., Cao, X., Gong, X., Qiu, C. 2011. Detection of Different Genotypes of *Clostridium perfringens* in Feces of Healthy Dairy Cattle

- from China using Real-Time Duplex PCR Assay. *Pakistan Veterinary Journal*, 31 (2): 120-124.
- Wang, L., Li, P., Zhang, Z., Chen, Q., Aguilar, Z.P., Xu, H., Yang, L., Xu, F., Lai, W., Xiong, Y., Wei, H. 2014. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process. *Food Control*, 36 (2014): 119-125.
- Wang, R.F., Cao, W.W., Franklin, W., Campbell, W., Cerniglia, C.E. 1994. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Molecular and Cellular Probes*, 8 (2): 131-138.
- Wang, X., Zhu, C., Xu, X., Zhou, G. 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. *Food Control*, 25 (2012): 144-149.
- Wareth, G., Melzer, F., Elschner, M.C., Neubauer, H., Roesler, U. 2014. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (10): 1339-1343.
- Winchell, J.M., Wolff, B.J., Tiller, R., Bowen, M.D., Hoffmaster, A.R. 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (3): 697-702.
- Wong, M.H., Zeng, L., Liu, J.H., Chen, S. 2013. Characterization of Salmonella Food Isolates with Concurrent Resistance to Ceftriaxone and Ciprofloxacin. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10 (1): 42-46.
- Wu, S., Rodgers, N., Choct, M. 2011. Real-Time PCR Assay for *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens in a Challenge Model of Necrotic Enteritis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (10): 1135-1139.
- Xiao, L., Zhang, Z., Sun, X., Pan, Y., Zhao, Y. 2014. Simultaneous Detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* by Multiplex Real-Time PCR Assays Using High-Resolution Melting. *Food Analytical Methods*, 7(10): 1960-1972.
- Xiao, L., Zhang, Z., Sun, X., Pan, Y., Zhao, Y. 2015. Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. *Food Control*, 57 (2015): 185-189.
- Yamaguchi, M., Kawai, T., Kitagawa, M., Kumeda, Y. 2013. A new method for rapid and quantitative detection of the *Bacillus cereus* emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Food Microbiology*, 34: 29-37.
- Yang, I.C., Shih, D.Y., Huang, T.P., Huang, Y.P., Wang, J.Y., Pan, T.M. 2005. Establishment of a novel Multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *Journal of Food Protection*, 68 (10): 2123-2130.

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.
- Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y., Park, Y.H. 1997. Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (1): 228-232.
- Yoshitomi, K.J., Jinneman, K.C., Zapata, R., Weagant, S.D., Fedio, W.M. 2012. Detection and Isolation of Low Levels of *E. coli* O157:H7 in Cilantro by Real-Time PCR, Immunomagnetic Separation, and Cultural Methods with and without an Acid Treatment. *Journal of Food Science*, 77 (8): 481-489.
- Zhang, J., Cao, G., Xu, X., Allard, M., Li, P., Brown, E., Yang, X., Pan, H., Meng, J. 2016. Evolution and Diversity of *Listeria monocytogenes* from Clinical and Food Samples in Shanghai, China. *Front Microbiology*, 7: 1138.
- Zhang, W., Knabel, S.J. 2005. Multiplex PCR Assay Simplifies Serotyping and Sequence Typing of *Listeria monocytogenes* Associated with Human Outbreaks. *Journal of Food Protection*, 68 (9): 1907-1910.
- Zhang, Z., Xiao, L., Lou, Y., Jin, M., Liao, C., Malakar, P.K., Pan, Y., Zhao, Y. 2015. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw shrimp. *Food Control*, 51: 31-36.
- Zoletti, G., Siqueira, J.F., Santos, K.R. 2006. Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and—Independent Approaches. *Journal of Endodontics*, 32 (8): 722-726.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Esen TUTAR
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 10.04.1983, Kahramanmaraş
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (344) 300 13 52
Faks : 0 (344) 300 16 38
e-posta : esentutar@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi /Su Ürünleri Bölümü	2008
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Kahramanmaraş Lisesi (YDA)	2001

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2005-2008	KSÜ	Araştırma Görevlisi
2008-Halen	KSÜ	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- Cakmak E**, Alp A. 2010. Morphological differences among the mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Banks & Solander 1794), populations. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 10: 87-92.
- Tutar L, **Tutar E**, Tutar Y. 2014. MicroRNAs and Cancer; an Overview. Current Pharm Biotechnol. 15(5): 430-437.
- Tutar L, **Tutar E**, Özgür A, Tutar Y. 2015. Therapeutic Targeting of microRNAs in Cancer: Future Perspectives. Drug Development Research. 76: 382-388.

4. Paksoy M.Y, Dıraz E, Dığrak M, **Tutar E**, Karaman Ő. 2015. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Two Endemic *Kundmannia* Scop. Species from Turkey. *Industrial Crops and Products*. 79: 39-46.

5. Tutar Y, Özgür A, **Tutar E**, Tutar L, Pulliero A, Izzotti A. 2016. Regulation of oncogenic genes by MicroRNAs and pseudogenes in human lung cancer. *Biomed Pharmacother*. 83: 1182-1190.

Hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. **Tutar E**, Köksalan E, Akyol İ. 2015. Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda Real Time PCR Teknolojisi. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 18(4): 26-39.

2. **Tutar E**. 2015. Combined mitochondrial DNA of the Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Banks & Solander 1794), and its phylogenetic position. *International Journal of Aquatic Biology*. 3 (5): 314-322.

Kitap Bölümü olarak yayınlanan makaleler

1. Özgür A, Tutar L, Açıkalin Coşkun K, **Tutar E**, Tutar Y. 2013. *Toxoplasma gondii* and Heat Shock Proteins In book: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Ed.:1, Volume: 3, Publisher: FORMATEX, Editors: A. Méndez-Vilas, pp.1969-1979.

2. Tutar Y, Özgür A, **Tutar E**, Açıkalin Coşkun K, Tutar L. 2014. Anti-Apoptotic and Oncogenic Function of HSP27. In book: *Frontiers in Protein and Peptide Sciences*, Volume: 1, Publisher: Bentham Science, Editor: Ben Dunn, pp 75-90.

3. Tutar L, Özgür A, **Tutar E**, Açıkalin Coşkun K, Tutar Y. 2014. Heat Shock Response Agents and the Diseases. In book: *Frontiers in Protein and Peptide Sciences*, Volume: 1, Publisher: Bentham Science, Editor: Ben Dunn, pp 139-160.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. **Tutar E**, Köksalan E. 2015. Gıda Kaynaklı Patojenleri Tanımlamada Real Time PCR Teknolojisinin Kullanımı ve Bazı Konvansiyonel Yöntemler ile Karşılaştırılması. 2. İç Anadolu Bölgesi Tarım ve Gıda Kongresi (Poster sunum)

2. **Tutar E**, Köksalan E. 2015. *Brucella* Enfeksiyonlarında Moleküler Tanı Yöntemleri. 9. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi (Poster sunum)

3. Köksalan E, Özköse E, Akyol İ, Ekinci M. S, **Tutar E**. 2015. Amerikan Yavru Çürüklüğüne Karşı Biyolojik Mücadele Metotları: Probiyotik Karakterli Laktik Asit Bakterilerin Kullanımı Örneđi. 9. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi (Sözlü sunum)

4. Bağcı Y, Tutar L, **Tutar E**. 2016. Taxonomic, Morphological, Anatomical and Evolutionary Approaches to *Rorippa amphibia* (L.) Bess. and *Rorippa austriaca* (Crantz.) Besser. International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16) (Sözlü sunum)

5. Tutar E, Akyol İ. 2016. Bazı Mikrobiyal Gıda Patojenlerinin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması ve Patojenlere Özgü Kantitatif Tamı Kiti Oluşturulması. 23.Biyoloji kongresi. (Sözlü sunum)

6. Tutar L, Açıkalın Coşkun K, Tutar Y, **Tutar E**, Özgür A. 2016. Enfektif *T. gondii* RH Suşundan Isı Şok Proteini 70'in (tgHsp70) İzolasyonu ve Karakterizasyonu. 23. Biyoloji kongresi. (Sözlü sunum)

