



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SÜTTE *Escherichia coli* O157:H7 CANLI HÜCRELERİNİN
BELİRLENMESİNDE KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE REAL-TİME PCR
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim İsmail Hakkı EKİN
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emrullah SAĞUN

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SÜTTE *Escherichia coli* O157:H7 CANLI HÜCRELERİNİN
BELİRLENMESİNDE KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE REAL-TİME PCR
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim İsmail Hakkı EKİN
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emrullah SAĞUN

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-8500 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2022

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi (Veteriner Programı) Anabilim Dalında Veteriner Hekim İsmail Hakkı EKİN tarafından hazırlanan “**Sütte *Escherichia coli* O157:H7 Canlı Hücrelerinin Belirlenmesinde Kültür Yöntemi ile Real-Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 12 / 2022

Prof. Dr. Yakup Can SANCAK
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Emrullah SAĞUN
Jüri Üyesi (Danışman)

Prof. Dr. Ziya İLHAN
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mukadderat GÖKMEN
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Şükrü ÖNALAN
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Sütte *Escherichia coli* O157:H7 Canlı Hücrelerinin Belirlenmesinde Kültür Yöntemi ile Real-Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması**” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kural ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanmış olup, bu kural ve ilkeler gereği çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

20 / 12 / 2022

İsmail Hakkı EKİN

TEŞEKKÜR

Sunulan bu doktora tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesinin her aşamasında yardım ve önerileriyle büyük desteğini gördüğüm danışman hocam sayın Prof. Dr. Emrullah SAĞUN'a araştırmanın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Van Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanımız ve Tez İzleme Komitesi üyesi hocam sayın Prof. Dr. Yakup Can SANCAK'a ve Doktora Tez İzleme Komitesi üyelerinden Doç. Dr. Şükrü ÖNALAN'a, Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kamil EKİCİ, Dr. Öğr. Üyesi Rabia Mehtap TUNCAY ve Dr. Öğr. Üyesi Tuncer ÇAKMAK'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Özgül GÜLAYDIN'a, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Prof. Dr. Abdullah YEŞİLOVA'ya ve çalışmalarım esnasında büyük fedakarlıklarda bulunan ve manevi desteğini esirgemeyen değerli eşim Prof. Dr. Zehra EKİN'e ve bana olan inançlarını yitirmeyen çocuklarım Demet, Mehmet Ali ve Defne'ye teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca bu araştırmayı destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Bu Doktora Tez çalışmasını 2003 yılında vefat eden ve benim için çok özel bir yeri olan rahmetli Babama atfediyorum

ÖZET

Ekin IH, “Sütte *Escherichia coli* O157:H7 Canlı Hücrelerinin Belirlenmesinde Kültür Yöntemi ile Real-Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması”, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hiyjeni ve Teknolojisi (Veteriner) Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van, 2022. Bu çalışmada, canlı *E. coli* O157:H7 hücrelerinin konvansiyonel kültür yöntemi ve qPCR tekniği ile belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlandı. Bunun için PBS ve süt ortamlarında canlı *E. coli* O157:H7 süspansiyonlarına 55°C’de 10, 20 ve 30 dk. süreyle ısıtıl işlem uygulandı. PBS ve süt ortamlarındaki canlı hücre sayıları konvansiyonel kültür yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile direkt qPCR, EMA+qPCR ve PMA+qPCR yöntemlerinden elde edilen sonuçlar ayrı ayrı karşılaştırıldı. Hazırlanan test süspansiyonunun kültürel sayım sonucu ile direkt qPCR sayım sonucu arasındaki fark istatistiki açıdan önemsiz ($p<0.05$) bulundu. Tüm uygulamalarda farklı sürelerde yapılan ısıtıl işlem sonrası kültürel sayım ile direk qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.05$) bulundu. Farklı konsantrasyonlarda EMA ve PMA uygulanan örneklerde kültür ve qPCR sayımlarının ortalama değerleri arasındaki fark önemsiz bulunurken kültür sayımına en yakın EMA konsantrasyonunun 7 µg/ml, PMA konsantrasyonunun ise 30 µM/ml olduğu belirlendi. PBS ve süt ortamlarında farklı konsantrasyonlarda EMA ve PMA uygulamaları sonrası yapılan qPCR sayımlarında elde edilen değerler, kültürel sayımlarda elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte qPCR sayımları daha yüksek çıktı. Isıtıl işlem sonrası PBS ortamındaki canlı *E. coli* O157:H7 sayısı, süt ortamındaki uygulama ile karşılaştırıldığında daha düşük bulundu. Sonuç olarak bu çalışmada EMA ve PMA uygulamaları sonrası elde edilen qPCR sonuçlarının kültür yöntemi ile elde edilen sonuçlara direkt qPCR’den daha yakın olduğu tespit edildi. Konvansiyonel kültür yöntemleri ile tespit edilemeyen canlı fakat kültüre edilemeyen hücrelerin (VBNC) tespiti ve miktar tayini bakımından EMA + qPCR veya PMA + qPCR gibi yeni tekniklerin uygulanmasının önemli olduğu, halk sağlığı açısından önemli risk oluşturan *E. coli* O157:H7’nin EMA + qPCR veya PMA + qPCR teknikleri ile kantitatif analizlerinde daha güvenilir sonuçların alınması ve optimizasyonu için yeni alternatif kimyasalların geliştirilmesi ve ileri düzey çalışmaların devam etmesi gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: *E. coli* O157:H7, qPCR, EMA, PMA, Canlı, Ölü, PBS, Süt

ABSTRACT

Ekin IH, Comparison of Culture and Real-Time PCR Methods for the Determination of Escherichia coli O157: H7 Live Cells in Milk, Van Yuzuncu Yil University, Health Sciences Institute, Department of Food Hygiene and Technology (Veterinary Programme), PhD Thesis, Van, Turkey, 2022. In this study, it was aimed to determine and compare live *E. coli* O157:H7 cells with conventional culture method and qPCR technique. For this purpose, heat treatment was applied to live *E. coli* O157:H7 suspensions in PBS and milk at 55 °C for 10, 20 and 30 minutes. The viable cell counts obtained by conventional culture method in PBS and milk were separately compared with the results obtained from direct qPCR, EMA+qPCR and PMA+qPCR methods. The difference between the cultural count result and the direct qPCR count result of the prepared test suspension was found to be statistically insignificant ($p < 0.05$). After the heat treatment at different times in all applications, the difference between cultural and direct qPCR counts was significant ($p < 0.05$). While the difference between the mean values of culture and qPCR counts in the samples treated with different EMA and PMA concentrations was insignificant, it was determined that 7 mg/ml of EMA concentration and 30 mM/ml of PMA concentration that used for qPCR were found closest results to the culture counts. Although the difference between the results obtained with EMA and PMA applications at different concentrations in PBS and milk is not statistically significant, the qPCR counts was found to be higher. After heat treatment, the number of viable *E. coli* O157:H7 in PBS was found to be lower compared to the application in milk. As a result, in this study, it was determined that the qPCR results obtained after EMA and PMA applications were closer to the culture method than direct qPCR. It has been observed that the application of new techniques such as EMA + qPCR or PMA + qPCR is important for the detection and quantification of viable but non-culturable cells (VBNC) that cannot be detected by conventional culture methods. It was concluded that new alternative chemicals should be developed and advanced studies should be continued in order to obtain more reliable results and optimization with EMA + qPCR or PMA + qPCR techniques in the quantitative analysis of *E. coli* O157:H7, which poses a significant risk to public health.

Keywords: *E. coli* O157:H7, qPCR, EMA, PMA, Viable, Dead, PBS, Milk

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
TABLolar LİSTESİ.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Gıdalarda Canlı Bakterilerin Tespiti	4
2.1.1. Kültür yöntemleri	4
2.1.2. Membran filtrasyon yöntemi	6
2.1.3. Mikroskopik yöntemler	7
2.1.4. İmmunomagnetik separasyon	8
2.1.5. Akış sitometrisi	10
2.1.6. Serolojik tespit yöntemleri	11
2.1.7. Nükleik asit bazlı tespit yöntemleri	12
2.2. Canlı, Fakat Kültüre Edilemeyen Bakteriler	20
2.2.1. Gıdalarda Canlı ve Kültüre Edilemeyen Bakterilerin Tespiti	21
2.3. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	27
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin karakteristik özellikleri	27
2.3.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin virulens ve patojenite özellikleri	28
2.3.3. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin gıdalarda bulunuşu	28
2.3.4. <i>Escherichia coli</i> O157:H7'nin bulaşma ve yayılması	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereç.....	30

3.1.1. Referans kültür	30
3.1.2. Deneysel uygulama ortamları	30
3.1.3. Primer dizaynı	30
3.1.4. Ethidium monoazide bromide çözeltisinin hazırlanması	31
3.1.5. Propidium monoazide çözeltisinin hazırlanması	31
3.1.6. Besiyerleri	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Standart hazırlanması	31
3.2.2. Çalışma kültürünün hazırlanması	34
3.2.3. Isıl işlem uygulaması	35
3.2.4. İstatistiksel analizler	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Isıl İşlem Uygulamaları	39
4.1.1. PBS ortamında ısıtıl işlem uygulamasına ait bulgular	39
4.1.2. Süt ortamında ısıtıl işlem uygulamasına ait bulgular	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	82
EKLER.....	83
Ek 1. Tez Orijinallik Raporu.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Brain Heart Infusion
Ct	: Cycle treshold
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleosit trifosfat
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	: Ethidium Monoazide Bromide
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
HUS	: Hemolitik Üremik Sendrom
IMS	: İmmunomagnetik separasyon
Kob	: Koloni Oluşturan Birim
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PMA	: Propidium Monoazide Bromide
qPCR	: Kantitatif Real Time PCR
RNA	: Ribo nükleik asit
UHT	: Ultra High Temperature
VBNC	: Viable but Non-Culturable Cells

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kültür yönteminin şematize görünümü	6
Şekil 2.	Membran filtrasyon yönteminin şematize görünümü	7
Şekil 3.	BacLight™ viability kit flüoresan mikroskop görüntüsü	8
Şekil 4.	İmmunomagnetik separasyon (IMS) süreçleri	9
Şekil 5.	Flow sitometrinin çalışma prensibi	11
Şekil 6.	Real Time PCR reaksiyonu ve kantitatif analiz	18
Şekil 7.	EMA'nın kimyasal yapısı	23
Şekil 8.	PMA'nın kimyasal yapısı	24
Şekil 9.	qPCR ile canlı ve ölü bakteri ayırımında canlı bakteri miktarının belirlenmesi için PMA'nın modifiye edici etkisi	25
Şekil 10.	<i>E. coli</i> O157:H7 kültür dilüsyonlarından hazırlanan Real-Time PCR standart grafiği	33
Şekil 11.	<i>E. coli</i> O157:H7 kültür dilüsyonlarından hazırlanan Real-Time PCR standart konsantrasyon grafiği	33
Şekil 12.	<i>E. coli</i> O157:H7 kültür dilüsyonlarından hazırlanan Real-Time PCR Standart Curve eğrisi	34
Şekil 13.	55 °C'de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında EMA örneklerinin qPCR kantitatif analiz grafiği	40
Şekil 14.	55 °C'de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında EMA örneklerinin Standart kullanılarak elde edilen Curve eğrisi	40
Şekil 15.	55 °C'de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında PMA örneklerinin Real-Time PCR grafiği	41

Şekil 16.	55 °C’de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında PMA örneklerinin Standart kullanılarak elde edilen Curve eğrisi	41
Şekil 17.	PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü	44
Şekil 18.	PBS ortamında farklı konsantrasyonlarda EMA uygulaması yapılan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü	44
Şekil 19.	PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü	47
Şekil 20.	PBS ortamında farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması yapılan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü	47
Şekil 21.	Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü	50
Şekil 22.	Süt ortamında farklı konsantrasyonlarda EMA uygulaması yapılan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü	50

- Şekil 23.** Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü 53
- Şekil 24.** Süt ortamında farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması yapılan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü 53

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.	PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri.....	42
Tablo 2.	PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi	43
Tablo 3.	PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri	45
Tablo 4.	PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi	46
Tablo 5.	Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri	48
Tablo 6.	Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi	49

Tablo 7.	Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri	51
Tablo 8.	Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan <i>E. coli</i> O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi.....	52

1. GİRİŞ

İnsan sağılığı açısından gıda kökenli patojen karakterli mikroorganizmalar hastalık, ölüm ve önemli ekonomik kayıplara sebep olmakla birlikte, gıdaların üretiminden tüketimine kadar geçen süreçlerde uygulanan işlemlerin herhangi bir aşamasında gıdalara bulaşmak suretiyle ciddi epidemilere varabilen halk sağılığı problemleri meydana getirebilmektedir (Tutar ve ark., 2015).

Gıda kaynaklı zehirlenme olgularına neden olan mikroorganizmalar, insan sağılığı açısından önemli tehlike oluştururken, aynı zamanda bazı kayda değer ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Gıda tüketim alışkanlıklarında her geçen gün görülen değişim yanında toplu gıda üretimlerindeki artış ve uluslararası gıda ticaretinin yaygınlaşması ile birlikte, dünyanın birçok bölgesinde bazı patojen bakterilerin neden olduğu gıda zehirlenmesi vakalarında artışlar görüldüğü bildirilmiştir (Özbaş, 2002).

Gıdalarda mikroorganizmaların tespiti ve sayılarının belirlenmesi halk sağılığı ve gıda güvenliği bakımından büyük önem taşır. Gıdalarda bulunabilen canlı patojen mikroorganizmalar özellikle halk sağılığını büyük ölçüde tehdit ettiği için sadece canlı hücreleri saptayabilen ve miktarlarını da belirleyen yeni yöntemlerin geliştirilmesi ayrıca önem arz etmektedir (Taskin, 2017).

Gıda kaynaklı bakteriyel hastalıkları kontrol altına almada en önemli işlem, etkenin gıda maddesinden çok kısa sürede izolasyonu, identifikasyonu ve miktarının doğru biçimde tespit edilebilmesidir. Minimal infektif dozu özellikle 10 bakteri ve altına düşebilen patojen mikroorganizmaların doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir yöntemlerle identifikasyonu son derece önemlidir (Tutar ve ark., 2015).

Gıdalarda mikrobiyolojik analizlerin rutin olarak uygulanmaya başladığı günden bu yana bilim insanları, incelemelerde kullanılan teknikleri daha kolay ve uygulanabilir duruma getirmek veya daha hızlı yöntemler geliştirmek için sürekli çalışmalar yapmaktadırlar. Konvansiyonel yöntemlere nazaran daha duyarlı, spesifik, doğru ve elverişli sonuçların alınabileceği hızlı, güvenilir ve otomasyon sistemlerine uygun metotlara yönelik ilgi giderek artmaktadır (Özbaş, 2002).

Gıdalarda özellikle patojen bakterilerin canlı olarak bulunması büyük önem arz etmektedir. Örneklerde canlı bakterilerin varlığının belirlenmesi konvansiyonel olarak kültür yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem güvenilir olmakla birlikte izolasyon, sayım ve identifikasyon işlemleri uzun zaman almakta, bazen bu işlem 3-10 gün sürmektedir. Çeşitli gıdaların üretimi aşamalarında farklı teknolojik uygulamalar ve gıdanın bileşimindeki maddeler bakterisid etki gösterebilmekte ancak, inaktive olan bakteri hücresinin DNA'ları belirli bir süre gıda ürününün içerisinde bulunmakta ve varlıklarını korumaktadır. Gıdalardaki ölü bakteri hücre DNA'ları, PCR tekniğinin uygulanabilirliğini yanlış sayıda pozitiflik tespiti açısından sıkıntıya sokmaktadır (Tutar ve ark., 2015).

Klasik kültürel teknikler ile gıdalarda patojen mikroorganizmaların saptanması, genellikle ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif besiyerleri biyokimyasal identifikasyon ve serolojik teşhis gibi zaman alıcı aşamaları içermektedir. Bu şekilde, patojenlerin gıdalardan izolasyonu uzun zaman almakta, yoğun bir iş gücü ve deneyim gerektirmektedir. Vakanın aciliyeti ve gıdaların çoğunun raf ömürlerinin sınırlı olması nedeni ile klasik yöntemlerle izolasyon işlemi tamamlanamadan, bu gıdaların tüketildikleri veya raf ömürlerini tamamladıkları görülmektedir. Bu nedenle, gıdalarda bulunan mikroorganizmaların daha kısa sürede ve daha güvenilir teknikler ile tespit edilebilmesi için yapılan çalışmalar giderek artmaktadır (Özbaş, 2002).

Moleküler analiz ve teşhis teknikleri, gelişen teknolojinin mikrobiyoloji alanında kazandırdığı önemli yeniliklerdir. Gıda mikrobiyolojisi yanında çok çeşitli alanlarda yaygın kullanım alanı bulan bu yöntemler, gıdalarda bulunabilen mikroorganizmaların tespitinde oldukça güvenli bir alternatif yöntem olarak giderek önem kazanmıştır. Bununla birlikte, mikroorganizma sayısının tespiti ile izolasyon ve identifikasyonundaki spesifite ve kısa süre içinde sonuç alınabilmesi gibi özelliklerinden dolayı, moleküler biyolojik tekniklerin önemi her geçen gün giderek artmaktadır (Yelboğa ve Karagüler, 2012). Moleküler yöntemlerin henüz geliştirilmediği zamanlarda araştırmacılar, gıda örneklerinde çeşitli patojen bakterilerin var olduğunu, canlı olduklarını ama çeşitli nedenlerle üretilemediklerini (Viable but Non-Culturable Cells - VBNC) belirtmişlerdir (Higgins ve ark., 2007; Qi ve ark., 2007).

VBNC bakteriler canlı oldukları ve düşük düzeyde metabolik aktivite gösterdikleri halde nedeni bilinmeyen bir şekilde in vitro ortamlarda üretilmemektedir (Darcan, 2018). Çoğu araştırmacı bu durumu stres koşullarına cevap olarak bakterilerin hayatta kalma stratejisi olarak yorumlamaktadır. Bu durumdaki bakteri türlerinin sayısı da küçümsemeyecek düzeydedir. Bunlar arasında *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, bazı *Salmonella* türleri, *Shigella* türleri ve bazı patojenik *Vibrio* türleri yer almaktadır (Gauthier, 2000; Coutard ve ark., 2007; Du ve ark., 2007).

Benzer şekilde, yapılan bazı çalışmalarda doğada mevcut mikroorganizmaların önemli bir kısmının klasik kültürel yöntemler ile üretilemedikleri ifade edilmektedir (Amann, 1995).

Gıdalarda canlı-ölü bakterilerin PCR yöntemi ile ayrımında DNA izolasyonu öncesi Boya bazlı yöntemlerde, ölü hücrelerden veya serbest ortamdan gelen DNA molekülleri diskalifiye edilmektedir. Bu boyalardan EMA ve PMA™ bu alternatif stratejilerde en yaygın kullanılanlardır (Nocker ve ark., 2006; Nocker ve Camper 2006; Wagner ve ark., 2008; Bae ve Wuertz, 2009; Tantikachornkiat ve ark., 2016; Takahashi ve ark., 2017).

Bu çalışmada, gıdalarda Real-Time PCR tekniği ile canlı bakteri varlığı ve miktarının belirlenebilmesi için farklı yöntemlerin karşılaştırılması amaçlandı. Deneysel ısıtma işlemi sonucunda ortamda canlı kalan hücrelerin tespiti için konvansiyonel kültür yöntemi ile kantitatif Real-Time PCR yöntemi, PMA ve EMA uygulamaları ile ayrı ayrı karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

Mikroorganizmalar doğada canlı veya ölü bitki ve hayvan dokularında çeşitli organik ve inorganik bileşik içermeleri nedeniyle bol miktarda bulunabilmektedir. Çeşitli kontaminasyon kaynaklarından dolayı bu mikroorganizmalar kimi zaman bulaştıkları gıdada çeşitli şekillerdeki bozulmalara sebep olurken kimi zaman da kontamine gıdayı tüketen canlılarda önemli sağlık riskleri oluşturabilmektedir. İnsan ve hayvan sağlığı açısından değerlendirildiğinde gıdalarda bulunan mikroorganizmanın öncelikle aktif (canlı) oluşu dikkate alınmaktadır. İnaktif (ölü) bakteriler ise kültüre edilemediği için genellikle değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Toksin sentezleyen mikroorganizmaların toksinleri ise ayrıca değerlendirilmektedir. Bu durumda insan ve hayvan sağlığı açısından gıdalarda canlı bakterilerin varlığı, hijyen ve halk sağlığı açısından önemlidir (Darcen, 2018).

2.1. Gıdalarda Canlı Bakterilerin Tespiti

Gıda maddelerinin karmaşık yapıda olması (doğal mikrobiyal arka plan, besin bileşenleri, pH ve su aktivitesi gibi) nedeniyle patojen mikroorganizmaların gıdalardaki varlığının tespiti genellikle zordur. Gıdalarda bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu için günümüze kadar birçok teknik geliştirilmiştir (Liu, 2013).

Gıdalarda ve sularda canlı bakterilerin kesin olarak saptanması ve sayılması, gıdaların güvenliği, içme sularının kalite kontrolü ve tıbbi teşhis gibi birçok uygulama alanı için hayati öneme sahiptir. İdeal bir tespit yönteminin, hassas, hızlı ve uygulamasının kolay olması önemlidir. Bu amaçla halihazırda kullanılan yöntemler; konvansiyonel kültür yöntemleri, mikroskopik ve immunolojik tespit yöntemleri ve nükleik asit bazlı tespit yöntemleri olmak üzere üç bölümde ele alınabilir (Taskin, 2017).

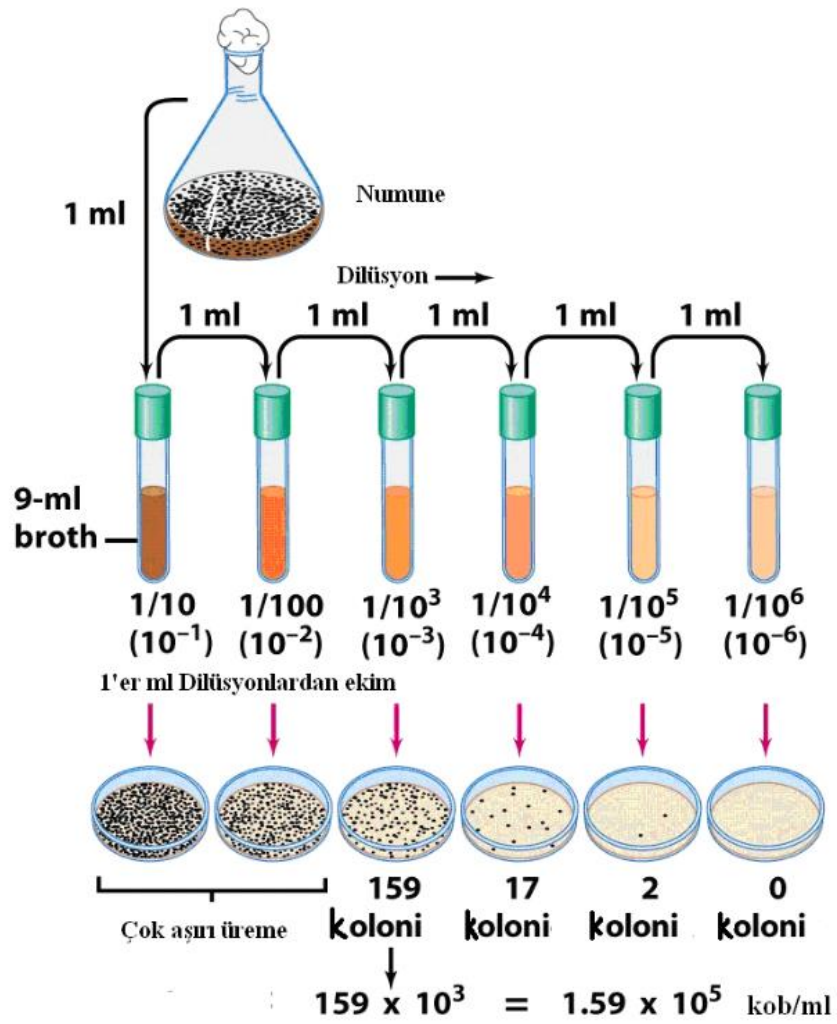
2.1.1. Kültür yöntemleri

Bu yöntemler gıda örneklerinde canlı bakterilerin tespiti açısından standart tespit yöntemi olarak kabul edilmektedir. Gıda ürünlerinde bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu için yaklaşık yüz yıldan fazla bir süredir konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Belirli bakteri türleri için geliştirilen selektif ve diferansiyel özellikteki

ortamlar kullanılarak izolasyon ve identifikasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir (FDA, 2020).

Kültüre dayalı konvansiyonel yöntemler spesifik olup emeği çok, zaman alıcı ve maliyeti yüksektir. Bu yöntemde, nihai sonuçların alınabilmesi için bakteri türüne göre değişmekle birlikte yaklaşık 4-5 gün süren ön zenginleştirme, izolasyon ve identifikasyon süreçleri de yer almaktadır. Zenginleştirme, bakterinin hücre sayısının saptanabilir seviyelere kadar çoğalmasına olanak sağlayan bir adımdır. Bu tür ortamlar besin ve antibiyotiklerin yardımıyla genellikle selektif ve diferansiyel özellikte olup incelenen bakteri, numunelerde bulunan diğer bakterilerden daha fazla üreme fırsatı bulmaktadır (FDA, 2020).

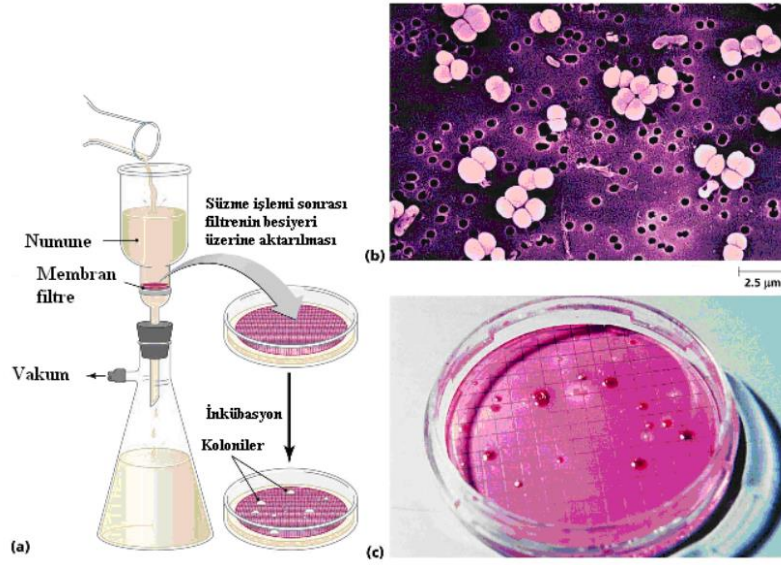
Konvansiyonel kültür yöntemlerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Mikroorganizmaların tespiti amacıyla en yaygın kullanılan bu güvenilir ve spesifik tespit yöntemlerinde sonuçların 5-7 gün içinde alınması, karakterizasyon için çeşitli serolojik ve biyokimyasal testlerin gerekliliği, önemli dezavantajlardır. Bunun yanında, kullanılan besiyerleri ile nem ve sıcaklık gibi laboratuvar koşullarının, selektif bir ortam meydana getirmesi nedeniyle, farklı ortamlarda üreyebilen mikroorganizmaların tespitinde bazı sorunlar yaşanabilmektedir (Yelboğa ve Karagüler, 2012). Diğer taraftan, incelenen örnekte strese maruz kalan ya da düşük sayıda olup hasar görmüş bakterilerin bulunması durumunda ortamdaki mikroorganizmalar seçici besiyerlerinde çoğunlukla tespit edilememektedir (Hugenholtz ve ark., 1998). Örneğin, *Campylobacter* içeren örneklerde izolasyon ve identifikasyon işlemleri yaklaşık iki haftayı bulabilmektedir (Lazcka ve ark., 2007). Öte yandan, bazı bakteriler canlı olduğu halde invitro ortamlarda üreyemediği (VBNC) için kültür yöntemleri ile tespit edilememektedir (Taskin, 2017).



Şekil 1. Kültür yönteminin şematize görünümü (www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Kültürel%20Sayım.pdf)

2.1.2. Membran filtrasyon yöntemi

Membran filtrasyon teknikleri, özellikle içme suları ve berrak meyve suları gibi çok az sayıda mikroorganizma içeren ve filtrasyonu yapılabilen örnekler için tercih edilen ideal bir teknik olarak tercih edilmektedir. Bu teknikle suda tam olarak eriyebilme özelliğine sahip tuz ve şeker gibi gıda maddelerinin mikrobiyolojik analizinde de rahatlıkla kullanılmaktadır. Filtrasyon işlemi sonrası kullanılan membran filtre, kullanılacak katı besiyeri üzerine yerleştirilerek kültüre edilmektedir (Halkman, 2005).



Şekil 2. Membran filtrasyon yönteminin şematize görünümü (www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Kültürel%20Sayım.pdf)

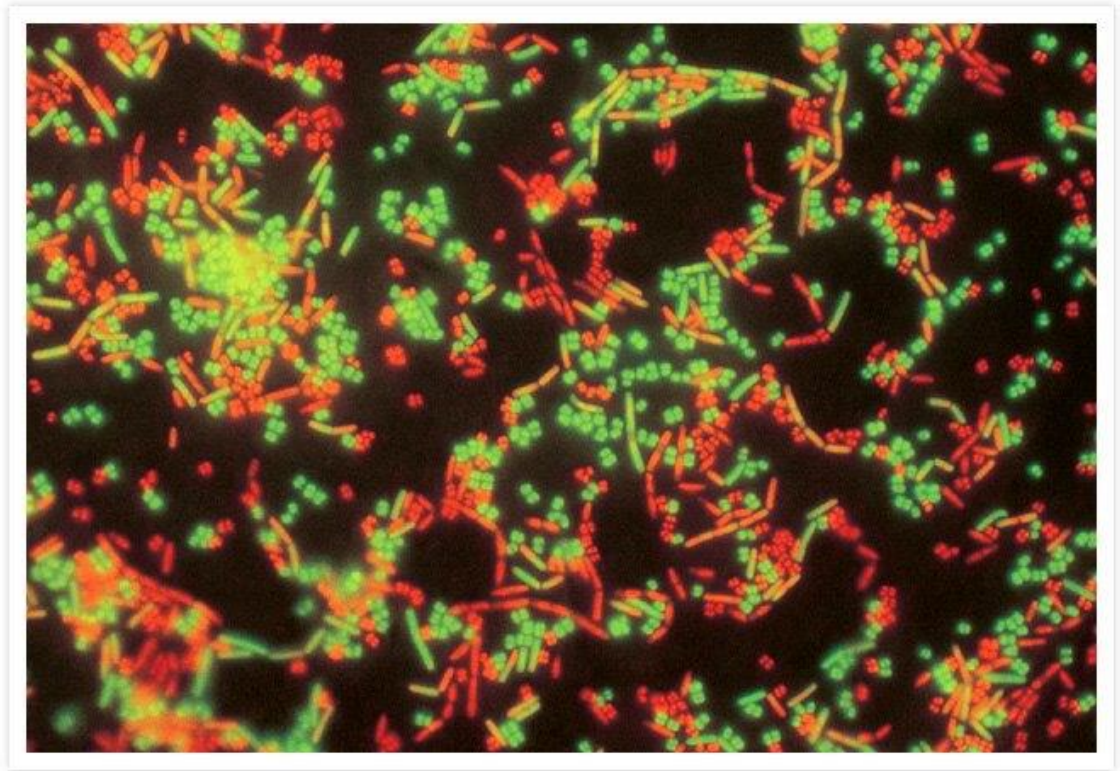
2.1.3. Mikroskopik yöntemler

Son zamanlarda bakterilerin hem canlılık tespiti hem de Gram boyama işlevi görebilen çeşitli boyama kitleri geliştirilmiştir. Bu kitler, bakteri hücre duvarının seçici geçirgenliği baz alınarak bir örnekteki canlı ve ölü hücreler arasında bir ayırım yapmak için kullanılmaktadır (Taskin, 2017).

Bu kitlerden BacLight™ kiti, SYTO9 ve propidium iyodür olarak bilinen nükleik asitlere bağlanabilme özelliğine sahip iki farklı boya içermekte ve canlı - ölü hücreler arasında ayırım yapmak için kullanılmaktadır. SYTO9 canlı bakteri membranlarına penetre olmakta ve bakteriyi boyayarak yeşil renkli flüoresans ışık vermektedir (Boulos ve ark., 1999). Öte yandan, propidium iyodür ise sadece hasar görmüş hücre duvarına sahip bakterilerin içine girebilmekte ve kırmızı flüoresans ışık vermektedir. Bu teknikte, örnekler oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 - 20 dk. muamele edilerek toplam (kırmızı + yeşil) ve canlı (yeşil) hücreler aynı anda sayılabilmektedir (Hoefel ve ark., 2003; Berney ve ark., 2007).

Bir diğer kit ise Bacterial Viability and Gram Stain Kit (Biotium™ 32001) olarak adlandırılmaktadır. Bu kitte Gram negatif ve Gram pozitiflik tespiti yanında canlı ve ölü bakterileri ayırt etmek için işlev gören CF® 488A-WGA, DAPI ve EthD-III olmak üzere

üç çözelti bulunmaktadır. Flüoresan etiketli buğday tohumu aglütini (CF[®]488A-WGA), Gram-pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının N-asetilglukosamin'ine spesifik olarak bağlanır. Testin bakteriyel canlılık bileşeni, hücre zarının bütünlüğüne dayanır. EthD-III, nükleik asit bağlayıcı bir boya olup seçici olarak hasar gören plazma membranlarına sahip hücreleri boyamaktadır. Tüm hücreler membran geçirgen DNA boyası DAPI ile mavi renk alır (Sizemore ve ark., 1990).



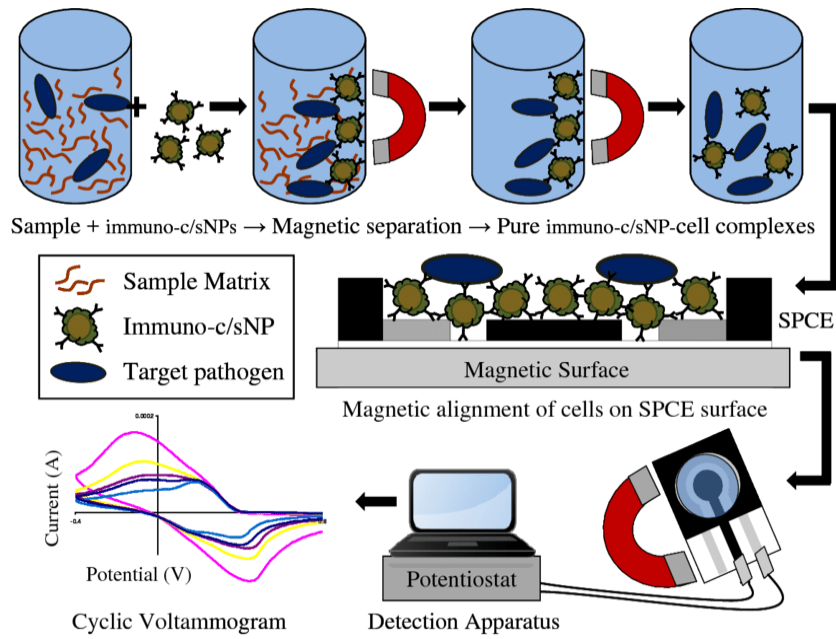
Şekil 3. BacLight[™] viability kit flüoresan mikroskop görüntüsü (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit <http://www.thermofisher.com>)

2.1.4. İmmunomagnetik separasyon

Gıdaların hızlı mikrobiyolojik analizleri için geliştirilen mikrobiyal ayırma tekniklerinden birisi de immunomagnetik separasyon (IMS) yöntemidir. IMS, hedeflenen mikroorganizmayı gıda içeriğinden doğrudan ayırarak yoğunlaştıran ve hızlı şekilde izole edebilen, kısa sürede tamamlanabilen seçici bir zenginleştirme tekniği olarak da tanımlanmaktadır (Özbaş, 2002).

Bu yöntemde, antikorlar metalik partiküller ile bağlanmakta ve bu antikorlar şüpheli sıvı örneğe ilave edilmektedir. Yaklaşık bir saat süreyle örneğin

karıştırılmasından sonra partiküllerde bulunan antikorlar örnekte varsa spesifik antijenlere bağlanır. Süreç sonunda örnek tüpü bir manyetik güç kaynağına yerleştirilir ve partiküllü antijen-antikor kompleksi mıknatıs aracılığıyla tüpten uzaklaştırılabilmektedir (Aras, 2011). İzole edilen bakteri partikül kompleksi uygun üreme ortamına aktarılmadan veya diğer belirleme sistemlerine geçmeden önce uygun tampon çözelti ile yıkama işlemi gerçekleştirilir (Safarik ve ark., 1995; Cudjoe, 1999). Tüm bu işlemlerin sonrasında metal partiküllere bağlı olan mikroorganizmalar, seçici besi yerleri ile saf kültür olarak üretilebilirler. Bu yöntem, gıdalarda patojenlerin tespitinde ön zenginleştirme ve zenginleştirme aşamalarında en az bir gün avantaj sağlamaktadır (Aras, 2011).



Şekil 4. İmmunomagnetik separasyon (IMS) süreçleri (Setterington ve Alocilja, 2012)

Hücrelerin manyetik ayrımı genellikle kesintili olarak gerçekleştirilmektedir. Kromatografik ve elektromigrasyon yöntemleri açısından bakıldığında, manyetik ayırma yöntemleri bir ön ayırma işlemi olarak tanımlanabilmektedir (Safarik ve Safarikova, 1999).

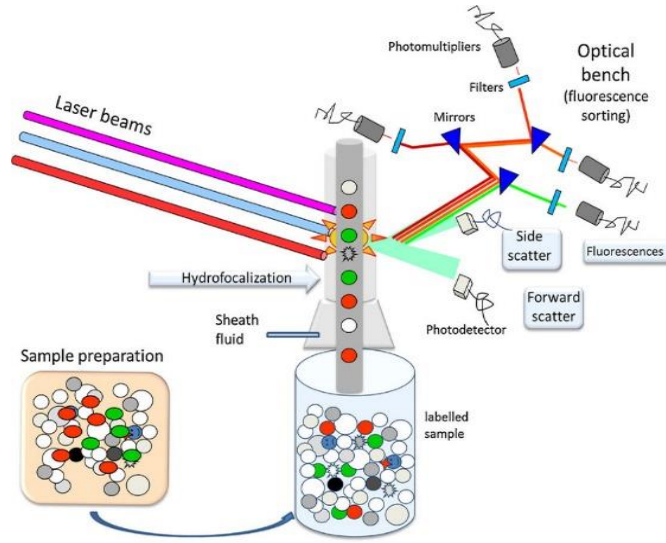
IMS, *E. coli* O157:H7'nin saptanmasını kolaylaştırmak için başarıyla kullanılmıştır. Wang ve ark. (2007), IMS ile Real Time PCR birleştirildiğinde, kıymada

E. coli O157:H7 saptama sınırının 10^5 kob/g'dan 10^3 kob/g'a düşürülebildiğini bildirmişlerdir.

2.1.5. Akış sitometrisi

Sitometri, biyolojik partiküllerin veya hücrelerin kimyasal ya da fiziksel karakterlerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ise, akmakta olan bir sıvıdaki hücrelerin veya binlerce partikülün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin lazer içinden geçerken analiz edebilen otomatik mikroskopi olarak da tanımlanabilir (Veal ve ark., 2000). Flow sitometrideki temel yaklaşım; hücrelerin şekil, boyut, DNA ve RNA içerikleri ile sitoplazmalarındaki granül yoğunluğunun incelenmesidir. Bu amaçla incelenecek hücre ya da yapı, öncelikle bir flüoresan ışık veren bir madde ile işaretlenen antikor veya spesifik bir boya (propidium iodide) ile işaretlenir. Bu teknik, mikroorganizmaların identifikasyonunu, canlılığını, sayısını ve bazı antimikrobiyel ajanlara karşı duyarlılığının tespitinde de kullanılmaktadır (Kanev ve Muranlı, 2016). Ancak bakteri sayımındaki başarı düzeyinin düşük olması ve bazı türlerin belirlenememesi gibi dezavantajları nedeniyle pek başarılı sonuçlar vermemiştir (Nocker ve Camper, 2006).

Hızlı olan bu teknikte ile tek hücreli flüoresan özelliğe sahip canlılar çok kısa zamanda çok duyarlı olarak sayılabilmekte ve saniyede binlerce partikül sayımı yapılabilmektedir. Her bir dalga boyu ya da her bir partikül boyutunun yüksek duyarlılıkla ayrı ayrı analizi mümkündür. Flüoresan ölçümleri için varyasyon sabiti ve tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ($CV = \text{standart sapma} / \text{ortalama}$) %1'den küçüktür. Akış sitometrisinin kendisine özgü ve en güçlü avantajı, herhangi bir optik karakteristik veya bunların kombinasyonları ile incelenen hücreleri fiziki açıdan birbirlerinden ayırt edebilmesidir. Bu yöntemle, daha ileri teknikler uygulanarak spesifik hücrelerin saf örneklerini ayırmak mümkün olabilmektedir (Azkur ve Aslan, 2012).



Şekil 5. Flow sitometrinin çalışma prensibi (Depince-Berger ve ark., 2016)

2.1.6. Serolojik tespit yöntemleri

Bakterilerin tespiti ve sayımı için çok sayıda serolojik tespit yöntemi geliştirilmiştir. Bunların tümü, hedefleri yakalamak için monoklonal veya poliklonal antikorların kullanımına dayanmaktadır. İşaretli antikorlar daha sık kullanılırken, işaretlenmemiş antikorlar düşük sensitivite nedeniyle daha az kullanılmaktadır (Aras, 2011).

Tokarsky ve Marshall (2008), *E. coli* O157:H7'nin serolojik tespiti için yaptıkları çalışmada, antikor işaretlemede enzimler, ışıma veren bileşikler, floroforlar ve iletken polimerler kullanmışlardır. Bu şekilde işaretlenmiş antikorların yardımıyla, reaksiyon ürünleri floresan, kimyasal ışıma veya elektrokimyasal özellikler ölçülerek *E. coli* O157:H7'nin tanımlanabildiğini bildirmişlerdir.

Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), özgüllüğü, basitliği ve duyarlılığı nedeniyle gıda kaynaklı patojenlerin saptanmasında tüm serolojik yöntemler arasında en yaygın kullanılan teknik olmuştur. Gıdalardaki patojenleri tespit etmek için kullanılan sandviç ELISA, çok fazla antikorla kaplanmış bir katı faz ile gerçekleştirilir. Örneklerde bulunan antijenler, inkübasyon sırasında antikorlarla reaksiyona girer. Yıkandıktan sonra, bağlı antijenler, nicel sinyaller üretmesine neden olan enzim etiketli antikorlarla işleme tabi tutulur. Ardından bir kromojenik veya florojenik substrat ile saptanır (Crowther, 2008).

2.1.7. Nükleik asit bazlı tespit yöntemleri

Nükleik asit bazlı moleküler teşhis yöntemleri, her geçen gün gelişen teknolojinin mikrobiyoloji alanına kazandırmış olduğu en önemli yenilikler arasındadır. Moleküler teşhis yöntemlerine sürekli olarak bir yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yapılan çeşitli bilimsel araştırmalara önemli katkılar sağlamaktadır. Tüm dünyada yaygın olarak kullanılan bu teknikler, uygulandıkları alanlara göre bazı avantaj ve dezavantajlara sahip olabilmektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Nükleik asit bazlı tespit yöntemleri çok hassas olup farklı pimerler kullanılarak incelenecek gen bölgeleri çok spesifik hale getirilebilir. Gıda analizinde nispeten yeni uygulanmalarına rağmen, nükleik asit bazlı yöntemler gıda kaynaklı patojenlerin tespit etkinliğini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Gıdalardaki patojenlerin saptanması için çok sayıda nükleik asit tabanlı yöntem geliştirilmiştir (Liu, 2013).

Gıda kökenli enfeksiyonlara neden olan patojen mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tanımlanmasında kullanılan materyal; saf kültür, ön zenginleştirme ya da seçici besiyerlerinde üretilen bakteriler veya doğrudan gıda maddesinin kendisi olabilmektedir. Bu yöntemde ana materyal olarak kullanılacak hedef mikroorganizmanın DNA'sı spesifik DNA ekstraksiyon kitleri ile izole edilmektedir (Aydın ve Sudağdan, 2016).

Ayrıca, gıda kaynaklı mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle tespitinde doğru 16S rRNA hedef gen bölgesinin seçimi çok önemlidir. Yüksek derecede korunaklı olan bu bölgenin farklı mikroorganizmalarda kayda değer ölçüde sekans çeşitliliği ile birbirinden farklı 9 hiper değişken bölgeye sahip olması, bu bölgenin hedef olarak seçilmesinde önemli bir gerekçedir (Beneduce ve ark., 2007).

Gıdaların hazırlanması veya üretimi esnasında başvurulmuş bazı teknolojik işlemler, gıdalarda bulunan mikroorganizmaların inaktivasyonuna neden olabilirken, onların DNA'ları üzerinde etkisiz olabilmektedir. Bu süreçte DNA'nın hücre inaktive olduktan sonra bile ortamda bulunması, moleküler yöntemlerde canlı hücrelerin tespiti açısından yanlış pozitif sonuçlara sebep olabilmektedir. Bu olumsuz durumu en aza indirmek amacıyla yapılan çalışmalar, daha çok ekstraksiyon öncesi, ortamdaki inaktive

olmuş hücrelere ait DNA'nın elimine edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Hücre duvarının bütünlüğü, canlı hücreler ile önemli düzeyde hasar görmüş hücrelerin ayırımında en önemli kriterdir. Nükleik asit bazlı moleküler yöntemler arasında canlı-ölü bakterileri ayırmada Spesifik Boyalı Quantitative PCR (qPCR) yöntemi son zamanlarda ön plana çıkmaktadır (Kesmen ve Aslan, 2017).

Moleküler biyolojik tekniklerdeki en önemli zorluk DNA izolasyonu sonrasında canlı ve ölü hücre DNA'larının birbirinden ayıramamasıdır. Bu sorunların çözümü amacıyla son zamanlarda, yeni ve gelecek vaat eden DNA tabanlı bazı stratejiler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin amacı, DNA izolasyonu veya PCR reaksiyonları sırasında ölü hücrelerden veya serbest ortamdan gelen DNA moleküllerini diskalifiye etmektir. Bu amaçla, nükleik asitlere bağlanabilen foto-indüklenebilir boyalar kademeli olarak kullanım alanı bulmuştur. Ethidium monoazide (EMA) ve propidium monoazide (PMA™) boyları bu alternatif stratejilerde en yaygın kullanılanlardır (Nocker ve Camper, 2006; Nocker ve ark., 2006; Wagner ve ark., 2008; Bae ve Wuertz 2009; Tantikachornkiat ve ark., 2016; Takahashi ve ark., 2017).

EMA ve PMA boyları canlı bakterilerin hücre duvarından geçememektedir. Bunların en önemli özelliği hücre duvarı zarar görmüş ve zarar görmemiş olan ölü bakterilerin hücre duvarından geçebilmeleridir. Bu boyalar, herhangi bir DNA'ya bağlandığında, DNA fotoliz yoluyla kalıcı olarak modifiye edilir. Sonuç olarak, bu boya molekülleri tarafından çevrelenen DNA dizileri amplifiye olamaz. EMA ile kıyaslandığında PMA™'nın, yüksek pozitif yükü nedeniyle canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırabilen daha etkili bir boya olduğu bildirilmiştir (Nocker ve ark., 2006).

EMA'nın seçici olarak hasarlı hücrelere girdiği ve fotokimyasal olarak hücrelerin DNA'sına bağlanmak suretiyle ölü hücrelerin DNA'larından kaynaklı PCR amplifikasyonunu azalttığı ifade edilmiştir (Nogva ve ark., 2003). Ancak seçiciliğinin yetersiz olması ve sınırlı sayıda mikroorganizma türlerinde uygulanabilmesi nedeniyle EMA'ya alternatif olarak PMA™ boyası geliştirilmiştir. PMA'nın yapısında fotoaktivasyon sonrası DNA'ya kovalent bağlanmayı sağlayan bir azide yapı bulunmaktadır. PMA'nın bu özelliği nedeniyle EMA ile karşılaştırıldığında, çok farklı hücre türünde olumlu sonuçlar verdiği ve selektivitesinin daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Nocker ve ark., 2006).

Nocker ve ark. (2006), canlı-ölü hücrelerin bulunduğu ortamlarda EMA ile karşılaştırıldığında PMA'nın Gram-pozitif ve Gram-negatif canlı bakterilerin hücre duvarlarından daha az geçtiğini saptamışlardır. Bu durum, canlı hücrelerin DNA'larının selektif amplifikasyonunda PMA'nın EMA'dan daha başarılı sonuçlar verdiğini göstermektedir (Cawthorn ve Witthuhn 2008). Gıdalarda bulunan canlı patojen mikroorganizmaların tespitinde PMA ile birleştirilen qPCR metodunun başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Kesmen ve Aslan, 2017).

Gıda kaynaklı intoksikasyonlar ve mikrobiyal enfeksiyonlar, küresel boyutlarda potansiyel riske sahip, önemli sağlık problemlerine neden olabilecek ve ekonomik kayıplara yol açabilecek sıkıntılara neden olmaktadır. Bu yüzden, söz konusu hastalıkların önlenmesi amacıyla, günümüzde kısa sürede, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip teknikler ile etkenlerin identifikasyonunun yapılabilmesi büyük önem taşımaktadır (Aydın ve Sudağıdan, 2016).

Mikroorganizmaların ve özellikle çeşitli örneklerden gelen bakterilerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için birçok strateji geliştirilmiştir. Geleneksel yöntemler, kültüre edilebilir mikroorganizmaların karbon ve/veya diğer enerji kaynakları içeren uygun bir ortamda üretilmesi için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, bu geleneksel kültür temelli yöntemlerin çeşitli dezavantajları da vardır. Zaman alıcı ve zahmetli olmaları yanında tüm bakterileri, özellikle de zarar görenler veya canlı fakat kültüre edilemeyen (Viable But Nonculturable-VBNC) bakteriler tespit edilememektedir. Kültürden bağımsız yöntemler bu kısıtlamaları ortadan kaldırmakla beraber incelenen hedef bakterilerin tespiti, identifikasyonu ve miktar tayini için de yeni araçlar sağlamaktadır (Hazen ve ark., 2013).

Örneklerin incelenme amacı, kantitatif analizden ziyade sadece tespit ve identifikasyon ise kullanılan yöntem sayısı daha fazladır. En yaygın olarak kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemleri konvansiyonel PCR ve multipleks PCR'dır. Bunun yanında Amplified fragment length polymorphism, Restriction Fragment Length Polymorphism, Pulsed Field Gel Electrophoresis ve Denaturing Gradient Gel Electrophoresis gibi farklı fingerprint yöntemleri çeşitli örneklerdeki mikroorganizma varlığını analiz etmek için kullanılmaktadır (Wagner ve ark., 2015). Bununla birlikte, gıdalarda tüm bu moleküler yöntemlerin doğruluğu, nükleik asitlerin doğru kaynaklardan

ekstraksiyonuna bağlıdır. Dolayısıyla ölü hücrelerden veya serbest DNA moleküllerinden alınan veriler, yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir (Smith ve Osborn, 2009).

Ortamda bulunan ölü hücreler ve hücre dışındaki serbest DNA'lar, çoğu zaman DNA ekstraksiyon işlemlerinde handikapa neden olur. Bu istenmeyen faktörler, özellikle ölü hücrelerin DNA'larının incelenen örnekte bulunması, olası mikrobiyal riskin fazla tahmin edilmesine neden olabilmektedir. Ayrıca, mRNA moleküllerinin hücre ölümünden birkaç saat sonra bile tespit edilebilir bir biçimde var olabileceği belirtilmiştir (Keer ve Birch, 2003).

Yeni moleküler bazlı yöntemlere yönelik diğer bir önemli ihtiyaç da ortamda VBNC bakterilerin de bulunmasıdır. Ayrapetyan ve Oliver (2016), yapılan birçok araştırmada, çeşitli VBNC patojenlerinin virülens faktörü üretmeye devam edebildiğini ve bu nedenle daha etkili tespit yöntemlerinin kullanılmasının gerekli olduğunu vurgulandığını belirtmişlerdir.

Ölü ve canlı hücreleri doğru şekilde ayırt etmek için ekstraksiyondan ve qPCR'dan önce hücre duvarından geçebilen nükleik asit bağlayıcı boyaların kullanımı giderek daha fazla uygulama alanı bulmaktadır (Nocker ve ark., 2006).

Yöntem gereği yapılan yoğun ışık uygulamasında (fotoaktivasyon) bu boya, çift sarmallı DNA ile etkileşime girerek geri dönüşümsüz modifikasyona neden olan bir kovalent bağ oluşturmakta ve bu DNA PCR ile amplifiye olamamaktadır. Bu özellik, canlı hücrelerin seçici değerlendirmesinde boyayı çok tercih edilebilir kılmaktadır. PMA™, Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri (Nocker ve Camper, 2006, Bae ve Wuertz, 2012, Taylor ve ark., 2014), virüsleri (Sánchez ve ark., 2012), sporları (Rawsthorne ve ark., 2009), mantarları (Vesper ve ark., 2008), archaea (Heise ve ark., 2016)'ları ve protozoaları (Alonso ve ark., 2014) kapsayan çeşitli çalışmalarda başarıyla uygulanmıştır.

Ortamda VBNC hücrelerin varlığı ve artışı, halk sağlığı riskini artırır. Bu mikroorganizmaların bir örnekte tespiti ve kantitatif analizi için standart yöntemler yetersiz kalmaktadır. Araştırmacılar yeni yöntemler geliştirmeye başlamış olmakla birlikte bu alandaki çalışmalar halen devam etmektedir. Ayrıca, farklı ortamlarda var oldukları bilinen VBNC'ler gizemlerini korumaya devam etmektedir. Bu nedenle,

üretilemeyen canlı hücrelerin tespitine yönelik gelişmiş metotların bulunması sadece halk sağlığı için yararlı olmakla kalmayacağı, aynı zamanda mikrobiyoloji alanında da büyük keşiflere yol açabileceği bildirilmiştir (Taskin, 2017).

Bu alanda konvansiyonel kültür yöntemleri ile teşhiste karşılaşılan sorunlar, günümüzde gelişimi sürekli devam eden farklı moleküler analiz teknikleri ile çözülme yoluna başvurulmaktadır. Bu teknikler ile gerek toplum sağlığı, gerek endüstriyel ve gerekse bilimsel açıdan anlanımlı kabul edilen gelişmeler olabildiği gibi analiz tekniklerinde hızlı ve doğru sonuç alınması mümkün olacağından, bu yöntemlerin olumlu ve olumsuz yönleri araştırılarak farklı tekniklerle uygulanabilirliklerinin ve optimizasyonlarının sağlanmasının büyük önem taşıdığı ifade edilmektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Kary Mullis tarafından ilk olarak 1985'te icat edildi ve o günden bu yana nükleik asit bazlı tespit teknikleri arasında en popüler yöntem olmaya devam etmektedir. Halihazırda gıda, dışkı ve çevresel örneklerdeki patojenleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Saiki ve ark., 1985; Mullis ve ark., 1986; Liu, 2013).

Konvansiyonel PCR

PCR, tekrarlanan sıcaklık döngüleri sırasında DNA polimeraz enzimi ve tasarlanmış oligonükleotit primerler kullanılarak hedef DNA'nın spesifik bölgelerini çoğaltma esasına dayanan in vitro bir yöntemdir (Levin, 2009). PCR kullanılarak gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tespitinde virulensle ilişkili genler ve ribozomal RNA, birincil hedeflerdir (Swaminathan ve Feng, 1994). Reaksiyon reaktifleri, bir termostabil polimeraz enzimi, deoksiribonükleosit trifosfatlar (dNTP'ler), DNA'nın belirli bölgelerini hedefleyen bir çift tasarlanmış primer, magnezyum klorür ve incelenecek DNA'dan oluşmaktadır (Gorski ve Csordas, 2009).

Tipik bir PCR termal döngüsü denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç adımdan oluşur. Denatürasyon aşamasında, çift sarmallı DNA 95°C sıcaklıkta tek

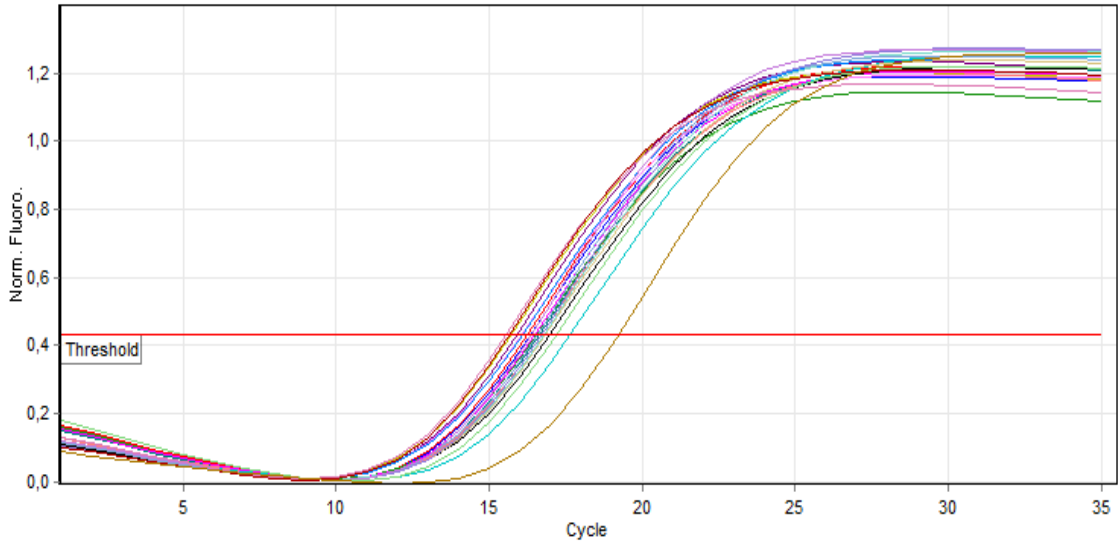
iplikçiğe ayrılır. Bağlanma adımı sırasında, iki spesifik primerin, hedef DNA'nın tek iplikçiklerinde tamamlayıcı dizilerine bağlanmasını sağlamak için sıcaklık düşürülür. Uzatma adımında sıcaklık 72°C'ye yükseltilir. Bu adımda DNA polimeraz, iki primerin 3' uçlarına dNTP'ler ekleyerek DNA şablon zincirine komplementer olan yeni bir DNA zincirini sentezler. Döngüler, tipik bir PCR reaksiyonunda 30-40 kez tekrarlanır ve 60 ila 120 dk. sürer. PCR reaksiyonunda hedef kopya sayısı her aşamada katlamalı olarak artar. PCR'ın hedef DNA bölgesini çoğaltıp çoğaltmadığını kontrol etmek ve PCR ürünlerini boyutlarına göre ayırmak için genellikle agaroz jel elektroforezi kullanılır (Swaminathan ve Feng, 1994).

Real Time PCR

Konvansiyonel PCR, DNA ürünlerinin amplifikasyonu ve amplifiye ürünlerin değerlendirilmesi için ayrı donanımlar gerektirir (Gorski ve Csordas, 2009). Real Time PCR tekniği ise PCR ürünlerinin amplifikasyonunu ve kantitatif analizini anlık olarak tek adımda birleştirir. Real Time PCR'da bir dizi floresan okuma sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde flüoresan ışık ile okuma yapılabilmesi için ışığa yapabilen boyalar kullanılmaktadır. Bu boyalardan SYBR Green, Real Time PCR'da yaygın olarak kullanılan spesifik olmayan çift sarmallı DNA'nın küçük oluklarına bağlanan ve bağlandığında floresan ışığa veren termostabil bir boyadır (Gorski ve Csordas, 2009). Sıcaklığı yavaşça yükselterek ürünlerin özgüllüğünü doğrulamak için PCR'dan sonra ek bir ısıtma aşaması eklenir. Çift sarmallı DNA eridikçe ve SYBR Green ayrıştıkça floresan azalır. Erime sıcaklığı, çift sarmallı DNA'nın yarısının tek sarmallı DNA'ya ayrıldığı sıcaklıktır. Farklı dizilimleri ve uzunlukları nedeniyle her ürünün kendine özgü erime sıcaklığı olduğundan, bu sayede ürünler birbirinden ayırt edilebilir (Fratamico ve Bayles, 2005).

Real Time PCR reaksiyonunda, üretilen floresan sinyaller, bir bilgisayar tarafından kolayca kaydedilip analiz edilebilmektedir. Floresan yoğunluğu, Real Time PCR reaksiyonunda PCR ürünlerinin miktarıyla doğru orantılı olarak artar. Döngü eşiği (Cycle threshold - Ct), bir floresan sinyalinin belirli bir eşiği geçmesi için gereken döngü sayısı olarak tanımlanır. Ct, numunelerde bulunan hedef DNA konsantrasyonunun bir belirtecidir. Başlangıç konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa, Ct değeri o kadar küçük

olur. Floresansın döngü sayısına göre çizilmesi, reaksiyon sırasında PCR ürünlerinin birikimini temsil eden bir eğri oluşturur (Şekil 6). Kopya sayısı bilinen DNA konsantrasyonlarına karşılık gelen Ct değerlerine göre yapılacak çizimle standart bir eğri oluşturulabilir. Böylece, incelenen numunelerdeki hedef DNA miktarı, Ct değerlerinin standart eğri ile kıyaslanması suretiyle hesaplanabilir. Bu şekilde, Real Time PCR ile örneklerdeki DNA'nın miktar tayini gerçekleştirilebilir (Gorski ve Csordas, 2009).



Şekil 6. Real Time PCR reaksiyonu ve kantitatif analiz

Multipleks PCR

Gerçekte, bir gıda maddesi aynı anda çeşitli patojen bakteriler tarafından kontamine olabilir. Birden fazla şüpheli patojenin aynı anda analiz edilebilmesi önemli bir avantajdır. Multipleks PCR tekniğinde, tek bir reaksiyonda birden fazla primer çifti kullanılarak birden fazla hedefin eşzamanlı amplifikasyonu gerçekleştirilebilir. Bu şekilde, multipleks PCR testleri çok işçilik, zaman ve maliyet tasarrufu sağlamaya yardımcı olabilir. Bununla birlikte, bağlanma sıcaklığı ve reaktif konsantrasyonları gibi reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu, multipleks PCR için çok önemlidir. Konvansiyonel multipleks PCR'da farklı boyutlardaki hedefleri ayırt etmek için jel elektroforezi kullanılır. Multipleks Real Time PCR'da ise spesifik olmayan çift sarmallı DNA bağlayıcı boyalar kullanılmakta ve hedef diziler farklı erime sıcaklıklarına sahip olacak şekilde tasarlanmaktadır. Bu boyalardan günümüzde kullanılanlar; SYBR Green,

Eva Green, ActB, ERBB2, Atto425, 6-FAM, TET, VIC, JOE, Yakima Yellow, HEX, Cy3, TAMRA, ROX, Texas Red, Cy5 ve Quasar 705 sayılabilir (Anonim 1; Wang ve ark., 2007).

Hibridizasyon

1980'lerin başında geliştirilen hibridizasyon, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları tespit etmek için kullanılan ilk nükleik asit bazlı yöntemdir (Hill, 1981). Tamamlayıcı işaretli nükleik asit problemleri kullanarak DNA veya RNA hedeflerini tespit eder. Gıda kaynaklı patojenleri saptamak için hibridizasyon deneylerinde yaygın olarak virülensle ilişkili genler ve 16S rRNA gen bölgeleri hedeflenir. Hibridizasyonun katı faz hibridizasyonu (koloni hibridizasyonu) ve sıvı faz hibridizasyonu olmak üzere iki formatı vardır. Katı faz hibridizasyonu, bir birincil izolasyon plakası üzerindeki kolonilerin nitrosellüloz veya naylon membranlar gibi katı bir desteğe transferini içerir. Sıvı fazlı hibridizasyonda, hibridizasyon ürünleri çözelti içinde oluşturulabilir ve doğrudan reaksiyon tüpünde saptanabilir. Hibridizasyon testinin kullanım kolaylığı ve prob etiketleri için birçok seçeneğin olması gibi çeşitli avantajları bulunmasına rağmen, en büyük dezavantajı zaman alıcı olmasıdır. Hibridizasyon deneylerinin, pozitif bir sonuç verebilmesi için 10^4 ila 10^5 bakteri hücresi gerekir. Bu nedenle zenginleştirme için genellikle 18 ila 48 saat sonrası birkaç saat da hibridizasyon işlemi sürer (Swaminathan ve Feng, 1994).

İzothermal amplifikasyon tekniği

İzothermal amplifikasyon teknikleri, termal döngü için karmaşık ekipman gerektirmez ve basit bir su banyosu ile çalışabilirler. Hedef dizilerin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için bir izothermal amplifikasyon analizinde yer alan birkaç enzim ve birden fazla primer seti vardır. Loop Mediated Amplification (Döngü aracılı amplifikasyon) ve Nucleic Acid Sequence Based Amplification (nükleik asit sekans tabanlı amplifikasyon) gibi birçok izothermal amplifikasyon analizi geliştirilmiştir (Hara-Kudo ve ark., 2007).

Hara-Kudo ve ark. (2007), kıymada *E. coli* O157:H7'nin tespiti için 18 saatlik bir zenginleştirmeden sonra saptanabilen bir Loop Mediated Amplification tekniği

geliştirmişlerdir. Bu tekniğin 25g kıyma içindeki dokuz kob/ml *E. coli* O157:H7 hücrelerini tespit edebilme sensitivitesinin geleneksel bir PCR'ından 100 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Won ve ark. (2010), kıymada *E. coli* O157:H7'nin saptanması için bir saç ilmek tipi raporlama probu kullanan bir Nucleic Acid Sequence Based Amplification analiz tekniğini kullanmışlar ve bu teknik ile 1 g sığır etinde 100 kob/ml kadar düşük *E. coli* O157:H7 hücrelerinin tespit edilebildiğini bildirmişlerdir.

2.1. Canlı, Fakat Kültüre Edilemeyen Bakteriler

Gıdalarda bakteriyel etkenlerin varlığı geleneksel olarak kültür yöntemleri ile araştırılmaktadır. Canlı organizmaların varlığı ve sayısı gıda ile ilgili olarak halk sağlığı bakımından ciddi önem arz etmektedir. Ancak gıdalarda canlı olup da kültüre edilemeyen bakteriler de bulunmaktadır. Araştırmacılar, geçmişte yaptıkları çalışmalarda gıda örneklerinde çeşitli patojen bakterilerin var olduğunu, canlı olduklarını ama çeşitli nedenlerle üretilemediklerini (Viable but Non-Culturable Cells - VBNC) belirtmişlerdir. Bu durumdaki bakteriler canlı oldukları ve düşük düzeyde metabolik aktivite gösterdikleri halde nedeni bilinmeyen bir şekilde in vitro ortamlarda üretilmemektedir (Higgins ve ark., 2007; Qi ve ark., 2007).

Çevresel stres faktörleri, antitoksinlerin bozulmasına ve bakteri toksinlerinin serbest bırakılmasına neden olan bazı hücresel süreçleri indükler. Bu durum, hücresel metabolizmayı ve sonuç olarak üremeyi etkilemektedir. Uyuşukluğun ilk aşamalarında, stres faktörleri giderildiği takdirde hızla yeniden canlanabilen, üreyebilen hücreler (ısınan hücreler) gelişir. Aktive olan veya aktif hücreler nispeten düşük düzeyde sentezlenen serbest toksin seviyelerine sahip olduğundan besiyerinde çoğalabilirler. Öte yandan, eğer hücreler uzun süreli strese maruz bırakılırsa, serbest toksin birikimi artacağından uykuda kalma süresi de artar ve metabolik aktivite giderek azalır. Böylelikle canlı ancak kültüre edilemeyen (VBNC) hücreler oluşur. Bu bakterileri yeniden aktif hale getirmek için daha fazla zaman gerekir. VBNC bakterileri, indükleyici stresin kaldırılmasından sonra yeniden inkübasyona bırakıldığında metabolik aktiviteleri giderek artarken, serbest toksin seviyeleri de yavaş yavaş düşer. Ortamdaki serbest toksin belli bir eşiğinin altına düştüğü takdirde, önce persiste ve ardından aktif hücre formlarına dönüşebilirler. Her iki aşamada da besiyerlerinde üretilibilmeleri mümkün olmaktadır (Ayrapetyan ve ark., 2015). Bu

bakteriler hala birçok sektörde tehdit oluşturduğundan incelenecek örneklerde üretilibilmeleri ve teşhis edilebilmeleri büyük önem taşımaktadır (Oliver, 2010).

Konvansiyonel kültür yöntemlerinin, bakterilerin üremesi için gereken süreden nispeten daha uzun sürede üreyen ve canlı olup da kültüre edilemeyen hücrelere (VBNC) ilişkin duyarlılık eksikliği de dahil olmak üzere bazı dezavantajları vardır. Bu nedenle, hızlı ve doğru tespit yöntemleri kullanılarak yapılan etken analizi, gıda endüstrisi için büyük önem arz etmektedir (Kramer ve ark., 2009).

2.2.1. Gıdalarda canlı ve kültüre edilemeyen bakterilerin tespiti

Gıdalarda canlı bakteri varlığını tespit etmek amacıyla genellikle konvansiyonel kültür yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin bir handikabı canlı olup kültüre edilemeyen (VBNC) bakterileri tespit edememesidir (Roszak ve Colwell, 1987). VBNC hücreleri, zaman içinde metabolik aktivitelerini yeniden kazanabilmekte ve uygun koşullar altında patojenik etkilerini gösterebilmektedirler. Bu durum tüketici sağlığı için risk oluşturmaktadır (Asakura ve ark., 2008). *E. coli* O157:H7'nin VBNC durumuna girebildiği ve bir konakçıya bulaştıktan sonra yeniden aktif patojen ve bulaşıcı bir forma dönüşebildiği bildirilmiştir (Rivers ve Steck, 2001). Ayrıca, besin içerikleri, doğal mikrobiyal yük, pH ve su aktivitesi gibi gıda matrikslerinin karmaşıklığı nedeniyle kültüre dayalı yöntemlerin kullanımında bazen güçlükler yaşanmaktadır. Bu nedenle, sadece canlı hücrelerin tespiti için yeni ve daha hızlı yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Liu, 2013).

Boya bazlı yöntemler

Canlı hücreleri ölü hücrelerden mikroskopik incelemede ayırt etmek için bazı boyama kitleri geliştirilmiştir. Bu kitlerden biri BacLight™ kiti (Boulos ve ark., 1999), bir diğeri ise Bacterial Viability and Gram Stain Kiti (Biotium™ 32001)'dir. Ancak hücreleri mikroskop altında incelemek ve saymak emek yoğun ve zaman alıcı bir yöntemdir. Bu tekniğin tek belirgin eksikliği, bir floresan mikroskobu gerekliliğidir (Sizemore ve ark., 1990).

Boya bazlı tespit yöntemlerinin biri de akış sitometrisi tekniği olup, hızlı sonuç alınması bakımından önemli bir yöntemdir. Bu teknikte hücreler, sıvı ortamda cihazdaki bir ışık huzmesi içinden geçer. Her hücrenin ışınla etkileşimi otomatik olarak kaydedilebilir. Kullanılan boyalara bağlı olarak, her bir hücrenin yapısı ve işlevleri gibi çoklu hücresel parametreleri, akış sitometrisi ile aynı anda ölçülebilmektedir (Comas-Riu ve Rius, 2009).

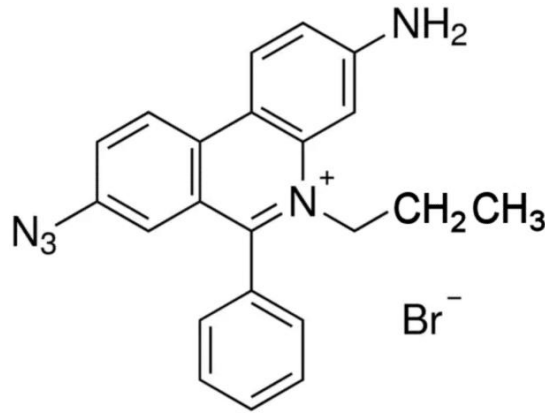
PCR tabanlı yöntemler

Real Time PCR

Real Time PCR tekniği ile, konvansiyonel PCR özelliklerine ilaveten kantitatif analiz de yapılabilir. Bu bakımdan bir örnekteki hücre sayısı da belirlenebilmektedir. Bu anlamda, kantitatif Real Time PCR (qPCR), patojen mikroorganizmaların spesifik olarak tespitine ve miktar tayinine imkan veren hızlı, hassas, yüksek verimli ve otomatik bir teknik olduğu, gıda analizleri için çok uygun bir tanı yöntemi olduğu bildirilmiştir (MacKay, 2004; McKillip ve Drake, 2004).

Ethidium monoazid bromide bazlı PCR

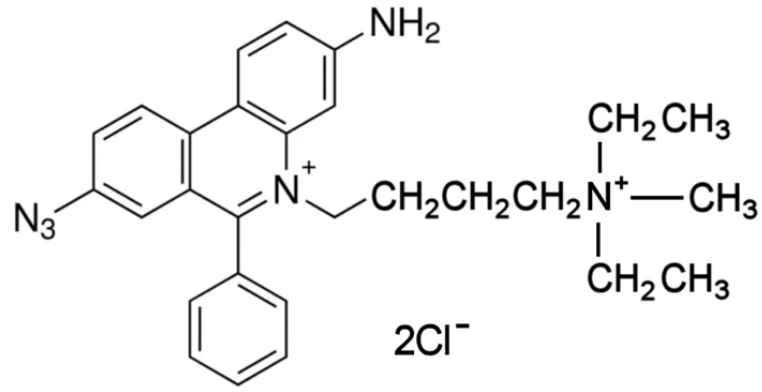
Ethidium monoazide bromide (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-ethyl-6-phenyl bromide - EMA), fotoafinite etiketine sahip bir floresan nükleik asit boyasıdır. Boya, fotoaktivasyondan sonra nükleik asitlere kovalent olarak bağlanır. Bu özellikleri ile DNA üzerindeki ilaç bağlanma yerlerinin izini sürmek, plazmid DNA'yı modifiye etmek ve lökosit fagositoz analizleri için maya hücrelerini etiketlemek amacıyla kullanım alanı bulmuştur. Bu boyanın bir diğer önemli özelliği de birbirleri ile karışık canlı ve ölü hücre popülasyonundaki ölü hücreleri işaretleyebilmesidir. Canlı hücrelerin duvarından nispeten geçemeyen EMA, ölü hücrelerin duvarından geçerek DNA'ya selektif olarak bağlanabilmektedir. Bağlanma sonrası uygulanan fotoaktivasyon ise boyanın ölü hücre DNA'sına kovalent olarak bağlanmasını ve işaretlenmesini sağlar. Bu aşama sonrasında mikroskopi, flow sitometri tekniği veya qPCR tekniği ile analizler yapılabilir. EMA uygulamasının en büyük avantajı, canlı patojen organizmalar ile ilgili kapsamlı araştırmalara olanak sağlayabilmesidir. Özellikle de EMA + qPCR ile canlı ve ölü bakterileri ayırt etmek için kullanım alanı bulmuştur (Anonim 2).



Şekil 7. EMA'nın kimyasal yapısı (Biotium product information - <http://www.biotium.com/>)

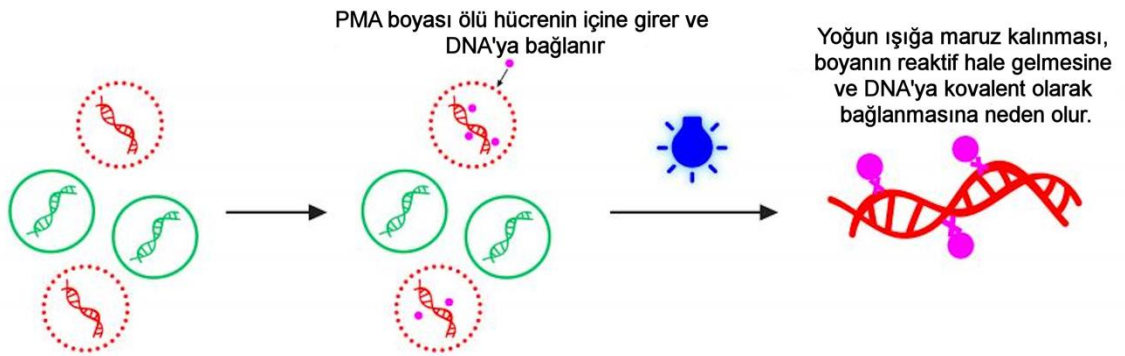
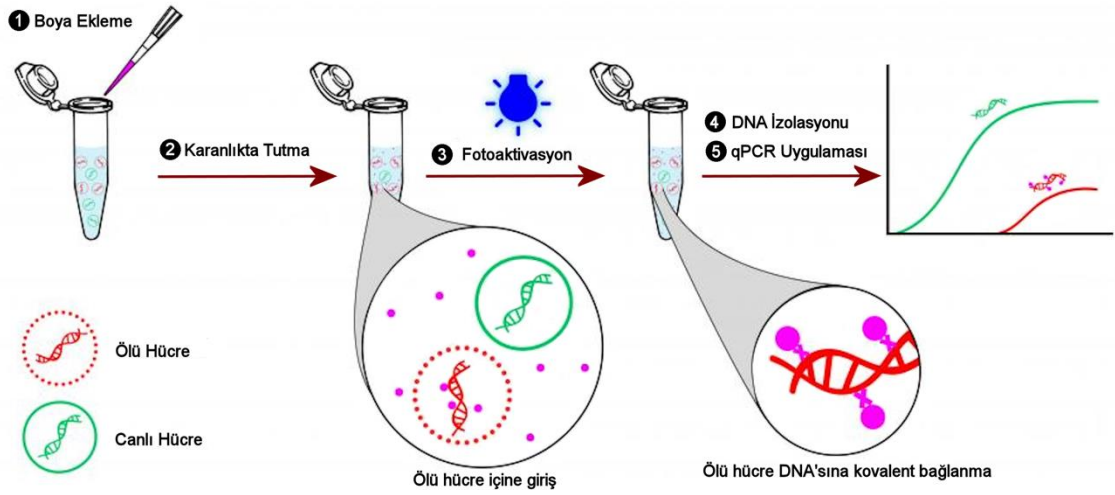
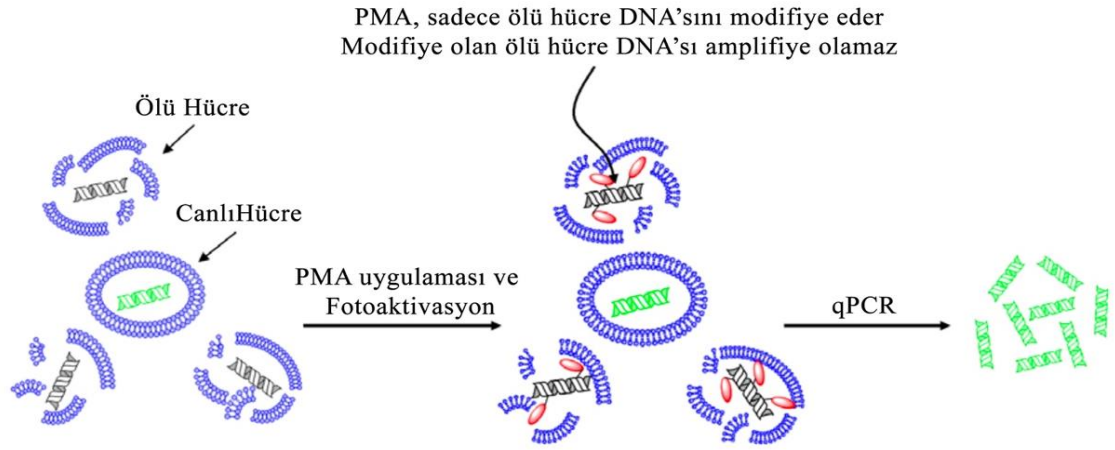
Propidium monoazid bazlı PCR

Propidium Monoazide (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5 [3-(diethylmethylammonio) propyl]-6phenyl dichloride - PMA), bakteri ve diğer organizmaların ölü / canlı ayrımının qPCR ile tespiti için geliştirilen yüksek afiniteli bir fotoreaktif DNA bağlayıcı boyadır. Boya, canlı hücrelerin duvarından geçememekte, yalnızca ölü hücrelerin hasar gören hücre duvarından geçerek hücre içine girmekte veya ortamdaki serbest halde bulunan DNA'lara tutunmaktadır. Boya kendi başına zayıf floresan özellikte olup nükleik asitlere bağlandıktan sonra kuvvetli floresan hale gelir. Özellikle çift iplikçikli DNA'ya yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Yüksek şiddetli ışık uygulaması (fotoaktivasyon) sonrası bu boya, DNA ile kovalent olarak reaksiyona girerek kalıcı DNA modifikasyonuna neden olur (Anonim 3). PMA'nın yapısında bulunan azide grubu yapı, fotoaktivasyon ile oldukça reaktif karaktere sahip olan nitren radikaline dönüştüğü ve bu radikal, DNA'nın yapısında bulunan C atomu ile birleşip karbon-azot yapısındaki kovalent bağı oluşturduğu için DNA'nın yapısını modifiye ettiği ve böylece PCR analizi esnasında DNA'nın amplifikasyonunu önleyebildiği ifade edilmiştir (Nocker ve ark., 2006; Nocker ve Camper, 2006, Cenciarini ve ark., 2009). Böylelikle PMA uygulaması sayesinde ölü ve canlı hücrelerin bir arada bulunduğu bir populasyonda qPCR ile yüksek seçicilikte bir ayırım yapılabilir (Telli, 2016).



Şekil 8. PMA'nın kimyasal yapısı (Biotium product information <http://www.biotium.com/>)

EMA ve PMA, yalnızca zarar görmüş hücre duvarlarına sahip ölü hücrelere nüfuz edebilen ancak hücre duvarları sağlam olan canlı hücrelere nüfuz etmeyen boyalar olarak bilinmektedir. Yüksek şiddetli ışıkla fotoaktivasyonu takiben, EMA veya PMA, DNA ile kovalent bir bağ oluşturan bir nitren üretebilir. Bu kovalent bağ, sarmal DNA'yı çözünmez hale getirmekte ve ardından PCR sırasında DNA'nın ölü hücrelerden amplifikasyonunu inhibe etmektedir. Aynı zamanda, bağlanmamış fazla EMA veya PMA molekülleri su ile reaksiyona girerek yapısı değiştiğinden bozulmamış hücrelerden ekstrakte edilen DNA ile bağlanamamaktadır. EMA-PCR ve PMA-PCR, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* ve *Cronobacter sakazakii* gibi canlı gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerin tespiti için kullanılmıştır (Pan ve Breidt, 2007, Wang ve ark., 2009, Liang ve ark., 2011, Banihashemi ve ark., 2012, Minami ve ark., 2012).



Şekil 9. qPCR ile canlı ve ölü bakteri ayırımında canlı bakteri miktarının belirlenmesi için PMA'nın modifiye edici etkisi (Biotium product information <http://www.biotium.com/>)

Öte yandan hem EMA hem de PMA'nın bazı avantaj ve dezavantajları vardır. EMA ile ilgili en büyük endişe, canlı hücreler üzerindeki toksisitesi olmuştur. EMA'nın ayrıca bazı bakteri türlerinin canlı hücrelerine nüfuz edebileceği ve sonraki PCR için kısmi DNA kaybına neden olabileceği bildirilmiştir (Nocker ve ark., 2006). Ayrıca, bazı çalışmalar EMA + qPCR kullanılarak ölü hücre sinyalinin eksik baskılandığını göstermiştir (Flekna ve ark., 2007; Wagner ve ark., 2008; Kobayashi ve ark., 2009). EMA ile karşılaştırıldığında, PMA'nın canlı hücreler için daha az toksik olduğu gösterilmiş ve bunun esas olarak PMA'nın EMA'dan daha yüksek pozitif yükünden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Nocker ve ark., 2006). Bununla birlikte, PMA ile ilgili en büyük endişe, PMA'nın ölü hücrelerden tüm sinyalleri ortadan kaldırmak için yeterince etkili olmamasından dolayı yanlış pozitif sonuçlar vermesi olmuştur (Pan ve Breidt, 2007; Kralik ve ark., 2010; Løvdaal ve ark., 2011).

EMA ve PMA, uzun yıllar boyunca canlı ve ölü hücreleri mikroskopik olarak ayırt etmek amacıyla boya olarak kullanılmıştır. Real Time PCR ile birleştirilmiş EMA veya PMA'nın, canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için bir tanı yöntemi olarak kullanımı ile ilgili araştırmaların sayısı gittikçe artmaktadır (Nogva ve ark., 2003; Nocker ve ark., 2006; Nocker ve Camper, 2006).

Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, bir DNA interkalasyon reaktifi (PMA) ile ön işlem sonrası DNA izolasyonunun ardından ölü ve canlı hücrelerin qPCR ile ayırt edilebildiği ortaya konulmuştur. Bu yöntemin, tamamen bakteri hücrelerinin bütünlüğüne dayandığı vurgulanmıştır (Nocker ve Camper, 2006, Nocker ve ark., 2006, Nocker ve ark., 2009).

Diğer bazı çalışmalarda da qPCR analizinde hücre süspansiyonları ve sebzelerde canlı *E. coli* O157:H7'nin varlığı ve sayısını belirlemede PMA ile numune ön işleminin başarıyla kullanıldığı ifade edilmiştir (Elizaquivel ve ark., 2012a, 2012b, 2012c; Nocker ve ark., 2009).

2.2. *Escherichia coli* O157:H7

E. coli, *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesi olup Gram negatif, fakültatif anaerobik, çomak şeklinde ve spor oluşturmeyen bir bakteridir. *E. coli*'nin somatik (O), kapsüler (K) ve flagellar (H) antijenlerine göre çok sayıda serotipi bulunmaktadır (Feng, 2001). Çoğu *E. coli* suşu insan ve hayvanların normal bağırsak mikrobiyotasında bulunup zararsız olsa da bu bakterinin virulensi farklı olan beş grubu tanımlanmıştır. Bunlar; Enterohemorajik, Enteroinvaziv, Enteropatojenik, Enterotoksijenik ve Enteroagregatif *E. coli* suşlarıdır (Levine, 1987). Enterohemorajik *E. coli* suşları, kanlı ishal ve hemolitik üremik sendrom (HUS) dahil olmak üzere insanlarda ciddi hastalıklara neden olan bir gruptur. Enterohemorajik *E. coli* grubunda çok sayıda alt serotip bulunmaktadır. Bunlardan *E. coli* O157:H7 serotipi, tüm Enterohemorajik *E. coli* serotipleri arasında, ABD'de Enterohemorajik *E. coli* enfeksiyonlarında en sık rastlanan serotiptir (Rasmussen ve Casey, 2001).

E. coli O157:H7 ilk olarak 1982'de Michigan ve Oregon'da 47 kişinin kontamine hamburgerleri tükettikten sonra kanlı ishale neden olduğu zaman insanlar için patojen bir serotip olarak kabul edilmiştir (Riley ve ark., 1983).

2.3.1. *Escherichia coli* O157:H7'nin karakteristik özellikleri

E. coli O157:H7 sorbitol negatif olup onu diğer *E. coli* suşlarından ayıran en önemli özelliği glukuronidaz negatif oluşudur. Çoğu *E. coli* suşundan farklı olarak, O157:H7 serotipi 44.5°C'de üreyemez, 5°C'de 35 gün canlı kalabilir (Weagant ve ark., 1994). *E. coli* O157:H7'nin D-değerleri hindi etinde 55°C'de 19.05, 70°C'de 0.038 dk., sığır etinde ise 55°C'de 21.56, 70°C'de 0.055 dk. olarak belirlenmiş olup organizmanın ısıya pek dayanıklı olmadığı ifade edilmiştir (Murphy ve ark., 2004). *E. coli* O157:H7 suşları, pH 3.6 ila 4.0 arasında üreyebilen asitliğe dirençli suşlardır. Öte yandan yüksek tuz konsantrasyonları ($\geq 8.5\%$), *E. coli* O157:H7'nin üremesi üzerinde engelleyici bir etki gösterir (Jay, 2000).

2.3.2. *Escherichia coli* O157:H7'nin virulens ve patojenite özellikleri

E. coli O157:H7'nin infeksiyon mekanizmasında çeşitli virulens ve patojente faktörleri yer almaktadır. Minimal İnfektif Dozu çok düşük olup 100 hücreden azdır (Karmali, 2004).

E. coli O157:H7'nin virülens genleri arasında, Shiga toksin genleri (stx1, stx2), intimin (eae), transloke intimin reseptörü (tir), enterohemolizin (ehly) ve uzun polar fimbria (lpf) yer alırken hastalık oluşturma mekanizmalarında diğer patojenik genler de rol oynamaktadır. Virülens faktörleri arasında Shiga toksinlerinin (stx1, stx2) ciddi klinik semptomların gelişmesinde kritik bir rol oynadığına inanılmaktadır. HUS'lu hastalardan izole edilen *E. coli* O157:H7 suşları genellikle hem stx1 hem de stx2 veya sadece stx2 genlerini taşımaktadır (Rasmussen ve Casey, 2001).

Enterohemorajik *E. coli* ve özellikle O157:H7 serotipi, ishale neden olan en iyi belgelenmiş ve iyi bilinen *E. coli* serotipidir. Enterohemorajik *E. coli*'nin önemi, hastalığın şiddetinde yatmaktadır. Binlerce insanın enfekte olduğu salgınlar, kanlı ishal ve HUS şeklinde ciddi hastalık tablosuna neden olmakta ve hatta ölümle sonuçlanabilmektedir (Chattaway ve ark., 2011).

E. coli O157:H7 infeksiyonlarında diyare, hemorajik kolit, HUS ve önemli morbidite ve mortaliteye yol açan trombotik trombositopenik purpura gibi klinik belirtiler gözlenebilmekle birlikte asemptomatik taşıyıcılık da görülebilmektedir (Su ve Brandt 1995). *E. coli* O157:H7 özellikle küçük çocukları, yaşlıları ve bağışıklığı baskılanmış bireyleri etkiler. *E. coli* O157:H7 ile enfekte olan hastaların yaklaşık %10 ila 15'inde HUS gelişirken (Tarr ve ark., 2005; Scheiring ve ark., 2008), HUS'lu hastaların yaklaşık %40'ında uzun süreli böbrek fonksiyon bozukluğu gelişmekte ve hastaların yaklaşık %3 ila 5'i akut fazda hayatını kaybetmektedir (Fitzpatrick ve ark., 1991; Siegler ve ark., 1991).

2.3.3. *Escherichia coli* O157:H7'nin gıdalarda bulunuşu

Doğadaki kaynakları hakkında çeşitli görüşler ileri sürülse de *E. coli* O157:H7 serotipinin bulaşması ve yayılmasında başta süt inekleri olmak üzere, sığırların önemli rol oynadığı bilinmektedir (Turgut, 2021). Tüketime sunulan sığır etlerinde normalde bu

E. coli O157:H7'ye rastlanmazken, etkenin bulunduğu bağırsak içeriği ile kontamine ette etkenin çoğalması ve halk sağlığını tehdit edebilecek düzeye ulaşması, önemli bir risk oluşmaktadır. *E. coli* O157:H7 kaynaklı infeksiyonlarla ilgili olarak öncelikli risk grubunda sığırlar gösterilmektedir (Anonim 4; Chapman ve ark., 1993). İnsanlarda tespit edilen infeksiyonların çoğunun nedeninin iyi pişirilmeyen et ve et ürünleri yanında pastörize edilmeyen süttten kaynaklanabildiği bildirilmektedir (Campbell ve Mutharasan, 2004, Abdul-Raouf ve ark., 1996, Conedera ve ark., 2004). *E. coli* O157:H7 kaynaklı infeksiyonların prevalansı değerlendirildiğinde coğrafi konum, hayvanın türü, cinsi ve yaşı ile mevsimlerin etkili olabildiği bildirilmiş, ayrıca yaz aylarında infeksiyon prevalansının daha yüksek olduğuna dikkat çekilmiştir (Chapman ve ark., 2001).

Bitkisel gıda kaynaklı infeksiyonların kaynağı araştırıldığında özellikle üretimin yapıldığı tarlaların civarında bulunan sığır çiftliklerinin olduğu dikkati çekmiştir (Hilborn ve ark., 1999). Öte yandan tüketilecek sebzelerin kesilmesi veya doğranması sürecinde özellikle ev ortamlarında kullanılan ekipmanların çapraz kontaminasyon riskini artırdığı ifade edilmiştir (Zilelidou ve ark., 2015).

2.3.4. *Escherichia coli* O157:H7'nin bulaşma ve yayılması

E. coli O157:H7'nin doğal rezervuarları hayvanlar olup, özellikle sığır başta olmak üzere diğer ruminantların bağırsaklarında bulunmaktadır. *E. coli* O157:H7 için en yaygın bulaşma yolu başta et ürünleri olmak üzere gıdalardır (Rangel ve ark., 2005). Diğer bulaşma yolları ise su, kişiden kişiye temas ve hayvanlarla doğrudan temastır (Aruscavage ve ark., 2006). Gıda kaynaklı *E. coli* O157:H7 infeksiyonlarında başlıca ürün, ruminant dışkısıyla kontamine olmuş kıyma olup ayrıca çiğ süt ve çiğ süttten yapılan ürünler (peynir, tereyağı vb.), yoğurt, elma şarabı ve sebzeler de diğer önemli kaynaklardır (Beuchat, 2002; Rangel ve ark., 2005).

E. coli O157:H7 infeksiyonları tipik olarak yumurta, et ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalar ile ilişkilendirilmesine rağmen, pişirilmemiş taze sebze, meyve, salata ve meyve sularının da bu patojen için önemli bir araç olarak kabul edildiği bildirilmiştir. ABD'de gıda kaynaklı salgınlardaki artışın taze meyve ve sebze tüketiminin artmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (Centers for Disease Control, Prevention, 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Referans kültür

Araştırmada, deneysel olarak *Escherichia coli* O157:H7'nin canlı/ölü hücrelerinin konvansiyonel kültür ve kantitatif Real-Time PCR (qPCR) tekniği ile karşılaştırmalı ayrımını yapmak amacıyla referans suş olarak Microbiologics firmasından olarak temin edilen *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) referans suşu kullanıldı.

3.1.2. Deneysel uygulama ortamları

Araştırmanın deneysel uygulama ortamlarının hazırlanması amacıyla Oxoid™ Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablet (BR0014 - 0.01 M pH 7.2) ve yağsız (%0.1 yağlı) UHT süt kullanıldı. PBS, üretici firmanın önerdiği şekilde mavi kapaklı şişelerde hazırlandı ve otoklavda sterilize edildi. Çalışmada kullanılacak UHT sütte antibiyotik kalıntı (betalaktam ve tetrasiklin grubu) varlığının analizi amacıyla TwinSensor^{BT} (Kit085-DA-001, Belçika) ticari antibiyotik test stripleri kullanıldı. Analizler, kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kalıntı analizinde UHT sütün negatif sonuç verdiği tespit edildikten sonra çalışmada kullanıldı.

3.1.3. Primer dizaynı

Araştırmanın moleküler analizlerinde kullanılacak oligolar, 16S ve/veya 23S rRNA genlerini kodlayan DNA'nın spesifik bölgeleri baz alınarak GenBank veritabanı ile doğrulanıp dizayn edildi. Oligo dizisi, *Escherichia coli* O157:H7'nin moleküler teşhisi için spesifik bir genetik işaretleyici olarak tanımlanan Z3276-ORF *Escherichia coli* O157:H7 primer kullanıldı ve Forward (F): 5'-GCACTAAAAGCTTGGAGCAGTTC-3'; Reverse (R): 5'-AACAATGGGTCAGCGGTAAGGCTA-3' formülasyonunda sentez ettirildi (Anonim 5).

3.1.4. Ethidium monoazide bromide çözeltisinin hazırlanması

Isıl işlem uygulaması sonrasında qPCR aşaması için DNA izolasyonu öncesi fotoafinite etiketine sahip bir nükleik asit boyası olarak kullanılacak EMA çözeltisinin kullanım solüsyonu, üretici firmanın (Biotium EMATM - 40015) önerdiği şekilde hazırlandı ve doğrudan kullanıldı. Bu amaçla uygulanacak tüpteki 500 µl'lik süspansiyonda final konsantrasyon 5 µg/ml (12 µM), 6 µg/ml (14 µM) ve 7 µg/ml (16 µM) olacak şekilde uygulanmak üzere %20 dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, Almanya) ile 3 farklı konsantrasyon hazırlandı (Anonim 2, Anonim 6).

3.1.5. Propidium monoazide çözeltisinin hazırlanması

Isıl işlem uygulaması sonrasında qPCR aşaması için DNA izolasyonu öncesi fotoafinite etiketine sahip bir nükleik asit boyası olarak kullanılacak PMA çözeltisinin çalışma solüsyonu, üretici firmanın (Biotium PMAxxTM - 40069) önerdiği üzere 20 mM konsantrasyonda olan ana PMA solüsyonundan, %20 dimetilsülfoksit ile 2.5 mM çalışma solüsyonu hazırlandı. Ardından 500 µl'lik 3 seri bakteri süspansiyonunda, final konsantrasyon 20 µM, 25 µM ve 30 µM olacak şekilde çalışma solüsyonundan ilave edildi (Anonim 3).

3.1.6. Besiyerleri

Çalışmada bakterilerin üretilmesi ve canlı bakteri sayımı amacıyla Brain Heart Infusion Broth (Merck-110493), Tryptic Soy Agar (Merck-105458), Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid CM0813) kullanıldı (TSE, 2003; TSE, 2017; USDA/FSIS, 2012).

3.2. Yöntem

3.2.1. Standart hazırlanması

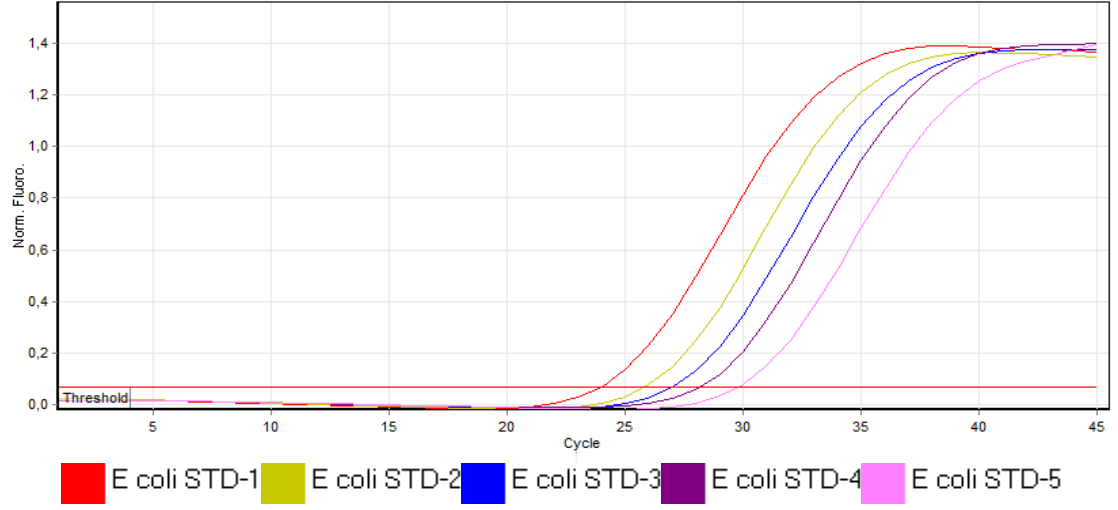
Çalışmada referans *E. coli* O157:H7 kültürü, 100 ml'lik Brain Heart Infusion (BHI) Broth içerisinde 37°C'de sık sık çalkalamak suretiyle, 18-24 saat inkübe edildikten sonra kültür 50 ml'lik steril falkon tüplerine aktararak 7000 x g'de 5 dk. santrifüje edildi.

Ardından süpernatant atılıp bakteri peleti steril PBS ile yıkandıktan sonra bakteri kültürü aynı PBS ile yeniden süspanse edildi ve steril tüp içerisinde McFarland dansitometresi (Den-1B) ile steril PBS kullanılarak McFarland - 2 (6×10^8 kob/ml) yoğunluğuna ayarlandı. Süspansiyonun hazırlanan desimal dilüsyonlarından Sorbitol MacConkey Agara yayma yöntemi ile ekimler yapılarak mevcut canlı bakteri sayısı (kob/ml) tespit edildi (UMS, 2015).

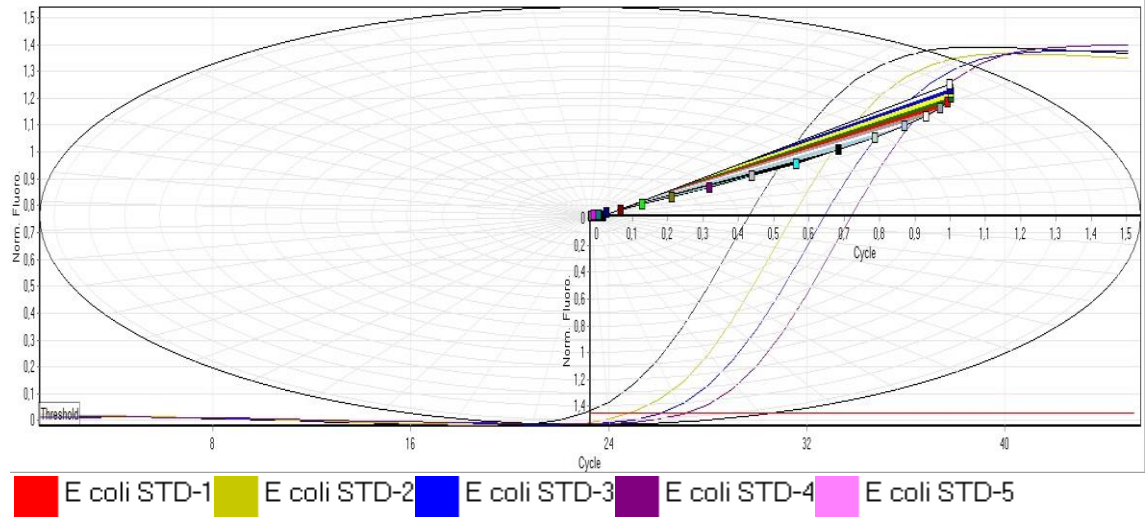
Süspansiyondan 1 ml alınarak ticari DNA izolasyon kiti (Thermo GeneJET Genomic DNA Purification Kit – K0722) ile ekstraksiyon yapıldı ve elde edilen saf DNA'nın elution buffer ile 2 katlı dilüsyonlarından 5 adet hazırlandı. Dilüsyonlar, 3.1.3.'te belirtildiği şekilde sentezlenen spesifik primerler kullanılarak Real Time PCR (Corbett Research QIAGEN Rotor-gene Real-time PCR Cyclers Rg-6000) cihazı ile kantitatif analize tabi tutuldu. Elde edilen flüoresan ışımaya değerleri kullanılarak Real-Time PCR standart grafiği elde edildi. Grafikte otomatik Ct eşik değeri Rotor Gene Q yazılımı ile oluşturuldu (Şekil 10).

Real-Time PCR standart grafik sonuçlarının (Şekil 10) doğrulanması amacıyla flüoresan ışımaya testi gerçekleştirildi. Bu sonuçlar doğrultusunda %99 oranında güvenilir sonuç alındığı görüldü. Grafiğin otomatik eşik değeri Rotor Gene Q yazılımı ile oluşturuldu (Şekil 11).

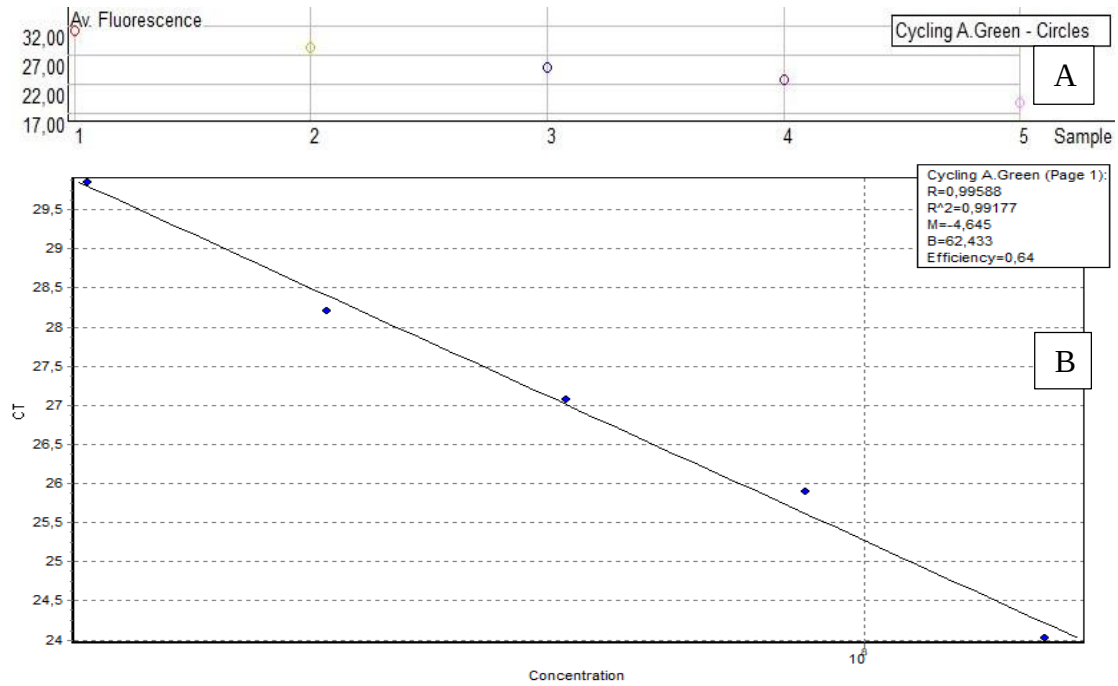
Real-Time PCR standartlarının oluşturduğu eğim açıları ile bunların konsantrasyon değerlerinden elde edilen standart curvenin analizi neticesinde R^2 değerinin 0.99177 olarak belirlendiği ve bu değer güvenilir sonuç aralığında olduğu görüldü. Bu eğri araştırmanın kantitatif analizlerinde standart olarak kullanıldı. Real-Time PCR standartlarının konsantrasyon (A) ve standart curve analiz sonuçları (B) Şekil 12'de sunuldu.



Şekil 10. *E. coli* O157:H7 kültür dilüsyonlarından hazırlanan Real-Time PCR standart grafiği



Şekil 11. *E. coli* O157:H7 kültür dilüsyonlarından hazırlanan Real-Time PCR standart konsantrasyon grafiği



Şekil 12. *E. coli* O157:H7 kültür dilüsyonlarından hazırlanan Real-Time Standart Curve eğrisi

3.2.2. Çalışma kültürünün hazırlanması

Çalışmada referans *E. coli* O157:H7 kültürü, 300 ml'lik BHI Broth içerisinde 37°C 'de sık sık çalkalamak suretiyle, 18-24 saat inkübe edildikten sonra kültür, 50 ml'lik steril falkon tüplerine aktararak $7000 \times g$ 'de 5 dk. santrifüje edildi. Ardından süpernatant atılıp bakteri peleti steril PBS ile yıkandıktan sonra bakteri kültürü mavi kapaklı steril cam şişe içerisinde McFarland dansitometresi ile steril PBS kullanılarak McFarland-2 (6×10^8) yoğunluğuna ayarlandı ve yaklaşık 100 ml hacimde hazırlanan bu kültür, çalışmanın PBS ortamında çalışılacak ana kültürü olarak kullanıldı (UMS, 2015). Ayrıca bu kültürden hazırlanan desimal dilüsyonlardan Sorbitol MacConkey Agara ekim yapılarak mevcut canlı bakteri sayısı (kob/ml) tespit edildi.

Süspansiyondan 1 ml alınarak ticari DNA izolasyon kiti ile ekstraksiyon yapıldı ve elde edilen saf DNA ile spesifik primerler kullanılarak qPCR analizi yapıldı.

3.2.3. Isıl işlem uygulaması

PBS ortamında ısıt işlem uygulaması

E. coli O157:H7 kültürünün 3.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan PBS ortamındaki ve manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılmakta olan ana süspansiyonundan (ana kültür) 2 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml olacak şekilde 50 adet porsiyonlandı. Bunların 4 tanesi başlangıç kültür sayımı ve 2 tanesi de başlangıç qPCR analizi için ayrıldı. Süspansiyondan hazırlanan desimal dilüsyonlardan Sorbitol MacConkey Agara ikili paralel ekim yapılarak mevcut canlı bakteri sayısı (kob/ml) tespit edildi. Ayrıca süspansiyondan 2 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml olacak şekilde 2 tüp ayrıldı ve ticari kit ile DNA izolasyonları yapıldıktan sonra daha önce 3.2.1'de belirtilen Standart Eğri kullanılarak qPCR analizi yapıldı.

Tüplerin 6 tanesi, negatif kontrol amacıyla 95 °C'de 5 dk. tutuldu ve ısıt işlem bittikten sonra tüpler +4 °C'de bekletildi.

Çalışmanın deneysel aşamasında ayrı tüplerde PBS ortamındaki bakteri süspansiyonlarına 10 dk., 20 dk. ve 30 dk. olmak üzere 3 farklı sürede 55 °C'lik ısıt işlem uygulandı. Her bir süre uygulaması için iki tekerrür ve iki paralel olacak şekilde PBS ortamındaki ana süspansiyonu içeren 4'er adet eppendorf tüpü kullanıldı. Bunların 2'si kültürel analiz, diğer ikisi de qPCR analizi için kullanıldı. Her bir ısıt işlem bitiminde eppendorf tüp, kuru banyodan çıkarılıp hızlı bir şekilde soğuması için soğutma bloklarına konuldu. Ardından kültürel analiz, EMA ve PMA uygulamaları ve DNA izolasyonu protokolleri uygulanıncaya kadar kısa süre +4 °C'de bekletildi.

Süt ortamında ısıt işlem uygulaması

Araştırmada süt ortamında ısıt işlem uygulaması için 3.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan 100 ml'lik *E. coli* O157:H7 kültürü, 7000 x g'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve yeniden aynı miktarda yağsız (%0.1 yağlı) UHT süt ilave edildi. Süspansiyondan hazırlanan desimal dilüsyonlardan Sorbitol MacConkey Agara ikili paralel ekim yapılarak mevcut canlı bakteri sayısı (kob/ml) tespit edildi. Ayrıca süspansiyondan 2 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml olacak şekilde 2 tüp ayrıldı ve

ticari kit ile DNA izolasyonları yapıldıktan sonra daha önce 3.2.1’de belirtilen Standart Eğri kullanılarak qPCR analizi yapıldı.

E. coli O157:H7 kültürünün manyetik balık ile sürekli karışır durumda olan süt içerisindeki ana süspansiyonu, 2 ml’lik steril eppendorf tüplere 1’er ml olacak şekilde 50 adet porsiyonlandı.

Tüplerin 6 tanesi, negatif kontrol amacıyla 95 °C’de 5 dk. tutuldu ve ısıtma işlemi bittikten sonra tüpler +4°C’de bekletildi.

Çalışmanın deneysel aşamasında ayrı tüplerde süt ortamındaki bakteri süspansiyonlarına 10 dk., 20 dk. ve 30 dk. olmak üzere 3 farklı sürede 55 °C’lik ısıtma işlemi uygulandı. Her bir süre uygulaması için iki tekerrür ve iki paralel olacak şekilde süt ortamındaki ana süspansiyonu içeren 4’er adet eppendorf tüpü kullanıldı. Bunların 2’si kültürel analiz, diğer ikisi de qPCR analizi için kullanıldı. Her bir ısıtma işlemi bitiminde eppendorf tüp, kuru banyodan çıkarılıp hızlı bir şekilde soğuması için soğutma bloklarına konuldu. Ardından kültürel analiz, EMA ve PMA uygulamaları ve DNA izolasyonu protokolleri uygulanıncaya kadar kısa süre +4 °C’de bekletildi.

Kültürel analizler

PBS ve süt ortamında ayrı ayrı uygulanan ısıtma işlemleri sonrası, örneklerdeki canlı mikroorganizma sayısını belirlemek amacıyla her bir örneğin cam tüplerde steril FTS ile 6-9 seri dilüsyonları yapıldı ve her bir dilüsyondan iki paralel olarak Sorbitol MacConkey Agara yayma yöntemiyle ekim yapıldı. 37°C’de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası sorbitol negatif kolonilerin sayımları yapıldı ve her bir uygulamadaki canlı bakteri sayısı (kob/ml) tespit edildi (TSE, 2003; TSE, 2017).

Ethidium monoazide uygulaması

Eppendorf tüplerinde ısıtma işlemi uygulanan bakteri süspansiyonlarının her birinin üzerine final konsantrasyonu 5 µg/ml (12 µM), 6 µg/ml (14 µM) ve 7 µg/ml (16 µM) olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda ayrı ayrı 3.1.4’te belirtildiği şekilde hazırlanan EMA kullanım solüsyonundan ilave edildi. Arada bir karıştırmak suretiyle karanlık ortamda 10 dk.’lık inkübasyonun ardından eppendorf tüpleri termal olarak stabil ve sabit bir ışık şiddeti sağlayan fotoaktivasyon cihazına (Led-Active-Blue, Applied Science,

İspanya) yerleştirildi ve 15 dk. süreyle fotoaktivasyon uygulanarak kovalent bağlanma gerçekleştirildi. Fotoaktivasyonu takiben DNA izolasyonu için tüpler 10.000 x g'de 10 dk. santrifüj edildi ve daha sonra süpernatant atılarak ticari DNA izolasyon kit protokolü uygulandı (Nogva ve ark., 2003).

Propidium monoazide uygulaması

Isıl işlem uygulanan test ortamlarının her birine ayrı ayrı final konsantrasyonu 20 µM, 25 µM ve 30 µM olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda 3.1.5'te belirtildiği şekilde hazırlanan PMA solüsyonundan ilave edildi. Arada bir karıştırmak suretiyle karanlık ortamda 10 dk.'lık bir inkübasyonun ardından eppendorf tüpleri fotoaktivasyon cihazına yerleştirildi ve 15 dk. süreyle fotoaktivasyon uygulanarak kovalent bağlanma gerçekleştirildi. Fotoaktivasyonu takiben DNA izolasyonu için tüpler 10.000 x g'de 10 dk. santrifüj edildi ve daha sonra süpernatant atılarak ticari DNA izolasyon kit protokolü uygulandı (Liu ve Mustapha, 2014).

DNA izolasyonu

EMA ve PMA uygulaması sonrasında kültür süspansiyonlarının DNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla ticari DNA izolasyon kitlerinden (Thermo GeneJET Genomic DNA Purification Kit – K0722) yararlanıldı ve protokol, firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi (Anonim, 7).

Pelet üzerine kitte bulunan lysis solüsyondan 200 µl ve proteinase K solüsyonundan da 20 µl eklendi ve karıştırılarak homojenize edildi. Çözelti, çalkalamalı kuru banyoda 56 °C'de yaklaşık 30 dk. bekletilerek hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Çözelti üzerine kitte bulunan 400 µl %50'lik etanol eklenerek iyice homojenize olması sağlandı. Karışımın tamamı, koleksiyon tüpleri içinde bulunan ve numaralanan steril spin kolonlara aktarılıp 6000g'de 1 dk. santrifüj edildikten sonra spin kolonlar çıkarılarak yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Spin kolonlara kitte bulunan etanol ilave edilmiş Wash Buffer I' den 500 µl eklenerek 8000g'de 1 dk. santrifüj edildi ve spin kolonlar tekrar yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Benzer şekilde üzerine Wash Buffer II'den 500 µl eklenerek, 12000g'de 3 dk. santrifüj edildi ve spin kolonlar numaralandırılmış steril eppendorf tüplerine yerleştirildi. Son olarak spin kolonların

üzerine Elution Buffer'dan filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 200 µl eklenerek oda ısısında 2 dk. beklendi ve 8000g'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu şekilde izole edilen DNA eppendorf tüplerine aktarıldı ve spin kolonlar çıkarılıp atıldı (Anonim, 7).

Kantitatif real-time PCR (qPCR) analizi

qPCR analizi, *E. coli* O157:H7 için spesifik Z3276-ORF oligolar kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam 25 µl reaksiyon hacmi için, 12 µl ticari real-time PCR mastermiks, 5 µl DNA, 1'er µl Forward ve Reverse (0.2 µM) primerler ve 6 µl de PCR grade water kullanıldı. Termal cykler (Corbett research RG-6000, Austria)'da 95°C'de 10 dk. ilk denatürasyonun ardından, 95°C'de 45 sn denatürasyon, 52°C'de 45 sn bağlanma ve 72°C'de 45 sn de uzama olacak şekilde 40 sikluluk protokol uygulandı. Final uzama işlemi 95°C'de 10 dk. uygulandı. PCR işlemi sonrasında kantitatif analiz için 3.2.1.'de belirtildiği şekilde hazırlanan standart eğri kullanıldı. Her bir örneğin kantitatif analizinde Ct değeri baz alındı ve standart eğri (s) kullanılarak $E=10^{(-1/s)}-1$ eşitliği ile kantitatif analiz yapıldı (Wang ve ark., 2009; Kesmen ve Aslan, 2017).

3.2.4. İstatistiksel analizler

Araştırma kapsamında, ısıl işlem sonrası ortamda canlı kalan mikroorganizmaların tespitinde kullanılan konvansiyonel kültür yöntemi ile EMA + qPCR ve PMA + qPCR yöntemleri arasındaki farkı karşılaştırmak için, SAS (ver 9.4) istatistiksel analiz programı kullanıldı. Kültür ve qPCR arasındaki farkların analizi için Mann-Whitney U testi, kültür ve qPCR arasındaki farkın azalma oranı için de oran testi (2 sample proportion test) uygulandı (SAS, 2005).

4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan UHT sütte TwinSensor^{BT} (Kit085-DA-001, Belçika) antibiyotik test stripleri ile yapılan antibiyotik kalıntı analizi sonucunda UHT sütte antibiyotik kalıntısı bulunmadığı belirlendi.

4.1. Isıl İşlem Uygulamaları

Negatif kontrol amacıyla PBS ve süt ortamlarında 10^8 kob/ml *E. coli* O157:H7 canlı bakteri süspansiyonlarına 95°C’de 5 dk.’lık ısı uygulaması yapıldı. İşlem sonrasında *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı konsantrasyonlardaki EMA ve PMA uygulamaları sonrası qPCR ile kantitatif analizler yapıldı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında her iki analiz yönteminde canlı bakteri tespit edilemedi. Kültür yöntemi ile EMA+qPCR ve kültür yöntemi ile PMA+qPCR analiz sonuçlarının birbirleri ile uyumlu olduğu görüldü.

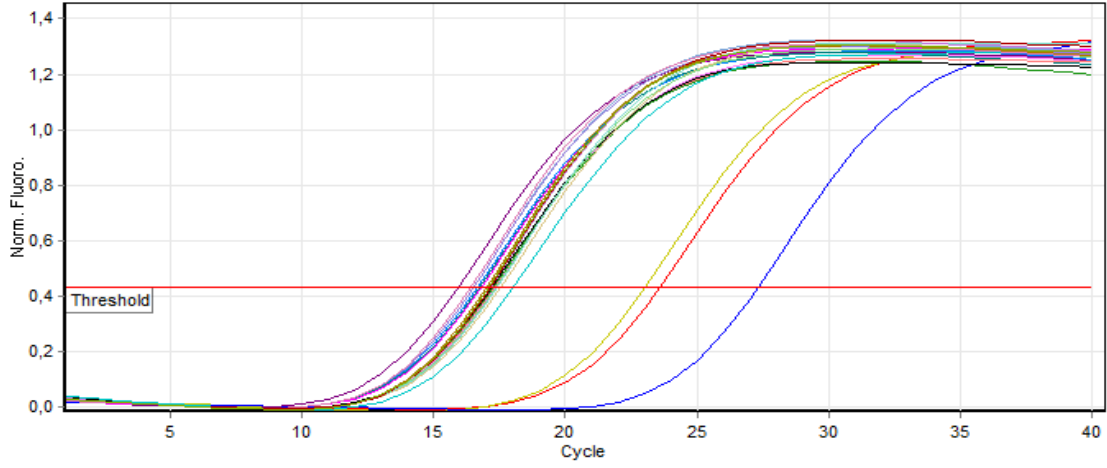
4.1.1. PBS ortamında ısı işlem uygulamasına ait bulgular

PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri süspansiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki EMA ile muamele sonrası yapılan qPCR analizinde flouresan ışımaya değerleri ile standart eğri kullanılarak örneklerin curve eğrisi grafiği oluşturuldu. Grafikte Ct eşik değeri otomatik olarak Rotor Gene Q yazılımı ile belirlendi (Şekil 13).

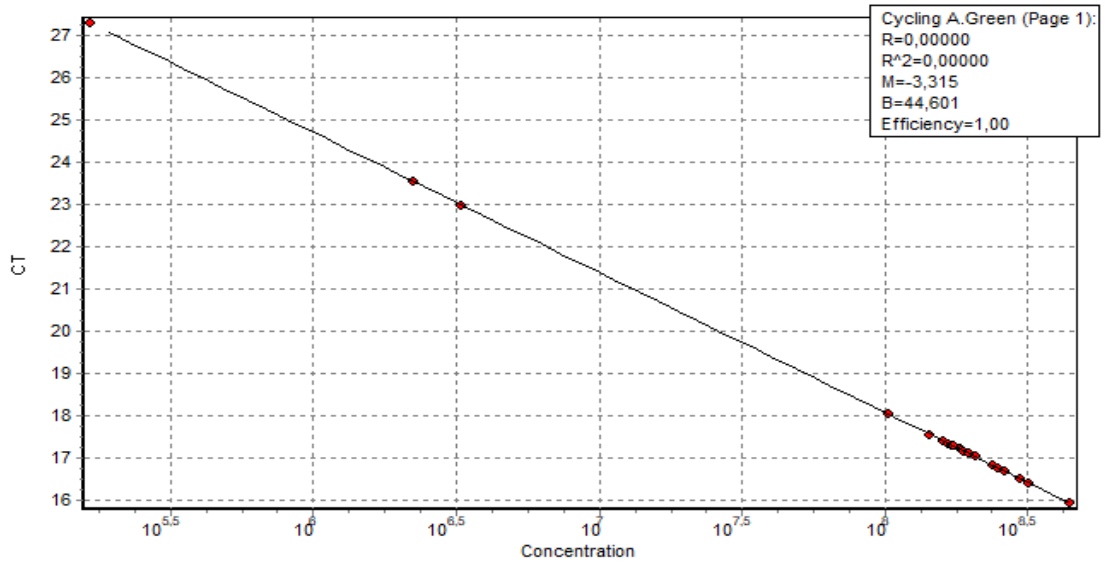
PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri süspansiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki PMA ile muamele sonrası yapılan qPCR analizinde flouresan ışımaya değerleri ile standart eğri kullanılarak örneklerin curve eğrisi grafiği oluşturuldu. Grafikte Ct eşik değeri otomatik olarak Rotor Gene Q yazılımı ile belirlendi (Şekil 15).

Çalışmanın PBS ortamında 55 °C’de farklı sürelerde ısı işleme maruz bırakılan ve farklı konsantrasyonlarda EMA ve PMA uygulanan *E. coli* O157:H7 kültürlerinin 3.2.1.’de belirtilen standart kullanılarak ayrı ayrı yapılan qPCR ile kantitatif analizlerinde standartların oluşturduğu eğim açısı ve konsantrasyon sonuçlarından elde edilen standart

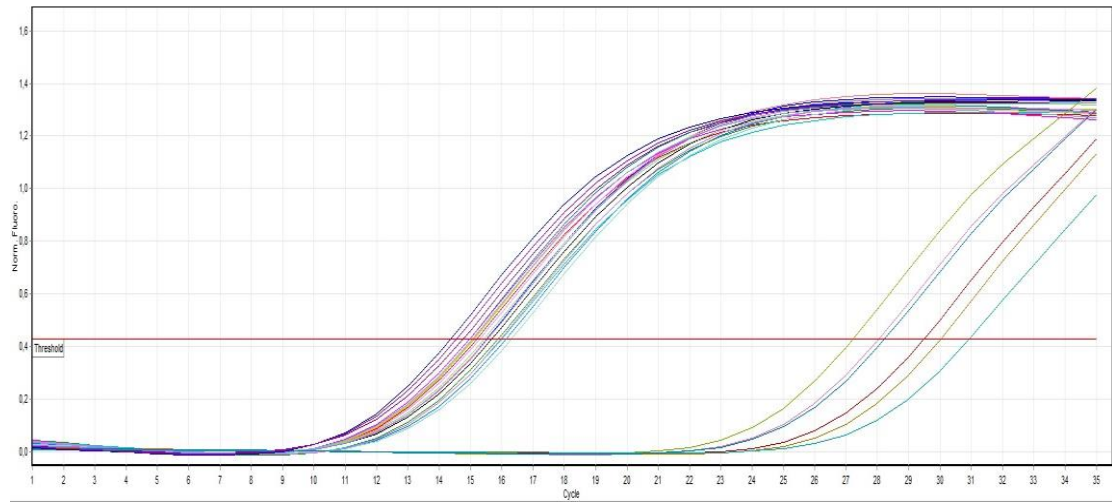
curve analizi neticesinde EMA örneklerinin R^2 değerinin 0.00000 (Şekil 14) ve PMA örneklerinin ise R^2 değerinin 0.99996 (Şekil 16) değerinde ve güvenilir sonuç aralığında olduğu görüldü.



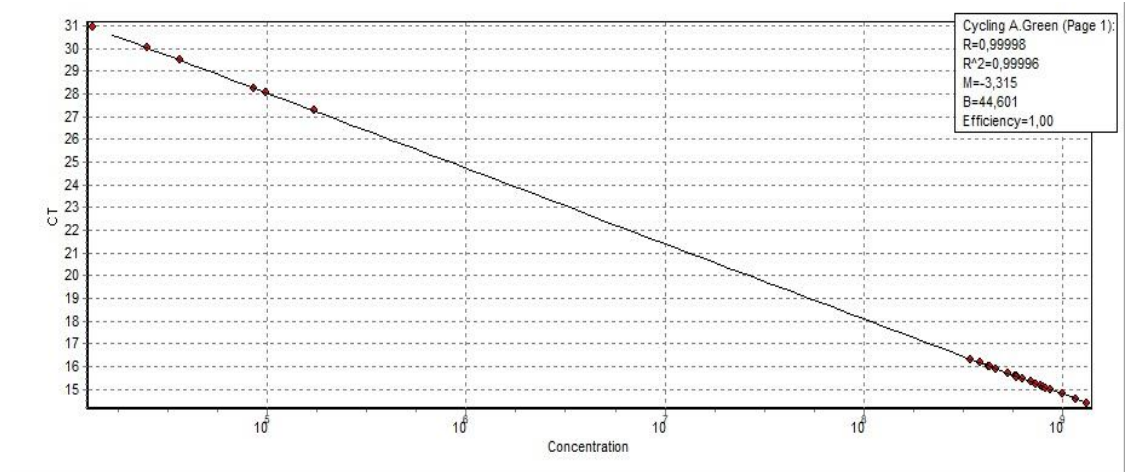
Şekil 13. 55 °C’de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında EMA örneklerinin qPCR kantitatif analiz grafiği



Şekil 14. 55 °C’de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında EMA örneklerinin Standart kullanılarak elde edilen Curve eğrisi



Şekil 15. 55 °C’de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında PMA örneklerinin qPCR analiz grafiği



Şekil 16. 55 °C’de farklı sürede ısı uygulaması sonrasında PMA örneklerinin Standart kullanılarak elde edilen Curve eğrisi

PBS ortamında hazırlanan test süspansiyonunun kültürel sayım sonucu $8.51 \pm 0.120 \log_{10}$ kob/ml ve qPCR sayım sonucu ise $8.90 \pm 0.021 \log_{10}$ kopya/ml olarak belirlendi. İki değer arasındaki fark $0.39 \log_{10}$ olup, bu fark istatistiksel olarak önemsiz ($p < 0.05$) bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri

Kodu	Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı (log ₁₀ kob/ml)	EMA Dozu (µg/ml)	qPCR Sayımı (log ₁₀ kopya/ml)	Kültür - qPCR Sayımı Arasındaki Fark log ₁₀	P*
PPK	0	8.51±0.120	0	8.90±0.021	0.39	0.093
PX	10	7.50±0.028	0	8.89±0.021	1.39	0.000
PA	10	7.48±0.212	5	7.85±0.007	0.37	0.022
PB	10	7.52±0.021	6	7.83±0.014	0.31	0.034
PC	10	7.50±0.035	7	7.81±0.042	0.31	0.083
PY	20	6.47±0.035	0	8.88±0.021	2.41	0.000
PD	20	6.40±0.099	5	6.93±0.021	0.53	0.051
PE	20	6.51±0.113	6	6.89±0.028	0.38	0.098
PF	20	6.49±0.056	7	6.80±0.056	0.31	0.116
PZ	30	6.17±0.056	0	8.87±0.007	2.70	0.000
PG	30	6.25±0.191	5	6.75±0.014	0.50	0.090
PH	30	6.09±0.056	6	6.57±0.077	0.48	0.125
PI	30	6.16±0.707	7	6.47±0.106	0.31	0.219

*: Değerler arasındaki fark, istatistiksel açıdan p<0.05 düzeyinde değerlendirilmiştir.

PPK: PBS Pozitif Kontrol, PX: 10 dk. ısı + 0µg/ml EMA, PA: 10 dk. ısı + 5µg/ml EMA, PB: 10 dk. ısı + 6µg/ml EMA, PC: 10 dk. ısı + 7µg/ml EMA, PD: 20 dk. ısı + 5µg/ml EMA, PE: 20 dk. ısı + 6µg/ml EMA, PF: 20 dk. ısı + 7µg/ml EMA, PG: 30 dk. ısı + 5µg/ml EMA, PH: 30 dk. ısı + 6µg/ml EMA, PI: 30 dk. ısı + 7µg/ml EMA

PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri Tablo 1’de sunuldu. 10 dk.’lık ısı uygulaması sonrasında EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ile 5 ve 6 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark p<0.005 düzeyinde önemli bulunurken 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde ise kültür ve qPCR sayımları

arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemsiz bulundu. 20 ve 30 dk.'lık ısı uygulaması sonrasında ise EMA uygulanmayan direkt qPCR grubunun kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemli bulunurken 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemsiz bulundu (Tablo 1).

PBS ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi Tablo 2, Şekil 17 ve 18'de sunuldu.

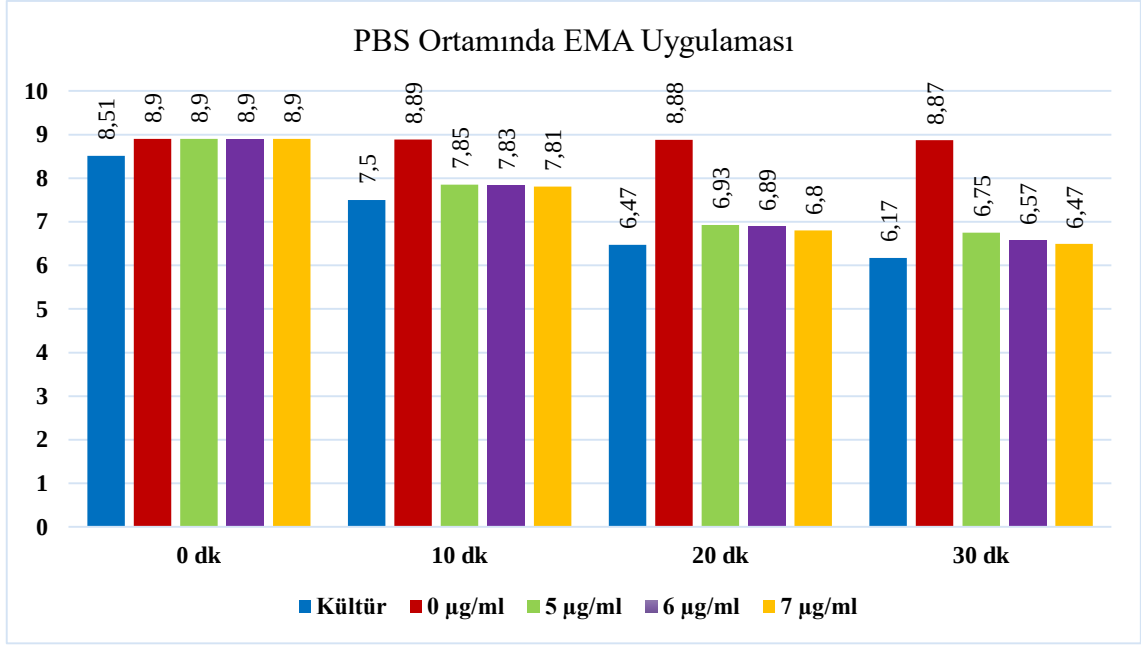
Tablo 2. PBS ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı (log ₁₀ kob/ml)	EMA Final Konsantrasyonuna göre qPCR Kopya Sayısı			
		0 µg/ml*	5 µg/ml	6 µg/ml	7 µg/ml
0	8.51±0.120 ^{Aa}	8.90±0.021 ^{Aa}	8.90±0.021 ^{Aa}	8.90±0.021 ^{Aa}	8.90±0.021 ^{Aa}
10	7.50±0.024 ^{Ba}	8.89±0.021 ^{Ab}	7.85±0.007 ^{Bce}	7.83±0.014 ^{Bd}	7.81±0.042 ^{Bde}
20	6.47±0.087 ^{Ca}	8.88±0.021 ^{Ab}	6.93±0.021 ^{Ccd}	6.89±0.028 ^{Cde}	6.80±0.056 ^{Ce}
30	6.17±0.112 ^{Da}	8.87±0.007 ^{Ab}	6.75±0.014 ^{Dc}	6.57±0.077 ^{Dde}	6.47±0.106 ^{De}
Ortalama	6.71 ^a	8.88 ^b	7.18 ^a	7.10 ^a	7.03 ^a

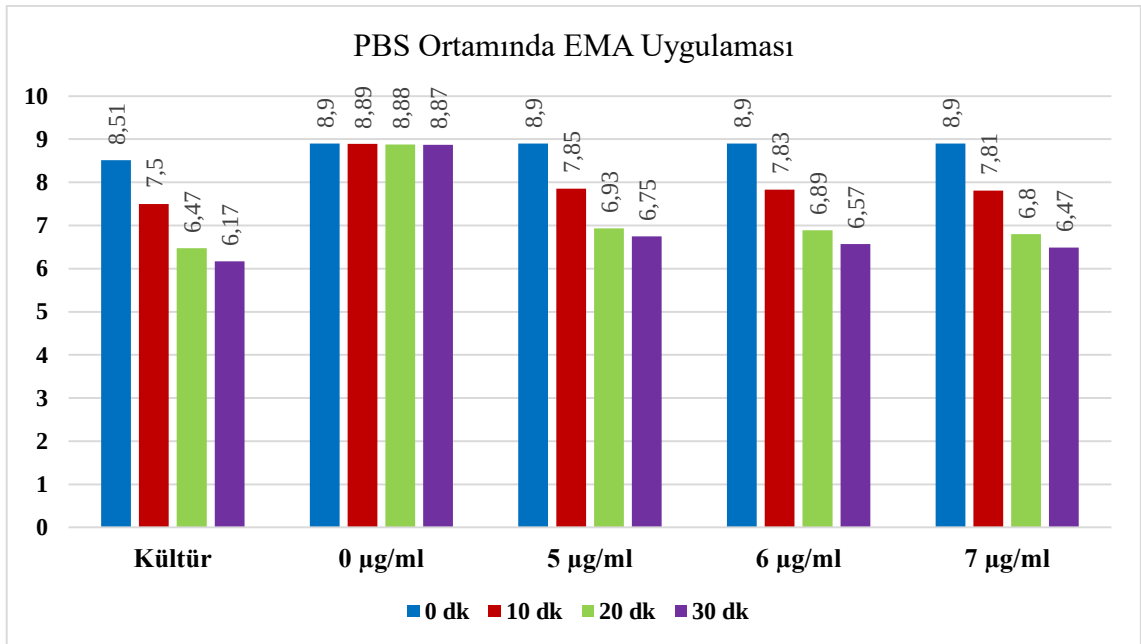
*: qPCR analizinde EMA uygulanmamıştır.

a,b,c,d,e: Aynı satırda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.

A,B,C,D: Aynı sütunda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 17. PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü



Şekil 18. PBS ortamında farklı konsantrasyonlarda EMA uygulaması yapılan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü

Tablo 3. PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri

Kodu	Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı ($\log_{10}$ kob/ml)	PMA Dozu (μ M/ml)	qPCR Sayımı ($\log_{10}$ kopya/ml)	Kültür - qPCR Sayımı Arasındaki Fark $\log_{10}$	P*
PPK	0	8.62±0.035	0	8.95±0.028	0.33	0.067
PX	10	7.63±0.017	0	8.94±0.037	1.31	0.001
PA	10	7.55±0.063	20	7.93±0.014	0.38	0.056
PB	10	7.69±0.028	25	7.93±0.056	0.24	0.143
PC	10	7.64±0.028	30	7.87±0.063	0.23	0.161
PY	20	6.69±0.005	0	8.94±0.019	2.25	0.000
PD	20	6.69±0.035	20	6.92±0.014	0.23	0.061
PE	20	6.65±0.099	25	6.89±0.035	0.24	0.154
PF	20	6.72±0.035	30	6.88±0.048	0.16	0.196
PX	30	6.13±0.004	0	8.93±0.024	2.80	0.001
PG	30	6.17±0.014	20	6.48±0.042	0.31	0.079
PH	30	6.18±0.014	25	6.47±0.084	0.29	0.181
PI	30	6.06±0.014	30	6.39±0.170	0.33	0.309

*: Değerler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

PPK: PBS Pozitif Kontrol, PX: 10 dk. ısı + 0 μ g/ml PMA, PA: 10 dk. ısı + 20 μ g/ml PMA, PB: 10 dk. ısı + 25 μ g/ml PMA, PC: 10 dk. ısı + 30 μ M/ml PMA, PD: 20 dk. ısı + 20 μ M/ml PMA, PE: 20 dk. ısı + 25 μ M/ml PMA, PF: 20 dk. ısı + 30 μ M/ml PMA, PG: 30 dk. ısı + 20 μ M/ml PMA, PH: 30 dk. ısı + 25 μ M/ml PMA, PI: 30 dk. ısı + 30 μ M/ml PMA

PBS ortamında hazırlanan test süspansiyonunun kültürel sayım sonucu 8.62±0.035 $\log_{10}$ kob/ml ve qPCR sayım sonucu ise 8.95±0.028 $\log_{10}$ kopya/ml olarak belirlenmiştir. İki değer arasındaki fark 0.33 $\log_{10}$ olup, bu fark istatistiksel olarak önemsiz ($p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 3).

PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR

yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri Tablo 3'te sunuldu. 10, 20 ve 30 dk.'lık ısı uygulaması sonrasında PMA uygulanmayan qPCR gruplarının (0 µM/ml) kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemli bulunurken 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerde kültür ve PCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemsiz bulundu (Tablo 3).

PBS ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi Tablo 4 ve Şekil 19 ve 20'de sunuldu.

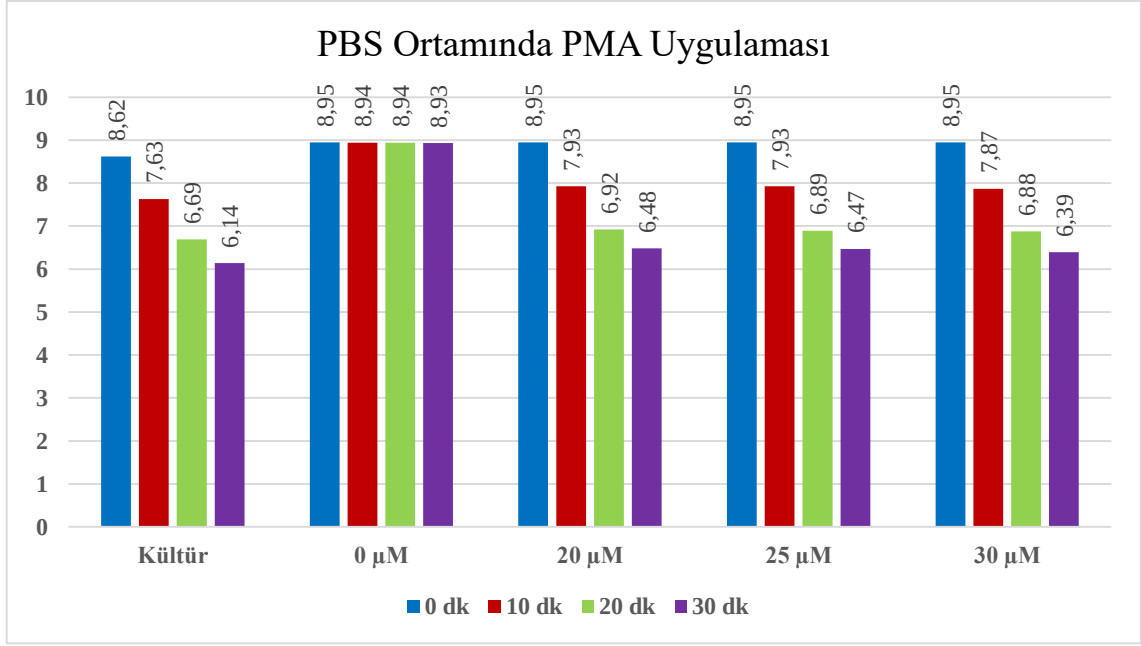
Tablo 4. PBS ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı (log ₁₀ kob/ml)	PMA Final Konsantrasyonuna göre qPCR Kopya Sayısı			
		0 µM*	20 µM	25 µM	30 µM
0	8.62±0.035 ^{Aa}	8.95±0.028 ^{Aa}	8.95±0.028 ^{Aa}	8.95±0.028 ^{Aa}	8.95±0.028 ^{Aa}
10	7.63±0.074 ^{Ba}	8.94±0.037 ^{Ab}	7.93±0.014 ^{Bc}	7.93±0.056 ^{Bcd}	7.87±0.063 ^{Bce}
20	6.69±0.057 ^{Ca}	8.94±0.019 ^{Ab}	6.92±0.014 ^{Cc}	6.89±0.035 ^{Ccd}	6.88±0.049 ^{Cce}
30	6.14±0.060 ^{Da}	8.93±0.024 ^{Ab}	6.48±0.042 ^{Dc}	6.47±0.084 ^{Ddc}	6.39±0.170 ^{Dac}
Ortalama	6.82 ^a	8.94 ^b	7.11 ^a	7.10 ^a	7.05 ^a

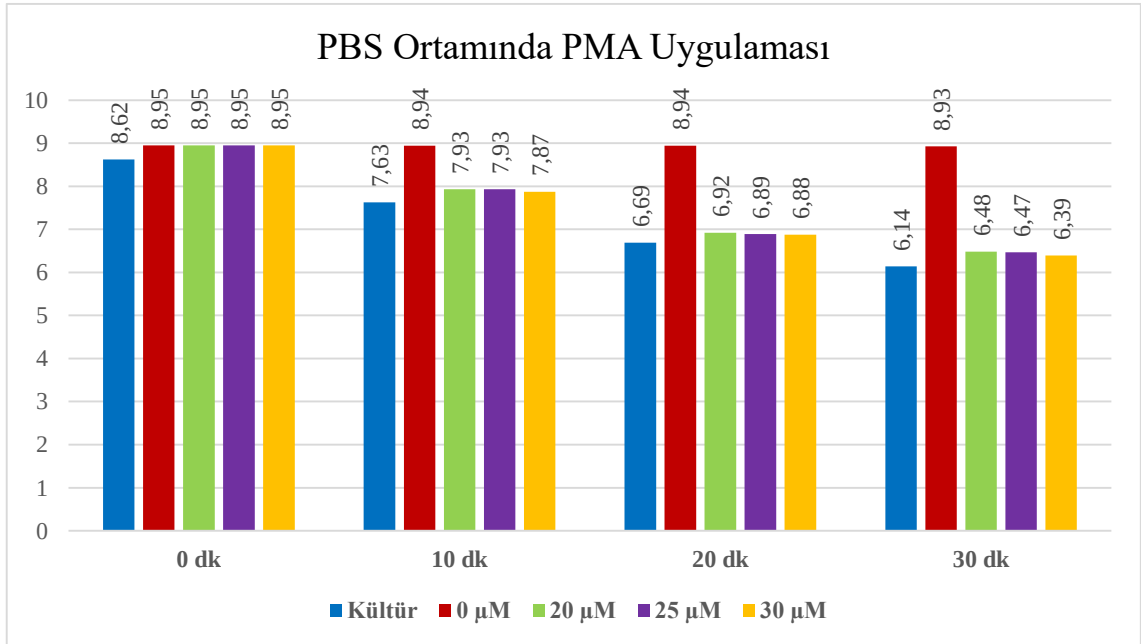
*: qPCR analizinde PMA uygulanmamıştır

a,b,c,d,e: Aynı satırda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.005$ düzeyinde önemlidir.

A,B,C,D: Aynı sütunda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 19. PBS ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü



Şekil 20. PBS ortamında farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması yapılan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü

4.1.2. Süt ortamında ısıtma işlem uygulamasına ait bulgular

Süt ortamında hazırlanan test süspansiyonunun kültürel sayım sonucu 8.67 ± 0.035 $\log_{10}$ kob/ml ve qPCR sayım sonucu ise 8.95 ± 0.035 $\log_{10}$ kopya/ml olarak belirlenmiştir. İki değer arasındaki fark 0.28 $\log_{10}$ olup, bu fark istatistiksel olarak önemsiz ($p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri

Kodu	Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı ($\log_{10}$ kob/ml)	EMA Dozu ($\mu\text{g/ml}$)	qPCR Sayımı ($\log_{10}$ kopya/ml)	Kültür - qPCR Sayımı Arasındaki Fark $\log_{10}$	P*
SPK	0	8.67 ± 0.035	0	8.95 ± 0.035	0.28	0.077
SX	10	8.54 ± 0.077	0	8.93 ± 0.026	0.39	0.001
SA	10	8.58 ± 0.077	5	8.94 ± 0.014	0.36	0.062
SB	10	8.54 ± 0.091	6	8.92 ± 0.049	0.38	0.117
SC	10	8.50 ± 0.063	7	8.79 ± 0.049	0.29	0.128
SY	20	7.45 ± 0.077	0	8.93 ± 0.017	1.48	0.000
SD	20	7.51 ± 0.077	5	7.92 ± 0.028	0.41	0.068
SE	20	7.40 ± 0.042	6	7.84 ± 0.070	0.44	0.121
SF	20	7.43 ± 0.106	7	7.72 ± 0.070	0.29	0.184
SZ	30	6.63 ± 0.071	0	8.93 ± 0.011	2.30	0.000
SG	30	6.67 ± 0.056	5	6.97 ± 0.028	0.30	0.080
SH	30	6.59 ± 0.148	6	6.88 ± 0.014	0.29	0.156
SI	30	6.62 ± 0.148	7	6.82 ± 0.063	0.20	0.282

*: Değerler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

SPK: PBS Pozitif Kontrol, SX: 10 dk. ısı + 0 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SA: 10 dk. ısı + 5 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SB: 10 dk. ısı + 6 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SC: 10 dk. ısı + 7 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SD: 20 dk. ısı + 5 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SE: 20 dk. ısı + 6 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SF: 20 dk. ısı + 7 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SG: 30 dk. ısı + 5 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SH: 30 dk. ısı + 6 $\mu\text{g/ml}$ EMA, SI: 30 dk. ısı + 7 $\mu\text{g/ml}$ EMA

Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri Tablo 5’te sunuldu. 10, 20 ve 30 dk.’lık ısı uygulaması sonrasında PMA uygulanmayan direkt qPCR gruplarının kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemli bulunurken 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerde kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemsiz bulundu (Tablo 5).

Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi Tablo 6 ve Şekil 21 ve 22’de sunuldu.

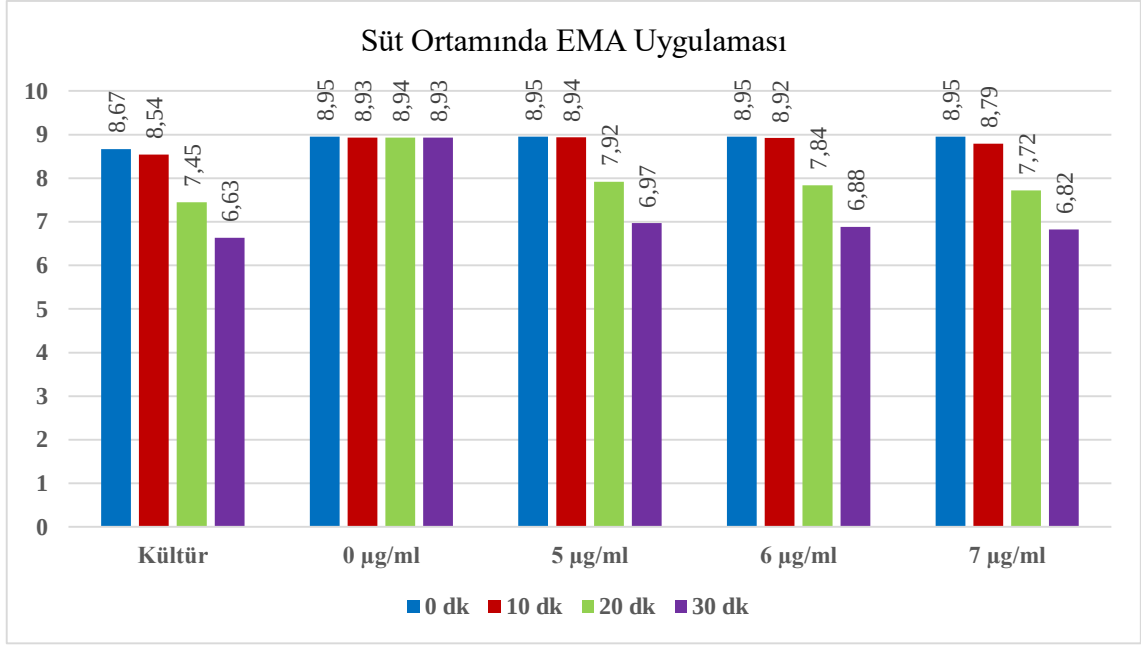
Tablo 6. Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı (log ₁₀ /ml)	EMA Final Konsantrasyonuna göre qPCR Kopya Sayısı			
		0 µg/ml*	5 µg/ml	6 µg/ml	7 µg/ml
0	8.67±0.035 ^{Aa}	8.95±0.035 ^{Aa}	8.95±0.035 ^{Aa}	8.95±0.035 ^{Aa}	8.95±0.035 ^{Aa}
10	8.54±0.070 ^{Aa}	8.93±0.026 ^{Abc}	8.94±0.014 ^{Ac}	8.92±0.049 ^{Acd}	8.79±0.049 ^{Be}
20	7.45±0.078 ^{Ba}	8.94±0.017 ^{Ab}	7.92±0.028 ^{Bc}	7.84±0.070 ^{Bcd}	7.72±0.070 ^{Ce}
30	6.63±0.107 ^{Ca}	8.93±0.011 ^{Ab}	6.97±0.028 ^{Cc}	6.88±0.014 ^{Cd}	6.82±0.063 ^{Dde}
Ortalama	7.54 ^a	8.93 ^a	7.94 ^a	7.88 ^a	7.78 ^a

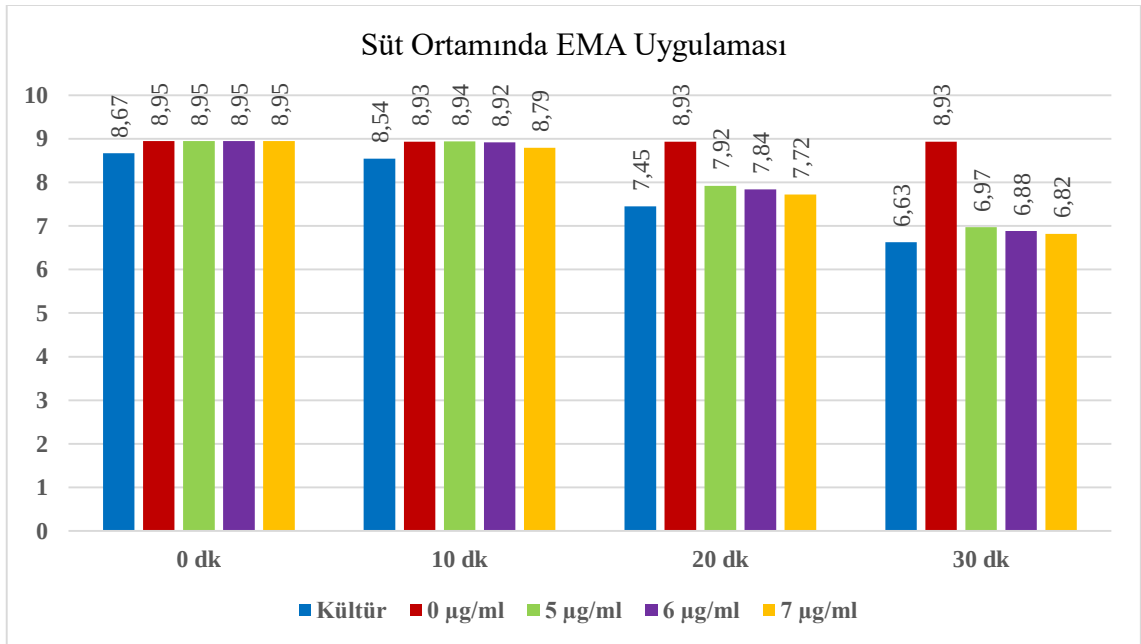
*: qPCR analizinde EMA uygulanmamıştır

a,b,c,d,e: Aynı satırda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.

A,B,C,D: Aynı sütunda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 21. Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı EMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü



Şekil 22. Süt ortamında farklı konsantrasyonlarda EMA uygulaması yapılan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü

Tablo 7. Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri

Kodu	Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı ($\log_{10}$ kob/ml)	PMA Dozu (μ M/ml)	qPCR Sayımı ($\log_{10}$ kopya/ml)	Kültür - qPCR Sayımı Arasındaki Fark $\log_{10}$	P*
SPK	0	9.25±0.021	0	9.72±0.063	0.47	0.103
SX	10	8.73±0.034	0	9.69±0.058	0.96	0.004
SA	10	8.79±0.021	20	8.99±0.000	0.20	0.054
SB	10	8.71±0.028	25	8.98±0.028	0.27	0.060
SC	10	8.68±0.056	30	8.92±0.014	0.24	0.091
SY	20	7.48±0.063	0	9.67±0.068	2.19	0.004
SD	20	7.53±0.070	20	7.90±0.028	0.37	0.073
SE	20	7.51±0.056	25	7.88±0.042	0.37	0.087
SF	20	7.40±0.063	30	7.75±0.063	0.35	0.123
SZ	30	6.42±0.038	0	9.67±0.059	3.25	0.003
SG	30	6.45±0.056	20	6.70±0.021	0.25	0.093
SH	30	6.41±0.021	25	6.62±0.063	0.21	0.175
SI	30	6.39±0.070	30	6.60±0.120	0.21	0.320

*: Değerler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

SPK: PBS Pozitif Kontrol, SX: 10 dk. ısı + 0 μ M/ml PMA, SA: 10 dk. ısı + 20 μ M/ml PMA, SB: 10 dk. ısı + 25 μ M/ml PMA, SC: 10 dk. ısı + 30 μ M/ml PMA, SD: 20 dk. ısı + 20 μ M/ml PMA, SE: 20 dk. ısı + 25 μ M/ml PMA, SF: 20 dk. ısı + 30 μ M/ml PMA, SG: 30 dk. ısı + 20 μ M/ml PMA, SH: 30 dk. ısı + 25 μ M/ml PMA, SI: 30 dk. ısı + 30 μ M/ml PMA

Süt ortamında hazırlanan test süspansiyonunun kültürel sayım sonucu 9.25±0.021 $\log_{10}$ kob/ml ve qPCR sayım sonucu ise 9.72±0.063 $\log_{10}$ kopya/ml olarak belirlenmiştir. İki değer arasındaki fark 0.47 $\log_{10}$ olup, bu fark istatistiksel olarak önemsiz ($p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 7).

Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile karşılaştırmalı yapılan kantitatif analiz sonuçlarının ortalama değerleri Tablo

7’de sunuldu. 10, 20 ve 30 dk.’lık ısı uygulaması sonrasında PMA uygulanmayan qPCR gruplarının (0 µM/ml) kültür ve qPCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemli bulunurken 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerde kültür ve PCR sayımları arasındaki fark $p<0.005$ düzeyinde önemsiz bulundu (Tablo 8).

Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi Tablo 8, Şekil 23 ve 24’te sunuldu.

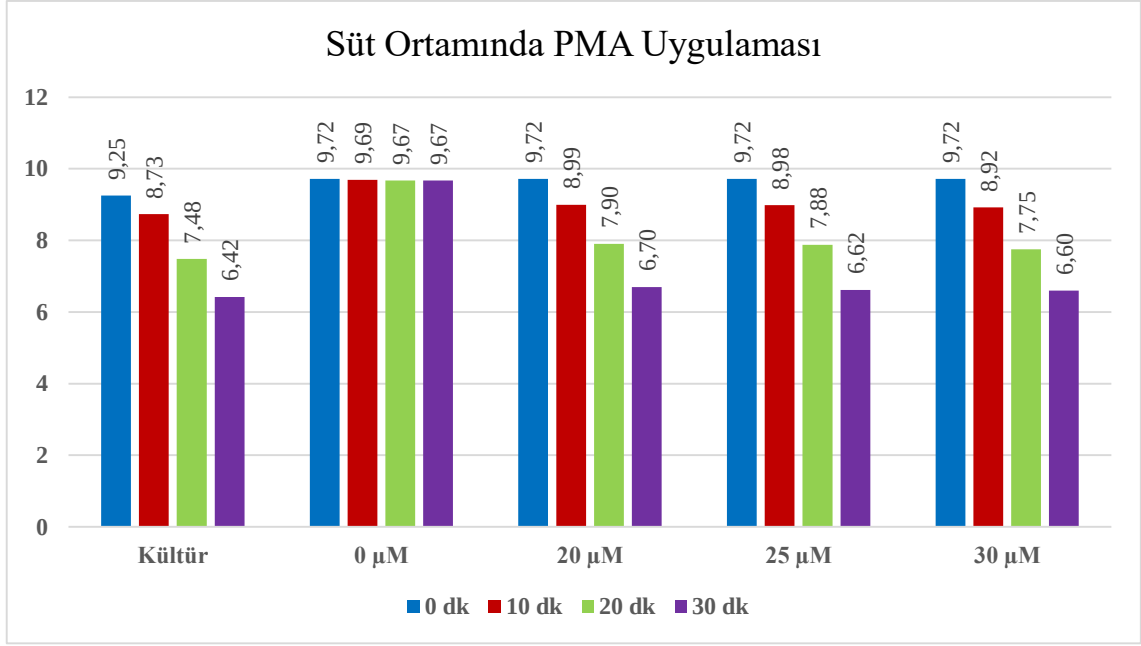
Tablo 8. Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan kantitatif analiz sonuçlarının istatistiksel analizi

Isı Süresi (dk.)	Kültür Sayımı (log ₁₀ kob/ml)	PMA Final Konsantrasyonuna göre qPCR Kopya Sayısı			
		0 µM*	20 µM	25 µM	30 µM
0	9.25±0.021 ^{Aa}	9.72±0.063 ^{Aa}	9.72±0.063 ^{Aa}	9.72±0.063 ^A	9.72±0.063 ^{Aa}
10	8.73±0.056 ^{Ba}	9.69±0.058 ^{Ab}	8.99±0.000 ^{Bc}	8.98±0.028 ^{Bcd}	8.92±0.014 ^{Be}
20	7.48±0.079 ^{Ca}	9.67±0.068 ^{Ab}	7.90±0.028 ^{Cc}	7.88±0.042 ^{Ccd}	7.75±0.063 ^{Ce}
30	6.42±0.052 ^{Da}	9.67±0.059 ^{Ab}	6.70±0.021 ^{Dc}	6.62±0.063 ^{Dcd}	6.60±0.120 ^{Dac}
Ortalama	7.54 ^a	9.68 ^a	7.86 ^a	7.83 ^a	7.76 ^a

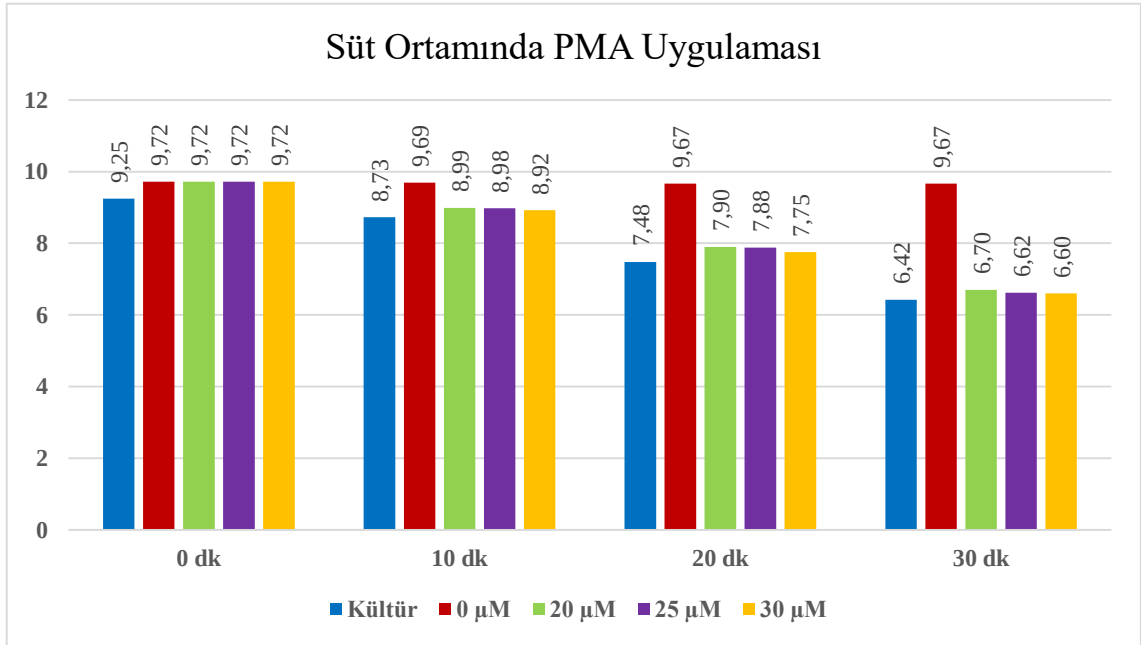
*: qPCR analizinde PMA uygulanmamıştır

a,b,c,d,e: Aynı satırda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.

A,B,C,D: Aynı sütunda harfler arasındaki fark, istatistiksel açıdan $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 23. Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayısının kültür yöntemi ve farklı PMA konsantrasyonları uygulaması sonrası qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü



Şekil 24. Süt ortamında farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması yapılan *E. coli* O157:H7 canlı bakteri sayılarının kültür yöntemi ve qPCR yöntemi ile yapılan logaritmik kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

E. coli O157:H7, insanlarda diyare, hemorajik kolit, HUS gibi ölümlerle sonuçlanabilen önemli infeksiyonlara neden olan bir patojendir (Su ve Brandt, 1995; Chattaway ve ark., 2011). Etkenin insana bulaşmasında *E. coli* O157:H7 bulunan bağırsak içeriği ile kontamine ette etkenin çoğalması ve halk sağlığını tehdit edebilecek düzeye ulaşması, önemli bir risk oluşturmaktadır. İnsanlardaki enfeksiyonların çoğunlukla iyi pişirilmemiş et ve et ürünleri ile pastörize edilmeyen süt ve süt ürünlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Condera ve ark., 2004). Bu patojenin etkilerini gösterebilmesi, vücuda canlı olarak alınmasına bağlıdır.

Gıdalarda canlı bakterilerin tespitinde konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Bir gold standart olarak kabul edilen bu yöntemin; emek yoğun, zaman alıcı, maliyetinin yüksek olması, sonuçların elde edilmesinin 5-7 günü bulması, identifikasyon için birçok biyokimyasal ve serolojik testlere ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları ile birlikte birçok bakteri türünün VBNC formuna girebilmesi ve kültür ortamında üretilmemesi nedeniyle, canlı bakterilerin tespiti için hassas, hızlı ve uygulanması kolay analiz metotlarına ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur (Hugenholtz ve ark., 1998; FDA, 2020; Taskin, 2017; Yelboğa ve Karagüler, 2012).

Gıdalarda bakterilerin tespiti amacıyla kullanılan nükleik asit bazlı moleküler yöntemler, her geçen gün geliştirilmektedir. Bu tekniklerdeki en önemli zorluk DNA izolasyonu sonrasında canlı ve ölü hücre DNA'larının birbirinden ayırt edilememesidir. Özellikle canlı-ölü bakterileri ayırmada boya bazlı qPCR yöntemleri son zamanlarda ön plana çıkmaktadır (Kesmen ve Aslan, 2017). Boya bazlı yöntemlerde, ölü hücrelerden veya serbest ortamdan gelen DNA molekülleri diskalifiye edilmektedir. Bu amaçla, nükleik asitlere bağlanabilen foto-indüklenebilir boyalar kademeli olarak kullanım alanı bulmuştur. Bu boyalardan EMA ve PMA™ boyaları bu alternatif stratejilerde en yaygın olarak kullanılanlardır (Nocker ve ark., 2006; Nocker ve Camper, 2006; Wagner ve ark., 2008; Bae ve Wuertz 2009; Tantikachornkiat ve ark., 2016; Takahashi ve ark., 2017).

Bu çalışmada, canlı *E. coli* O157:H7 hücrelerinin varlığı ve miktarını qPCR tekniği ile belirlemek ve konvansiyonel kültür yöntemiyle karşılaştırmak amacıyla, PBS ve süt ortamlarında farklı sürelerde ısıtma işlemi uygulanan *E. coli* O157:H7 süspansiyonları

konvansiyonel kültür yöntemi, farklı EMA ve PMA konsantrasyonlarının uygulanması sonrasında yapılan qPCR tekniği ile kantitatif analizleri yapıldı. Araştırmada qPCR analizlerinde kullanılan *E. coli* O157:H7 tür spesifik primerler 227 bp'lik bölgeyi hedeflemekte olup Wang ve ark.'nın (2007 ve 2009) bildirdiği şekilde kullanıldı.

Çalışmada *E. coli* O157:H7 kültürünün PBS ve süt ortamında ayrı ayrı süspansiyonları hazırlanarak kültür ve qPCR sayımları yapıldı. Süspansiyonlardan hazırlanan porsiyonlara 55°C'de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulandı. Ardından her bir ısı işlem uygulanmış porsiyonda ayrı ayrı olacak şekilde konvansiyonel kültür yöntemiyle canlı bakteri sayımları ile EMA ve PMA uygulamaları sonrası DNA izolasyonları yapıp qPCR yöntemiyle kantitatif analizleri yapıldı.

Liu ve Mustapha (2014), Real-Time PCR tekniğinin, konvansiyonel PCR'dan daha hassas olduğunu ve gıdalarda patojen bakterilerin özellikle kantitatif analizinde kullanılabileceğini, içeriği bilinmeyen bir örnekteki hücre sayısına bağlı olarak elde edilen ct değerinin standart eğri ile karşılaştırılması suretiyle, örnekteki canlı *E. coli* O157:H7 konsantrasyonunun tespit edilebildiğini ifade etmişlerdir.

Bu araştırmada, EMA'nın 55°C'de 10, 20 ve 30 dk. sürelerde ısı işlem uygulanan PBS ve süt ortamındaki canlı-ölü *E. coli* O157:H7 hücrelerini qPCR yöntemi ile ayırmadaki etkinliğini belirlemek amacıyla 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonlarında EMA boyası kullanıldı. Elde edilen kantitatif analiz sonuçları kültür yöntemi ile karşılaştırıldı (Tablo 1 ve 5).

PBS ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin kültürel yöntem ve qPCR yöntemleri ile tespit edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde; PBS ortamında yapılan analizlerde kültürel sayım sonucu ($8.51 \pm 0.120 \log_{10}$ kob/ml) ile EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) qPCR sayım sonucu ($8.90 \pm 0.021 \log_{10}$ kopya/ml) arasındaki fark önemsiz ($p < 0.05$) bulundu (Tablo 1). Isıl işlemin farklı sürelerinde elde edilen sonuçlara göre 10, 20 ve 30 dk. ısı uygulanan örneklerde kültür sayımı ile 0, 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p < 0.005$) bulundu. 10, 20 ve 30 dk. ısı uygulanan örneklerde 0 ile 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda

EMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu (Tablo 2, Şekil 18).

10 dk. ısı uygulanan örneklerde EMA konsantrasyonları arasında 5 µg/ml ile 6 µg/ml konsantrasyonları arasındaki fark önemli bulunurken, 5 µg/ml ile 7 µg/ml ve 6 µg/ml ile 7 µg/ml konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu. 20 dk. ısı uygulanan örneklerde EMA konsantrasyonları arasında 5 µg/ml ile 6 µg/ml ve 6 µg/ml ile 7 µg/ml konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz bulunurken, 5 µg/ml ile 7 µg/ml konsantrasyonları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. 30 dk. ısı uygulanan örneklerde EMA konsantrasyonları arasında 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonları arasındaki fark önemli bulunurken 6 µg/ml ile 7 µg/ml konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu (Tablo 2, Şekil 18).

PBS ortamında kültürel sayım sonuçları değerlendirildiğinde, ısı işlem uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulanan örneklerde kültürel sayımlar arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. qPCR sayım sonuçları değerlendirildiğinde de ısı işlem ve EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulanan ve EMA uygulanmayan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu. Isıl işlem ve EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulandıktan sonra 5, 6 ve 7 µg/ml EMA konsantrasyonları uygulanan tüm gruplarda qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu (Tablo 2, Şekil 17).

Çeşitli araştırmacılar (Nogva ve ark., 2003; Nocker ve ark., 2006; Pan ve Breidt 2007; Cawthorn ve Witthuhn, 2008; Nam ve ark., 2005) tarafından farklı mikroorganizmaların canlı ve ölü hücre ayırımında EMA+qPCR tekniği ile uygulanan çalışmalar yapılmıştır. Wang ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada *E. coli* O157:H7 hücrelerinin canlı ölü ayırımında etkinliğini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda kullandıkları EMA boyası için canlı ölü hücre ayırımında 10 µM/ml (5 µg/ml) konsantrasyonun 10^8 kob/ml ölü *E. coli* O157:H7 hücre DNA’sının amplifikasyonunu engellemek için yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da PBS ve süt ortamlarında 10^8 kob/ml *E. coli* O157:H7 canlı bakteri süspansiyonlarına 95°C’de 5

dk.'lık ısı uygulaması sonrasında 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonlarında EMA uygulamalarının ardından qPCR yöntemi ile canlı bakteri tespit edilemedi. Liu ve Mustapha (2014) ise yaptıkları bir çalışmada 10^8 kob/ml ölü *E. coli* O157:H7 hücrelerinden elde edilen DNA'yı bağlamak ve PCR amplifikasyonunu önlemek için optimum EMA konsantrasyonunun 25 µM (yaklaşık 12 µg/ml) olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada PBS ve süt ortamlarında yapılan uygulamalarda kullanılan EMA konsantrasyonları arasında kültür sayımına en yakın qPCR sayımının 7 µg/ml EMA uygulaması ile elde edildiği görüldü (Tablo 2 ve 6).

Süt ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin kültürel yöntem ve qPCR yöntemleri ile tespit edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde; süt ortamında yapılan analizlerde kültürel sayım sonucu ($8.67 \pm 0.035 \log_{10}$ kob/ml) ile EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) qPCR sayım sonucu ($8.95 \pm 0.035 \log_{10}$ kopya/ml) arasındaki fark önemsiz ($p < 0.05$) bulundu (Tablo 5, Şekil 22). Nocker ve Camper (2006), yaptıkları çalışmada farklı DNA konsantrasyonlarının ct değerlerinin logaritmik analizi amacıyla hazırladıkları 0.9829'luk bir R^2 değerine sahip standart eğri ile ölçüm sonucuna göre, hiçbir muamele yapılmayan DNA'nın tamamının amplifiye edilebilir olduğunu belirtmişlerdir.

Lee ve Levin (2006), balık filetolarında flora bakterileri ile yaptıkları bir çalışmada ısı ile öldürdükleri hücrelerden elde edilen hedef DNA'nın amplifikasyonunun, bu tür hücrelerin 0.8 µg/ml veya daha yüksek bir konsantrasyonda EMA ile işleme tabi tutulması durumunda tamamen inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Isı ile öldürülmüş hücrelerden DNA amplifikasyonunu inhibe eden bu EMA konsantrasyonunun, canlı hücrelerden türetilen DNA amplifikasyonunun dahi inhibisyonu ile sonuçlanan 20 µg/ml seviyesinin oldukça altında olduğunu ifade etmişlerdir.

Bu araştırmada süt ortamında 10, 20 ve 30 dk. ısı uygulanan örneklerde kültür sayımı ile 0, 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p < 0.005$) bulundu (Tablo 6, Şekil 22). Nocker ve Camper (2006) EMA'nın, canlı/ölü karışık kültürlerde uygulanabildiğini ve dolayısıyla metabolik olarak aktif fraksiyonun incelemesine izin verebildiğini, canlı bakterilerden elde edilen kültürel sayım sonuçlarının, toplam (canlı ve ölü) hücrelerin analizlerinden

elde edilen qPCR sayım sonuçlarından önemli ölçüde farklı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Süt ortamında 10 dk. ısı uygulanan örneklerde 0 ile 5 ve 6 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulunurken, 0 ile 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli bulundu. 20 ve 30 dk. ısı uygulanan örneklerde ise 0 ile 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. 10 ve 20 dk. ısı uygulanan örneklerde qPCR sayımları açısından 5 ve 6 µg/ml EMA konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulunurken, 5 ile 7 µg/ml ve 6 ile 7 µg/ml EMA konsantrasyonları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. 30 dk. ısı uygulanan örneklerde ise qPCR sayımları açısından 5 µg/ml ile 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulunurken, 6 ile 7 µg/ml EMA konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu (Tablo 6, Şekil 22).

Nocker ve Camper (2006), yaptıkları bir çalışmada *E. coli* O157:H7 ile *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium kültürlerinin canlı ve ölü süspansiyonlarından %50 oranında karışımlar hazırlamışlardır. EMA ile muamele edilmiş ve EMA ile muamele edilmemiş numunelerin qPCR analizinde, EMA ile muamele edilmiş numunelerin DNA konsantrasyonları, hücrelerin yarısının canlı olmadığı gerçeği göz önüne alındığında EMA ile muamele edilmemiş numunelere göre daha düşük sayıda bulunduğunu gözlemişlerdir. EMA ile muamele edilmiş numunelerin tür spesifik PCR amplifikasyonunun, ısıyla öldürülen hücrelerin oranı arttıkça azalan bir sinyalle sonuçlandığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmada da benzer şekilde EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu örneklerin qPCR analizlerinde elde edilen sonuçlar, farklı konsantrasyonlarda EMA uygulanan örneklerin qPCR analizlerine göre daha yüksek ve elde edilen sonuçlar arasındaki fark da önemli ($p<0.005$) bulundu. Ayrıca uygulanan ısı süresi arttıkça ölü hücre sayısı da arttığından EMA uygulanan örneklerin qPCR analizlerinde elde edilen ct değerlerinde de azalmalar tespit edildi (Tablo 6, Şekil 22).

Süt ortamında kültürel sayım sonuçları değerlendirildiğinde; ısıl işlem uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ile 55°C'de 10 dk. ısıl işlem uygulanan

örneklerde kültürel sayımlar arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulunurken, 20 ve 30 dk. süreyle ısıtıl işlem uygulanan örneklerde kültürel sayımlar arasındaki fark önemli bulundu (Tablo 6, Şekil 21). qPCR sayım sonuçları değerlendirildiğinde de ısıtıl işlem ve EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısıtıl işlem uygulanan ve EMA uygulanmayan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu (Tablo 6, Şekil 21). Bunun nedeni, direkt qPCR grubunda (0 $\mu\text{g/ml}$) EMA boyası kullanılmadığı için standart qPCR yönteminde canlı ve ölü hücre ayırımı yapılamamasından kaynaklanmış olabilir. Bu hususun bakteriyel teşhiste standart qPCR analizlerinin, canlı hücrelerin olduğundan fazla tahmin edilmesinden ve hatta yanlış pozitif sonuçlara yol açtığından direkt qPCR tekniğın su ve gıdaların mikrobiyolojik analizinin güvenilirliğini sınırladığı bildirilmiştir (Lemarchand ve ark., 2004; Rompre ve ark., 2002).

Isıl işlem ve EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile 55°C’de 10 dk. ısıtıl işlem uygulaması sonrası 5 ve 6 $\mu\text{g/ml}$ EMA konsantrasyonları uygulanan gruplarda qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulunurken, 20 ve 30 dk. süreyle ısıtıl işlem uygulandıktan sonra 5 ve 6 $\mu\text{g/ml}$ EMA konsantrasyonları uygulanan gruplarda qPCR sayımları arasındaki fark önemli bulundu. Isıl işlem ve EMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 $\mu\text{g/ml}$) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısıtıl işlem uygulandıktan sonra 7 $\mu\text{g/ml}$ EMA konsantrasyonu uygulanan grupta ise qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu (Tablo 6). Lee ve Levin (2006), yaptıkları çalışmada canlı hücreleri, 10 $\mu\text{g/ml}$ veya daha düşük bir konsantrasyonda EMA ile muamele ettiklerinde, EMA + Real-Time PCR yönteminde canlı hücrelerden elde edilen hedef DNA’nın amplifikasyonunda önemli bir inhibisyon meydana gelmediğini gözlemişlerdir. EMA konsantrasyonunun 10 $\mu\text{g/ml}$ ’nin üzerine çıkması durumunda ise canlı hücrelerden hedef DNA’nın amplifikasyonunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) azalmalar meydana geldiğini, EMA konsantrasyonu 50 $\mu\text{g/ml}$ olduğunda ise belirgin bir amplifikasyon inhibisyonu meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu araştırmada kullanılan EMA konsantrasyonları 10 $\mu\text{g/ml}$ ’nin altında olup kültürel sayımlarla karşılaştırıldığında canlı hücrelerde belirgin bir amplifikasyon inhibisyonunu gözlenmedi.

EMA kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda (Nogva ve ark., 2003; Lee ve Levin 2006; Nocker ve Camper 2006; Pan ve Breidt 2007; Cawthorn ve Witthuhn, 2008; Nam

ve ark., 2005) çeşitli araştırmacılar tarafından farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bu durum, çalışmalarda kullanılan materyallerin, mikroorganizmaların ve EMA konsantrasyonlarının farklılığından kaynaklanabilir.

Öte yandan konu ile ilgili Nocker ve ark. (2006), DNA bağlayıcı EMA ve PMA boyalarının seçici olarak ölü hücrelerin zarar görmüş hücre duvarlarından geçebildiğini ve hasarlı hücre duvarını geçtikten sonra DNA'ya bağlandığını, ancak canlı hücrelerin bütünlüğü bozulmamış hücre duvarlarından geçemediğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar, yüksek konsantrasyonlarda kullanılan EMA'nın canlı hücrelere de nüfuz edebildiğini ve yanlış negatif PCR sonuçlarına yol açabildiğini de ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise 10 µg/ml'nin altında olmakla birlikte artan EMA konsantrasyonlarının konvansiyonel kültür sayımları ile EMA+qPCR sayımlarının birbirlerine yaklaştığı ve aralarındaki farkın artan konsantrasyonlarda önemsiz hale geldiği gözlenmiş olup söz konusu araştırmacıların sonuçları ve EMA'nın canlı hücre duvarlarından geçmediği prensibi ile uyumlu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda her ne kadar 10 µg/ml'nin üstünde olup artan EMA konsantrasyonlarının ölü bakteriler yanında canlı bakterilerin de DNA'larının amplifikasyonunu engellediği ifade edilse de, bu durum EMA'nın seçici geçirgenlik ilkesi ile çelişmektedir.

Bu durumun, EMA'nın genel olarak membran geçirimsiz olarak kabul edilemeyeceğinin altını çizmekle beraber sadece ölü veya hasarlı hücrelere nüfuz ettiği bildirilmiş olmasına rağmen yalnızca kısa maruz kalma sürelerine sahip seçilmiş bakteri türleri için geçerli olabileceği ifade edilmiştir (Nogva ve ark., 2003; Rudi ve ark., 2005).

PMA'nın son zamanlarda gıdalarda canlı ve ölü hücrelerin ayırımında artan oranlarda kullanım alanı bulduğu bildirilmiştir (Nocker ve ark., 2006; Nam ve ark., 2005; Elizaquível ve ark., 2012c; Slimani ve ark., 2012; Telli, 2016).

Isıl işlemin uygulandığı gıdalarda bulunan canlı bakteri sayısının tespitinde ısı işlemin derecesi ve süresi, PMA+qPCR tekniğinin etkinliğine tesir eden en önemli faktörlerdir (Lee ve Levin, 2009). Ortamda bakteri yoğunluğunun fazla olması durumunda PMA ölü hücrelere nüfuz edebilmesine rağmen ortamdaki diğer hücrelerin kısmen fotoaktivasyonu engelleyebildiği ve bu nedenle qPCR ile canlı hücrelerin ayırımında yanlış pozitif sonuçların görülebileceği ifade edilmiştir. Hücre yoğunluğu

azaldıkça kültür ile PMA+qPCR sonuçları arasındaki uyum giderek artmaktadır (Løvdal ve ark., 2011, Wagner ve ark., 2008, Aslan, 2016).

Canlı ve ölü hücrelerin ayırımı amacıyla PMA'nın ilk kez uygulandığı bir çalışmada (Nocker ve ark., 2006), araştırmacılar PMA'nın EMA ile karşılaştırıldığında daha yüksek seçicilikte olmasından dolayı daha avantajlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunun nedenini ise, EMA'nın bazı bakteri türlerinde canlı hücrelere de penetre olması ile ilişkilendirmişlerdir. Her ne kadar canlı hücrelerdeki metabolik aktivite yardımıyla transport pompaları EMA'yı hücre dışına çıkarsa da bu durum, rezidüel EMA'nın büyük ölçüde DNA kaybına neden olmasıyla sonuçlandığı ifade edilmiştir. PMA'nın azide grubunun EMA'ya göre daha fazla yüke sahip olması nedeniyle sağlam olan membrandan geçememesinin DNA kaybını engelleyici bir etki sağladığı belirtilmiştir.

Telli (2016), ıspanak ve karışık salatalara inokule edilen mikroorganizmalarda canlılık tespiti için kullanılacak optimum PMA konsantrasyonunu 50 µM olarak belirlemiş ve PMA qPCR yönteminin taze sebzelerde bulunan canlı mikroorganizma sayılarının belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğunu ifade etmiştir.

Bu çalışmada PMA'nın 55°C'de 10, 20 ve 30 dk. sürelerde ısı işlem uygulanan PBS ve süt ortamındaki canlı-ölü *E. coli* O157:H7 hücrelerini qPCR yöntemi ile ayırmadaki etkinliğini belirlemek amacıyla 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonlarında PMA boyası kullanıldı. Elde edilen kantitatif analiz sonuçları kültür yöntemi ile karşılaştırıldı (Tablo 3 ve 7).

PBS ortamında 55°C'de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin kültürel yöntem ve qPCR yöntemleri ile tespit edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde; PBS ortamında yapılan analizlerde kültürel sayım sonucu ($8.62 \pm 0.035 \log_{10}$ kob/ml) ile PMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) qPCR sayım sonucu ($8.95 \pm 0.028 \log_{10}$ kopya/ml) arasındaki fark önemsiz ($p < 0.05$) bulundu (Tablo 3).

PBS ortamında 10 ve 20 dk. ısı uygulanan grupta kültür sayımı ile 0, 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p < 0.005$) bulundu. 30 dk. ısı uygulanan grupta ise kültür sayımı ile 0, 20 ve

25 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulunurken, kültür sayımı ile 30 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz bulundu (Tablo 4, Şekil 20).

10, 20 ve 30 dk. ısı uygulanan gruplarda 0 ile 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulunurken, tüm gruplarda qPCR sayımlarında ise 20, 25 ve 30 µM/ml PMA konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz bulundu (Tablo 4, Şekil 20).

Li ve ark. (2017) canlı ve ölü hücre ayırımında kullanılacak boya konsantrasyonlarının farklı yoğunluktaki canlı ve ölü mikroorganizma sayılarına ve mikroorganizma türlerine göre değişebildiğini bildirmişlerdir.

Liu ve Mustapha (2014), yaptıkları çalışmada, 10^8 kob/ml ölü *E. coli* O157:H7 hücrelerinden DNA amplifikasyonunu tamamen önlemek için 25 µM PMA konsantrasyonunun etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da PBS ve süt ortamlarında 10^8 kob/ml *E. coli* O157:H7 canlı bakteri süspansiyonlarına 95°C’de 5 dk.’lık ısı uygulaması sonrasında 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonlarında PMA uygulamalarının ardından qPCR yöntemi ile canlı bakteri tespit edilemedi.

Slimani ve ark. (2012) canlı ve ölü *Legionella pneumophila* hücrelerinden oluşan süspansiyonda (10^6 kob/ml) 6.25-50 µM arası konsantrasyonda PMA+qPCR yöntemiyle canlı hücreleri saptamaya çalışmışlar, PMA konsantrasyonlarından 6.25 µM uygulamasının optimum olduğunu, daha yüksek konsantrasyonlardaki PMA konsantrasyonlarının canlı hücrelerin DNA’larının amplifikasyonunu engellediğini ifade etmişlerdir. Banihashemi ve ark. (2012), 10-15 µM/ml gibi nispeten düşük PMA konsantrasyonları kullandıklarını, bu konsantrasyonlarda ölü hücre amplifikasyonunda maksimum bir azalma elde edildiğini ve daha yüksek konsantrasyonlarda daha iyi bir sonuç alınamadığını belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise (Nocker ve ark., 2007; Pan ve Breidt 2007; Løvdaal ve ark., 2011; Nam ve ark., 2005; Elizaquivel ve ark., 2012c; Telli, 2016) canlı ve ölü hücre ayırımında optimum PMA konsantrasyonunun 50 µM/ml olduğunu ileri sürmüşlerdir. Görüldüğü üzere optimal PMA konsantrasyonu konusunda araştırmacılar arasında farklı görüşler bulunmaktadır. Bu çalışmada PBS ve süt

ortamlarında yapılan uygulamalarda kullanılan PMA konsantrasyonları arasında 20 ve 25 µM/ml konsantrasyonlardaki uygulamalarda istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte kültür sayımına en yakın qPCR sayım sonucunun 30 µM/ml PMA uygulaması ile elde edildiği görüldü (Tablo 4 ve 8).

PBS ortamındaki kültürel sayım sonuçları değerlendirildiğinde; ısıtma işlemi uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısıtma işlemi uygulanan örneklerde kültürel sayımlar arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu (Tablo4, Şekil 19). qPCR sayım sonuçları değerlendirildiğinde ise ısıtma işlemi ve PMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µM/ml) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısıtma işlemi uygulanan ve PMA uygulanmayan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu (Şekil 19). Isıtma işlemi ve PMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µM/ml) ile 55°C’de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısıtma işlemi uygulandıktan sonra 20, 25 ve 30 µM/ml PMA konsantrasyonları uygulanan tüm gruplarda qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu (Tablo 4, Şekil 20).

Süt ortamında 55°C’de farklı sürelerde tutulan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin kültürel yöntem ve qPCR yöntemleri ile tespit edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde; Kültürel sayım sonucu ($9.25\pm0.021 \log_{10}$ kob/ml) ile PMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 µg/ml) qPCR sayım sonucu ($9.72\pm0.063 \log_{10}$ kopya/ml) arasındaki fark önemsiz ($p<0.05$) bulundu (Tablo 7).

Elizaquivel ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, hücre yoğunluğu arttıkça PMA uygulamasındaki etkinliğin azaldığını gözlemişler ve yüksek hücre konsantrasyonlarının, PMA-qPCR yönteminin canlı - ölü hücreleri birbirinden ayırt etme becerisine olumsuz katkı yaptığını tespit etmişlerdir. Bu sorunu çözmek ve gıda kaynaklı patojenlerin gıdalarda daha düşük seviyelerde bulunduğunu varsayarak, 10^4 kob/ml kültürlerine PMA-qPCR uyguladıklarını ifade etmişlerdir

Çalışmada süt ortamında 10 ve 20 dk. ısıtma uygulanan örneklerde kültür sayımı ile 0, 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. 30 dk. ısıtma uygulanan grupta ise kültür sayımı ile 0, 20 ve 25 µM/ml konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan

örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulunurken, kültür sayımı ile 30 $\mu\text{M}/\text{ml}$ konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerin qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz bulundu (Tablo 8, Şekil 24). 10, 20 ve 30 dk. ısı uygulanan örneklerde 0 ile 20, 25 ve 30 $\mu\text{M}/\text{ml}$ konsantrasyonda PMA uygulaması yapılan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. 10 ve 20 dk. ısı uygulanan örneklerde qPCR sayımlarında 20 ile 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ PMA konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz, 20 ile 30 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ve 25 ile 30 $\mu\text{M}/\text{ml}$ PMA konsantrasyonları arasındaki fark ise önemli ($p<0.005$) bulundu. 30 dk. ısı uygulanan örneklerde ise qPCR sayımlarında ise 20, 25 ve 30 $\mu\text{M}/\text{ml}$ PMA konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz bulundu (Tablo 8, Şekil 24).

Liu ve Mustapha (2014), çeşitli konsantrasyonlarda PMA uygulamalarında, minimum 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ PMA'nın, 10^8 kob/ml ölü *E. coli* O157:H7 DNA'sının amplifikasyonunu real-time PCR ile tamamen engelleyebildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmada 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ PMA konsantrasyonunun, canlı hücrelerden DNA amplifikasyonunu etkilemeden, ölü hücrelerden DNA'nın Real-Time PCR ile amplifikasyonunu tamamen engelleyebileceğini vurgulamışlardır.

Banihashemi ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada 50 μmol PMA kullanan diğer araştırmacılara (Nocker ve ark., 2007a; Pan ve Breidt, 2007) kıyasla 10-15 μmol gibi nispeten düşük PMA konsantrasyonları kullandıklarını, bu konsantrasyonlarda ölü hücre amplifikasyonunda maksimum bir azalma elde edildiğini ve daha yüksek konsantrasyonlarda daha iyi bir sonuç alınamadığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada kültürel sayım sonuçları değerlendirildiğinde; ısı işlem uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ile 55°C'de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulanan örneklerde kültürel sayımlar arasındaki fark önemli ($p<0.005$) bulundu. qPCR sayım sonuçları değerlendirildiğinde; ısı işlem ve PMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 $\mu\text{M}/\text{ml}$) ile 55°C'de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulanan ve PMA uygulanmayan örneklerde qPCR sayımları arasındaki fark önemsiz ($p<0.005$) bulundu. Isıl işlem ve PMA uygulanmayan direkt qPCR grubu (0 $\mu\text{M}/\text{ml}$) ile 55°C'de ayrı ayrı 10, 20 ve 30 dk. ısı işlem uygulandıktan sonra 20, 25 ve 30 $\mu\text{M}/\text{ml}$ PMA konsantrasyonları uygulanan tüm gruplarda qPCR sayımları arasındaki fark önemli

($p < 0.005$) bulundu (Tablo 8, Şekil 24). Kesmen ve Aslan (2017), *S. Typhimurium* inokule ettikleri süt örneklerine uyguladıkları ısı işlem sonrasında canlı hücrelerin tespiti için, qPCR tekniği ile kombine edilen PMA uygulamasının, qPCR tekniğinin başarısını belli bir düzeye kadar artırdığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da PMA uygulaması sonrası yapılan qPCR analizlerinde, PMA kullanılmadan yapılan qPCR analiz sonuçlarına nazaran kültür sayım sonuçlarına daha yakın sonuçlar elde edildi (Tablo 8).

Çalışmada PBS ortamında hazırlanan başlangıç kültürüne 55 °C’de farklı sürelerde uygulanan ısı işlem sonrası yapılan kültürel sayım sonuçlarına göre uygulanan ısı işlem süresi arttıkça canlı bakteri sayısının giderek azaldığı (Tablo 1 ve 3) ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) olduğu tespit edildi (Tablo 2 ve 4). Bu durum ısı ile muamele süresinin artmasına bağlı olarak bakterilerin inaktive olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Benzer durum, süt ortamındaki uygulamalarda da gözlemlendi (Tablo 3, 4, 5 ve 6). PBS ortamında hazırlanan başlangıç kültürüne 55 °C’de farklı sürelerde uygulanan ısı işlem sonrası yapılan direkt qPCR sayım sonuçlarına göre tespit edilen kopya sayısında önemli ($p < 0.05$) bir değişiklik olmadığı gözlemlendi (Tablo 2 ve 4). Elizaquivel ve ark. (2012b) da PMA uygulanmayan direkt qPCR analizlerine kıyasla PMA-qPCR uyguladıkları örneklerde kültür ve qPCR sayımları arasındaki farkın daha da azaldığını ifade etmişlerdir. Bu durum, ısı ile muamele süresinin artmasına bağlı olarak bakteriler inaktive olmakla birlikte hasar görmüş hücrelerin DNA’larını bağlayan boyalar (EMA ve PMA) bu grupta (Direkt qPCR grubu – 0 µg/ml) kullanılmadığı için canlı ve ölü tüm bakterilerin DNA’larının birlikte direkt qPCR ile sayılmış olmasından kaynaklanabilir. Benzer durum, süt ortamındaki uygulamalarda da gözlemlendi (Tablo 6 ve 8).

PBS ortamında 55 °C’de farklı sürelerde uygulanan ısı işlem sonrası yapılan EMA uygulamalarında 5, 6, 7 µg/ml konsantrasyonlarında EMA uygulaması sonrası yapılan qPCR analizlerinden elde değerler, direkt qPCR grubundan (0 µg/ml) daha düşük çıkmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 2). Nocker ve Camper (2006), yaptıkları çalışmada *E. coli* O157:H7 ile *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium kültürlerinin canlı ve ölü süspansiyonlarından %50 oranında karışımlar hazırlamışlardır. EMA ile muamele edilmiş ve EMA ile muamele edilmemiş numunelerin qPCR analizinde, EMA ile

muamele edilmiş numunelerin DNA konsantrasyonlarının, daha düşük düzeyde bulduklarını, ısıyla öldürülen hücrelerin oranı arttıkça EMA ile muamele edilen numunelerin PCR amplifikasyonunda da bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Nocker ve Camper (2006)'in bildirdiği şekilde bu çalışmada da direkt qPCR grubunda canlı ve ölü bakteriler direkt qPCR analizinde birlikte tespit edilirken, farklı konsantrasyonlarda EMA uygulanan gruplarda kullanılan EMA boyasının sadece ölü bakteri DNA'ları ile reaksiyona girerek amplifiye olmasını engellemesinden kaynaklanmış olabilir.

PBS ve süt ortamında ısı muamelesi sonrası farklı konsantrasyonlarda EMA uygulanan gruplar arasında birbirinden farklı sonuçlar elde edildi. Tablo 2'de sunulan PBS ortamındaki ortalama değerler dikkate alındığında, kültür sayımı ile EMA direkt qPCR grubu (0 µg/ml) arasında istatistiksel olarak bir fark ($p<0.05$) olmakla birlikte 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonlarda bir fark olmadığı görülmektedir. Süt ortamındaki ortalama değerler dikkate alındığında; kültür sayımı, direkt qPCR grubu (0 µg/ml) ve 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonlarda EMA uygulandıktan sonra yapılan qPCR sayımları arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmektedir (Tablo 6). Wang ve ark. (2009) canlı ölü *E. coli* O157:H7 hücrelerinin ayırımında 10 µM/ml (5 µg/ml) konsantrasyonun yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Lee ve Levin (2006) ise yaptıkları bir çalışmada canlı hücreleri, 10 µg/ml veya daha düşük bir konsantrasyonda EMA ile muamele ettiklerinde, EMA + qPCR yönteminde canlı hücrelerden elde edilen hedef DNA'nın amplifikasyonunda önemli bir inhibisyon meydana gelmediğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da hem PBS hem de süt ortamlarında yapılan uygulamalardan elde edilen ortalama değerler dikkate alındığında kültür sayımı ile 5, 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonlarda EMA uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmamakla birlikte, kültür sayımına en yakın değer 7 µg/ml konsantrasyonda EMA uygulanan grupta elde edildi (Tablo 2 ve 6).

Bu çalışmada PBS ortamında ısı muamelesi sonrası farklı konsantrasyonlarda PMA uygulanan gruplar arasında benzer sonuçlar elde edildi. Tablo 4'te sunulan ortalama değerler dikkate alındığında, kültür sayımı ile PMA direkt qPCR grubu (0 µM/ml) arasında istatistiksel olarak bir fark olduğu görülmektedir. Ancak kültür sayımı ile 20, 25 ve 30 µM/ml konsantrasyonlarda PMA uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmamakla birlikte, kültür sayımına en yakın değer 30 µM/ml

konsantrasyonda PMA uygulanan grupta elde edildiği görülmektedir. Tablo 8’de sunulan ortalama değerler dikkate alındığında; kültür sayımı ile PMA direkt qPCR grubu (0 μ M/ml), 20, 25 ve 30 μ M/ml konsantrasyonlarda PMA uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmamakla birlikte, kültür sayımına en yakın değerin 30 μ M/ml konsantrasyonda PMA uygulanan grupta elde edildiği görülmektedir. ısıtıl işlemin uygulandığı gıdalarda bulunan canlı bakteri sayısının tespitinde ısıtıl işlemin derecesi ve süresi, PMA+qPCR tekniğinin etkinliğine tesir eden en önemli faktörlerdir (Lee ve Levin, 2009). Ortamda bakteri yoğunluğunun fazla olması durumunda PMA ölü hücrelere nüfuz edebilmesine karşın ortamdaki diğer hücrelerin fotoaktivasyonu kısmen engelleyebileceği ve bu nedenle qPCR ile canlı hücrelerin ayırımında yanlış pozitif sonuçların görülebileceği ifade edilmiştir. Hücre yoğunluğu azaldıkça kültür ile PMA+qPCR sonuçları arasındaki uyum giderek artmaktadır (Løvdaal ve ark., 2011, Wagner ve ark., 2008, Aslan, 2016). Telli (2016), yaptığı çalışmada 50 μ M/ml PMA konsantrasyonu ile gerçekleştirdiği PCR reaksiyonunda ölü hücre oranının %100 olduğu örneklerde amplifikasyonun tamamen engellendiğini, canlı hücre oranının sırasıyla %100, %75, %50, %25 ve %0 olduğu örneklerde ise bant yoğunluğunun kademeli olarak azaldığını, çalışmada canlı-ölü hücre ayırımında optimum PMA konsantrasyonunun ise 50 μ M/ml olarak belirlendiğini belirtmiştir. Benzer şekilde diğer araştırmacılar da farklı bakteri türlerinde yaptıkları çalışmalarda optimum PMA konsantrasyonunu 50 μ M/ml olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir (Elizaquível ve ark., 2012c; Løvdaal ve ark., 2011). Öte yandan Slimani ve ark. (2012), canlı ve ölü *Legionella pneumophila* hücrelerinden oluşan süspansiyonda (10^6 kob/ml) PMA+qPCR yöntemiyle canlı ve ölü hücreleri saptamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada farklı (6.25-50 μ M arası) PMA konsantrasyonlarından 6.25 μ M/ml uygulamasının optimum olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte daha yüksek PMA konsantrasyonlarının canlı hücrelerin DNA’larının amplifikasyonunu engellediğini de ifade etmişlerdir. Bu çalışmada kültür sayımına en yakın qPCR analiz sonucu 30 μ M/ml konsantrasyonda yapılan PMA uygulamasından elde edildi. Elde edilen sonuçlar Slimani ve ark. (2012)’nin bildirdiği konsantrasyondan yüksek ancak diğer araştırmacıların bildirdiği konsantrasyondan düşüktür.

PBS ve Süt ortamlarında farklı konsantrasyonlarda EMA ve PMA uygulamaları sonrası yapılan qPCR sayımlarında elde edilen değerler, kültürel sayımlarda elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamakla

birlikte qPCR sayımları daha yüksek çıktı. Bu durum, 55 °C’de farklı sürelerde uygulanan ısıl işlem sonrası yapılan kültürel analizlerde tespit edilebilen canlı hücre sayılarının sadece kültüre edilebilen hücrelerden oluştuğu, canlı olup da kültüre edilemeyen hücrelerin (VBNC) ise üreyememeleri nedeniyle sayılamamasından kaynaklanmış olabilir. 55 °C’de farklı sürelerde uygulanan ısıl işlem sonrası farklı konsantrasyonlarda EMA ve PMA uygulamaları sonrası yapılan qPCR analizlerinde elde edilen sonuçların kültürel incelemelerden elde edilen sonuçlardan fazla çıkmaktadır. Bunun sebebi ısıdan etkilenen ancak hücre duvarı hasar görmeyen *E. coli* O157:H7 hücrelerinin (VBNC) kültürel analizde üreyememesine karşın, qPCR analizinde kullanılan boyaların bu durumdaki hücrelerin duvarından geçememesi nedeniyle qPCR yönteminde bu hücrelerin canlı olarak değerlendirilmesinden de kaynaklanmış olabilir (Tablo 2, 4, 6, 8).

Bu çalışmada ısıl işlem süresinin artması ile birlikte PBS ve süt ortamlarında farklı konsantrasyonlarda EMA ve PMA uygulamaları sonrası yapılan qPCR sayımlarında elde edilen değerler ile kültürel sayımlardan elde edilen değerler arasındaki farkın giderek azaldığı gözlemlendi. Gıda, çevresel ve klinik örneklerde patojen mikroorganizmaların miktarının belirlenmesi, halk sağlığına etkilerini belirlemek için önemlidir. Patojenlerin neden olduğu sağlık riski, özellikle canlı hücreleri tespit etmek açısından güvenilir ve hassas tespit yöntemleri gerektirir. Klasik kültür yöntemleri, canlı hücre sayısını mevcut sayının altında tespit edebilir. Birçok bakteri türü VBNC formuna girebildiğinden kültür ortamında üreyemez, ancak bu tip hücreler metabolik aktivitelerini koruyabildiğinden tekrar virülent bir duruma gelebilmektedir (Colwell ve Grimes, 2000; Banihashemi ve ark., 2012). Bu durumun ısıl işlem süresinin artmasına bağlı olarak VBNC’lerin kademeli şekilde azaldığı, böylelikle canlı ve ölü hücre sayılarının daha güvenilir şekilde tespit edilebildiği şeklinde mütâlaa edildi.

PBS ortamındaki *E coli* O157:H7 süspansiyonuna uygulanan 55 °C’lik ısı sonrası tespit edilen canlı bakteri sayısı, süt ortamındaki uygulama ile karşılaştırıldığında daha düşük bulundu. Bu durum, süt ortamının *E coli* O157:H7’nin belli bir süreye kadar kısmi korunması için bir ortam sağlamış olabileceğini akla getirmektedir.

Bu araştırma ile qPCR tekniğinin gıdalarda patojen bakterilerin varlığı ve özellikle kantitatif analizinde kullanılabileceği, içeriği bilinmeyen bir örnekteki hücre sayısına bağlı elde edilen Ct değerinin standart eğri ile karşılaştırılması suretiyle, örnekteki canlı *E. coli* O157:H7 sayısının tespit edilebildiği kanaati oluşmuştur.

Isıl işlemin uygulandığı gıdalarda canlı mikroorganizma sayısının PMA+qPCR tekniği ile tespitinde güvenilirliğine etki eden bir diğer faktör de uygulanan ısıнын derecesi ve süresidir. Uygulanan ısıl işlemin derecesi ve süresinin artmasına paralel olarak hücre duvarında oluşan hasar da artış göstermekte ve dolayısıyla ölü hücrelere PMA daha rahat nüfuz edebilmektedir (Lee ve Levin, 2009). Öte yandan hücre sayısının fazla olabildiği ortamlarda PMA, ölmüş hücrelerin duvarından geçebildiği ve nüfuz edebildiği halde ortamdaki diğer hücrelerin fotoaktivasyonu kısmen engelleyebildiği, dolayısıyla qPCR ile canlı hücrelerin tespitinde yanlış pozitif sonuçların elde edilebileceği ifade edilmiştir (Wagner ve ark., 2008, Løvdağ ve ark., 2011)

Bu araştırmada, PBS ve Süt ortamında 55°C'lik ısıl işlem uygulamalarında süre arttıkça kültürel sayımda tespit edilen canlı *E. coli* O157:H7 bakteri sayısının giderek azaldığı görüldü. Buna paralel olarak EMA+qPCR ve PMA+qPCR uygulamalarında da tespit edilen canlı bakteri sayısında azalmalar görüldü.

Nocker ve ark. (2006), artan seçicilik açısından PMA'nın EMA'ya göre avantaja sahip olduğunu vurgulamışlardır. Bu araştırmada ısıl işlem süresi arttıkça hücre duvarında oluşan hasar da giderek arttığından, Lee ve Levin (2009)'in ifadelerine paralel olarak, EMA/PMA boyaları ölü hücrelere daha iyi nüfuz ettiğinden dolayı, kültür yöntemiyle yapılan sayım sonuçları ile EMA+qPCR ve PMA+qPCR uygulamaları sonrası yapılan qPCR sayımında elde edilen sonuçların birbirlerine olan yakınlıklarının giderek arttığı görüldü.

Sonuç olarak;

1. Bu çalışma ile Nam ve ark. (2005)'nin da belirttiği üzere EMA veya PMA kullanılarak yapılacak qPCR yöntemi ile canlı bakteri DNA'sının seçici tespiti için uygulama koşullarının, özellikle konsantrasyonların optimize edilmesinin önem taşıdığı ortaya konulmuştur.

2. Bu çalışmada EMA + qPCR ve PMA + qPCR tekniklerinin gıdalarda canlı *E coli* O157:H7'nin tespiti için hızlı, seçici ve hassas tespit yöntemleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.
3. Bilinen sayıda *E coli* O157:H7 canlı hücrelerinden sağlanan DNA dilüsyonları kullanılarak elde edilen standart eğri ile, PBS veya süt gibi bir gıda ortamındaki bakteri miktarının teorik olarak hesaplamasının mümkün olabileceği teyit edildi.
4. Gıda kaynaklı mikrobiyal enfeksiyonlar ve toksikasyonlarda önemli bir yere sahip olan *E coli* O157:H7'nin yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip PCR tekniği ile kısa sürede identifikasyonunun ve canlı hücre miktarlarının EMA + qPCR veya PMA + qPCR teknikleri ile tespitinin mümkün olabileceği ortaya konulmaya çalışıldı.
5. Geleneksel kültür temelli yöntemler ile tespit edilmesi mümkün olamayan ancak varlıkları risk taşıyan ve virülens faktörü üretmeye devam edebilen VBNC'lerin tespiti ve miktar tayini bakımından EMA + qPCR veya PMA + qPCR gibi yeni tekniklerin geliştirilmesinin önemi bir kez daha ortaya konuldu.
6. Örneklerin incelenme amacının, kantitatif analizden ziyade sadece tespit ve identifikasyonu olduğunda kullanılan yöntem sayısı fazladır (Wagner ve ark. 2015). En yaygın olarak kullanılan nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin doğruluğu, nükleik asitlerin doğru kaynaklardan ekstraksiyonun temeline dayanır. Özellikle qPCR yöntemleri ile yapılan analizlerde ölü hücre veya serbest DNA kaynaklı ve mikrobiyal risklerin fazla tahmin edilmesine neden olan yanlış pozitif sonuçların bu tür yöntemlerin handikabı (Smith ve Osborn, 2009) olabileceğinin dikkate alınmasının gerekliliği ortaya konuldu.
7. Sonuç olarak; klasik kültürel yöntemler ile identifikasyonlarda karşılaşılan problemlerin, günümüzde geliştirilmeye devam eden birçok moleküler yöntem ile çözülme arayışları devam etmektedir. Bu teknikler ile gerek toplum sağlığı, gerek endüstriyel ve gerekse de bilimsel açısından önemli olacak gelişmeler sağlanmakla birlikte söz konusu analizlerle hızlı ve doğru sonuç alınacağından, halk sağlığı açısından önemli risk oluşturan *E coli* O157:H7'nin EMA + qPCR veya PMA + qPCR teknikleri ile kantitatif analizlerinde daha güvenilir sonuçların alınması ve

optimizasyonu için yeni kimyasalların geliştirilmesi ve ileri düzey çalışmaların devam etmesi gerektiği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- Abdul-Raouf UM, Ammar MS, Beuchat LR. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from some Egyptian foods. Food Microbiol. 1996;29:423-6.
- Alonso JL, Amorós I, Guy RA 2014. Quantification of viable Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. Parasitol Res. 2014;113:2671-8.
- Amann RI. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkerman ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ, eds. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 1995 pp:1-15.
- Anonim 1. [KJNA30708ENN.en.pdf \(europa.eu\)](https://www.kjuna30708ENN.en.pdf)
- Anonim 2. EMA Dye product protocol (<https://biotium.com/product/ethidium-monoazide-bromide-ema/>) Erişim tarihi: 01.04.2022.
- Anonim 3. PMA Dye product protocol (<https://biotium.com/product/pmaxx-20-mm-in-h2o/>) Erişim tarihi: 01.04.2022.
- Anonim 4. EN ISO 6579:20024, 2004. Microbiology of Based Sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. Sensors, 9: 4407–4445.
- Anonim 5. PMA™ Real-Time PCR Bacterial Viability Kit - E. coli O157:H7 (Z3276) (<https://biotium.com/wp-content/uploads/2014/02/PI-31037-31037-X.pdf>) Erişim tarihi: 01.04.2022.
- Anonim 6. Ethidium Monoazide Bromide (Ethidium Bromide, Monoazide) Product Information (<https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-40015.pdf>) Erişim tarihi: 01.04.2022.
- Anonim 7. Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, #K0722. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0012663_GeneJET_Genomic_DNA_Purification_Kit_UG.pdf Erişim tarihi: 25.10.2021.
- Aras Z. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2011;68(2): 97-104.
- Aruscavage D, Lee K, Miller S, LeJeune JT. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. J Food Sci. 2006;71(8):R89-99.
- Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, Makino Si. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. Res in Microbiol. 2008;159(9-10):709-17.
- Aslan H. Isıl işlem görmüş bazı gıdalarda Escherichia coli O157:H7 ve Salmonella typhimurium'un kantitatif tespitinde kültürel yöntem, Real Time PCR ve PMA-Real Time PCR yöntemlerinin karşılaştırılması. Doktora Tezi. Kayseri; Erciyes Üniv Fen Bil Ens. 2016.

- Aydın A, Sudağıdan M. Gıda Mikrobiyolojisinde Moleküler Biyolojik Tekniklerin Kullanımı ve Tiplendirme Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*. 2016;2(1):1-9.
- Ayrapetyan M, Oliver JD. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:127-33.
- Ayrapetyan M, Williams TC, Baxter R, Oliver JD. Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. *Infect Immun*. 2015;83:4194–203.
- Azkur AK, Aslan ME. Akış sitometri ve veteriner hekimlikteki uygulamaları”, *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*. 2012;7(1): 59-66.
- Bae S and Wuertz S. Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:2940-44.
- Banihashemi A, Van Dyke MI, Huck PM. Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *J Appl Microbiol*. 2012;113(4):863-73.
- Beneduce L, Fiocco D, Spano G. Development of PCR-based molecular tools for detection of emerging food-borne waterborne pathogenic bacteria. In: Méndez-Vilas A, ed. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Microbiology Series No 2. Badajoz: Formatex, 2007; p.569-76.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H-U, Thomas Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol*. 73: 3283-3290.
- Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infect*. 2002;4(4):413-23.
- Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods*. 1999;37:77-86.
- Campbell GA, Mutharasan R. Detection of pathogen *Escherichia coli* O157: H7 using self-excited PZT-glass microcantilevers. *Biosensors Bioelectronics*. 2004;15:75- 82.
- Cawthorn DM, Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol*. 2008;105:1178-85.
- Cenciarini-Borde C, Courtois S, La Scola B. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol*. 2009;4:45-64.
- Centers for Disease Control, Prevention. Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infections associated with consumption of fresh spinach. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2006:55.
- Chapman PA, Cerdan Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin MA. *E.coli* O157 in cattle, and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, *Int J Food Microbiol*. 2001;64: 139-50.

- Chapman PA, Siddons A, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 H7 infections in man. *Epidemiol Infect.* 1993;111: 439-47.
- Chattaway MA, Dallman T, Okeke IN, Wain J. Enterohaggens *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(6): 425-36.
- Colwell R, Grimes DJ. *Non-Culturable Microorganisms in the Environment.* Washington, DC, USA: ASM. 2000.
- Comas-Riu J, Rius N. Flow cytometry applications in the food industry. *J Indust Microbiol Biotech.* 2009;36(8):999-1011.
- Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy, *Int J Food Microbiol.* 2004;96: 67-73.
- Coutard F, Crassous P, Droguet M, Gobin E, Colwell RR, Pommepuy M, Hervio-Heath D. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? *The ISME J.* 2007;1:111-20.
- Crowther J. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In: Walker JM, Rapley R, editors. *Molecular biomethods handbook.* 2nd ed. Totowa, NJ: Human press. 2008; p 657.
- Cudjoe KS. Immunomagnetic Particle-based Techniques: Overview." In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Eds. R.K. Robinson C.A. Batt and P.O. Patel", Academic Press, 3rd Volume, Great Britain, 1999; p.1087-1095.
- Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Sci Engineer J.* 2012;2 (1): 53-62.
- Darcan C. Bakterilerde Yaşam Stratejisi Olarak Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum ve Önemi. *Düzce Üniv Bilim Teknol Derg.* 2018;6:108-22.
- Depince-Berger AE, Aanei C, Iobagiu C, Jeraibya M, Lambert C. New tools in cytometry. *Morphologie*, 2016;100(331):199-209.
- Du M, Chen J, Zhang X, Li A, Li Y, Wang Y. Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2007;73(4):1349-54.
- Elizaquível P, Gabaldón JA, Aznar R. 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* 2011;22:158-64.
- Elizaquível P, Sánchez G, Aznar R. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables after inactivation by essential oils. *Int J Food Microbiol.* 2012a;159: 115-21.
- Elizaquível P, Sanchez G, Aznar R. 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* 2012b;25:704-08.
- Elizaquível P, Sanchez G, Selma MV, Aznar R. Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiol.* 2012c;30:316–320.

- FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), Chapter 4 and 4A, updated 07.2020; Available from (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>). Erişim Tarihi: Eylül 2022.
- Feng P. *Escherichia coli*. In: Labbe R, Garcia S, editors. Guide to foodborne pathogens. New York, NY: John Wiley and Sons. 2001; p 143-62.
- Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM. Long term renal outcome of childhood haemolytic uraemic syndrome. *British Medical J*. 1991;303(6801):489-92.
- Flekna G, Štefanič P, Wagner M, Smulders FJM, Možina SS, Hein I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol*. 2007;158(5):405-12.
- Fratamico PM, Bayles DO. Molecular approaches for detection, identification, and analysis of foodborne pathogens. In: Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL, editors. Foodborne pathogens. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2005; pp 1-13.
- Gauthier MJ. Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In: Colwell RR (ed). Nonculturable Microorganisms in the Environment. ASM Press: Washington, 2000; pp 87–112.
- Gorski L, Csordas A. Molecular detection: principles and methods. In: Liu D, editor. Molecular detection of foodborne pathogens. Boca Raton, FL: CRC Press. 2009; pp 1-15.
- Halkman AK. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Bölüm 7. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara. 2005
- Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, Segawa Y, Takatori K, Kojima T, Ikeda M. Sensitive and rapid detection of vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J Medical Microbiol*. 2007;56(3):398-406.
- Hazen TC, Rocha AM, Techtmann SM. Advances in monitoring environmental microbes. *Curr Opin Biotech*. 2013;24:526-33.
- Heise J, Nega M, Alawi M and Wagner D. Propidium monoazide treatment to distinguish between live and dead methanogens in pure cultures and environmental samples. *J Microbiol Methods*. 2016;121: 11-23.
- Higgins MJ, Chen YC, Murthy SN, Hendrickson D, Farrel J, Schafer P. Reactivation and growth of non-culturable indicator bacteria in anaerobically digested biosolids after centrifuge dewatering. *Water Res*. 2007;41:665-73.
- Hilborn ED, Jonathan H, Mermin H, Patricia A, Mshar PA, James L, ve ark. A multistate outbreak *Escherichia coli* O157 H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Internal Med*. 1999; 59:1758-64.
- Hill WE. DNA hybridization method for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* in human isolates and its possible application to food samples. *J Food Safety*. 1981;3:233-47.

- Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint C P. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J Microbiol Methods*. 2003;55:585-97.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*. 1998;180(18):4765-74.
- Jay JM. Foodborne gastroenteritis caused by *Escherichia coli*. In: Jay JM, editor. *Modern food microbiology*. 6th ed. Gaithersburg, MD: Aspen Publications. p 531- 43; 2000.
- Kanev MO, Muranlı FDG. Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bil Der*. 2016;20(1): 33-38.
- Karmali MA. Infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Appl Biochem Biotech - Part B Molecular Biotech*. 2004;26(2):117-22.
- Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 2003;53:175-83.
- Kesmen Z, Aslan H. Isıl İşlem Görmüş Sütlerde *Salmonella Typhimurium* Canlı Hücrelerinin PMA/Real-Time PCR ile Belirlenmesi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Tek Derg*. 2017;5(5): 518-24.
- Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Hall GS, Bauer TW. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(5):633-8.
- Kralik P, Nocker A, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *Int J of Food Microbiol*. 2010;141(SUPPL.):S80-6.
- Kramer, M., Obermajer, N., Bogovic, M.B., Rogelj, I., Kmetec, V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl and Envir Microbiol*. 2009;84:1137–47.
- Lazcka O, Del Campo FJ, Muñoz FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*. 2007;22:1205-17.
- Lee JL, Levin RE. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *J Microbiol Methods*. 2009;76: 93-96.
- Lee, J.L., Levin, R.E. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. 2006;67(3):456–62.
- Lemarchand K, Masson L, Brousseau R. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Crit Rev Microbiol*. 2004;30:145–72.
- Levin RE. Molecular techniques for detecting, quantifying, and subspecies typing of foodborne pathogenic bacteria. In: Levin RE, editor. *Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press, p 1-56; 2009.

- Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* 1987;155(3):377-89.
- Li F, Li F, Chen B, Zhou B, Yu P, Yu S, Lai W, Xu H. Sextuplex PCR combined with immunomagnetic separation and PMA treatment for rapid detection and specific identification of viable *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovars Paratyphi B, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Enteritidis in raw meat. *Food Control.* 2017;73:587-94.
- Liang N, Dong J, Luo L, Li Y. Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR. *J Food Sci.* 2011;76:234-37.
- Liu Y. Detection of Viable *Escherichia coli* O157:H7 In Food By Propidium Monoazide Real-Time Polymerase Chain Reaction. The Faculty of the Graduate School At the University of Missouri, Master Thesis; 2013.
- Liu Y, Mustapha A. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. *Int J Food Sci.* 2014;170: 48-54.
- Løvdal T, Hovda MB, Björblom B, Møller SG. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J Microbiol Methods.* 2011;85: 164-69.
- MacKay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiol and Infection.* 2004;10:190–212.
- McKillip JL, Drake, MA. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *Journal of Food Protec.* 2004;67(4):823–32.
- Minami JI, Soejima T, Yaeshima T, Iwatsuki K. Direct real-time PCR with ethidium monoazide: A method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *J Food Prot.* 2012;75(9):1572-79.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1986;51(1):263-73.
- Murphy RY, Martin EM, Duncan LK, Beard BL, Marcy JA. Thermal process validation for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in ground turkey and beef products. *J Food Prot.* 2004;67(7):1394-402.
- Nam HM, Srinivasan V, Gillespie BE, Murinda SE, Oliver SP. Application of SYBR Green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int J Food Microbiol.* 2005;102:161-71.
- Nocker A, Camper AK. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):1997-04.
- Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006;67:310-20.

- Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK, Brousseau R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods*. 2009;76: 253–61.
- Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-Nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003;34:804-13.
- Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34:415-25.
- Özbaş ZY. Gıda mikrobiyolojisiinde immunomanyetik ayırma sistemleri. *Gıda*. 2002;27(3):193-00.
- Pan Y, Breidt F Jr. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:8028–31.
- Qi Y, Dentel SK, Herson DS. Increases in fecal coliform bacteria resulting from centrifugal dewatering of digested biosolids. *Water Res*. 2007;41:571-80.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(4):603-9.
- Rasmussen MA, Casey TA. Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Critical Rev Microbiol*. 2001;27(2):57-73.
- Rawsthorne H, Dock CN, Jaykus LA. PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:2936-39.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England J Medicine*. 1983;308(12):681-85.
- Rivers B, Steck TR. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urological Res*. 2001;29(1):60-66.
- Rompere A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods*. 2002;49:31–54.
- Roszak DB, Colwell RR. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev*. 1987;51(3):365-79.
- Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, Holck AL. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:1018–24.
- Safarik I, Safarikova M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatography B*. 1999;722:33-53.
- Safarik I, Safarikova M, Forsythe SJ. The application of magnetic separations in applied microbiology. *J Appl Bacteriol*. 1995;78:575-78.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Sci.* 1985;230(4732):1350-54.
- Sánchez G, Elizaquível P, Aznar R. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food Environ Virol.* 2012;4:21-25.
- SAS 2005. SAS/STAT Software. Hangen and Enhanced. SAS, Inst. Inc., USA.
- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology.* 2008;23(10):1749-60.
- Settingington EB, Alocilja EC. Electrochemical Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Magnetically Extracted Bacterial Pathogens Electrochemical Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Magnetically Extracted Bacterial Pathogens. *Biosensors.* 2012;2:15-31.
- Siegler RL, Milligan MK, Burningham TH, Christofferson RD, Chang SY, Jorde LB. Long-term outcome and prognostic indicators in the hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatrics.* 1991;118(2):195-00.
- Sizemore RK, Caldwell JJ, Kendrick AS. Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(7):2245-47.
- Slimani S, Robynsa A, Jarrauda S, Molmeret M, Dusserreb E, Mazured C, Facond JP, Linaa G, Etiennea J, Ginevra C. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by Qpcr. *J Microbiol Methods.* 2012;88(2):319-21.
- Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR) based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;67:6-20
- Su C, Brandt LJ. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Annals Internal Medicine.* 1995;123(9):698-14.
- Swaminathan B, Feng P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annual Rev Microbiol.* 1994;48:401-26.
- Takahashi H, Gao Y, Miya S, Kuda T, Kimura B. Discrimination of live and dead cells of *Escherichia coli* using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment. *Food Control.* 2017;71:79-82.
- Tantikachornkiat M, Sakakibara S, Neuner M, Durall DM. The use of propidium monoazide in conjunction with qPCR and Illumina sequencing to identify and quantify live yeasts and bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2016;234:53-59.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005;365(9464):1073-86.
- Taskin B. Novel Approaches for Monitoring Viable Pathogenic Microorganisms in Environmental Samples. *YYÜ Tar Bil Derg.* 2017;27(2): 285-91.
- Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE. Limitations of using propidium monoazide with qPCR to discriminate between live and dead *Legionella* in biofilm samples. *Microbiol Insights.* 2014;7:15-24 .

- Telli AE. *Vibrio parahaemolyticus*'un Deniz Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) Farklı Muhafaza Sıcaklıklarında Yaşamının Klasik Kültürel, qPCR ve Real-Time LAMP Metotları İle İncelenmesi. Selçuk Ü Sağlık Bil Ens Doktora Tezi; 2016.
- Tokarskyy O, Marshall DL. Immunosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 - Perspectives for use in the meat processing industry. *Food Microbiol.* 2008;25(1):1-12.
- Türk Standartları Enstitüsü (TSE). Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi - *Escherichia coli* O157'nin Tespiti için Yatay Yöntem. TS EN ISO 16654. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara; 2003.
- Türk Standartları Enstitüsü (TSE). Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi - *Escherichia coli* O157'nin Tespiti için Yatay Yöntem (ISO 16654:2001/Amd 1:2017) TS EN ISO 16654/A1. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara; 2017.
- Turgut N. Gıdalarda *Escherichia Coli* O157:H7 Yaygınlığının Riskleri ve Kontrolü. Adnan Menderes Ü Sağlık Bil Fak Derg. 2021;5(1):101-14.
- Tutar E, Köksalan E, Akyol İ. Gıdalarda bulunan mikrobiyal patojenlerin karakterizasyonunda Real Time PCR teknolojisi. KSÜ Doğa Bil Derg. 2015;18(4):26-39.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). Mac Farland Baryum Sülfat Bulanıklık Standardı hazırlanması. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/zoonotik-vektorel-hastaliklar-db/zoonotik-hastaliklar/4-Sitma/6-Rehbler/Sitma-Mikrobiyolojik_tani.pdf; 2015
- USDA/FSIS. Microbiological Testing Program for *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Available from (http://www.fsis.usda.gov/science/ground_beef_e.coli_testing_results/index.asp). Accessed October 1, 2012; 2012.
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Methods.* 2000;243:191-10.
- Vesper S, McKinstry C, Hartmann C, Neace M, Yoder S, Vesper A Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J Microbiol Methods.* 2008;72:180-84.
- Wagner AO, Malin C, Knapp BA, Illmer P. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:2537-39.
- Wagner AO, Praeg N, Reitschuler C, Illmer P. Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. *Appl Soil Ecol.* 2015;93:56-64
- Wang L, Li Y, Mustapha A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multi-plex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Prot.* 2007;70(6):1366–72.
- Wang L, Li Y, Mustapha A. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2009;107(5):1719–28.

Weagant SD, Bryant JL, Bark DH. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J Food Prot.* 1994;57(7):629-31.

Won JY, Min J, Park JH. Bacteria adsorption on hydrophilic surfaces for the sensitive detection of pathogenic bacteria using a single tube chamber system. *Biosensors Bioelectronics.* 2010;26(4):1763-67.

Yelboğa E, Karagüler NG. Moleküler biyolojik yöntemler. Aran N, editör. *Gıda Biyoteknolojisi*. 2. baskı Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık; p. 50-69; 2012.

Zilelidou EA, Tsourou V, Poimenidou S, Loukou A. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157 H7 and *Listeria monocytogenes* during preparation of fresh-cut salads: Impact of cutting and shredding practices. *Food Microbiol.* 2015;45:254-265.

EKLER

Ek 1. Tez Orijinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



G19 –TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Sütte <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Canlı Hücrelerinin Belirlenmesinde Kültür Yöntemi ile Real-Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	10	50	18	79
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih		Benzerlik oranı %
Turnitin		27 / 12 / 2022		%5
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç,				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. İsmail Hakkı EKİN				
Öğrencinin Adı Soyadı	İsmail Hakkı EKİN			
Anabilim Dalı	Besin Hijyeni ve Teknolojisi			
Öğrenci No	11930220005			
Programı	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora			
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR		ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR		
Prof. Dr. Emrullah SAĞUN		(Unvan, Ad Soyad, İmza)		