



Isıl İşlem Görmüş Sütlerde *Salmonella Typhimurium* Canlı Hücrelerinin PMA/Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Zülal Kesmen^{1*}, Hakiye Aslan²

¹Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 38039 Kayseri, Türkiye

²Bingöl Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 24 Kasım 2017
Kabul 27 Aralık 2017

Anahtar Kelimeler:

Real-time PCR
Propidium monoazide
Canlı-ölü bakteri ayrımı
S. Typhimurium
Süt

*Sorumlu Yazar:

E-mail: zkesmen@erciyes.edu.tr

ÖZET

Gıdaların üretimi sırasında uygulanan farklı teknolojik işlemler bakteriler üzerinde öldürücü etki göstermesine rağmen, bu bakterilere ait DNA'lar belirli bir süre varlıklarını korudukları için real-time PCR tekniği ile tespit edildiklerinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedirler. Real-time PCR tekniğinin bu eksikliğini gidermek amacıyla son yıllarda DNA ekstraksiyonu öncesinde, ölü hücrelere ait DNA'ların Propidium Monoazide (PMA) ile muamele edilerek ortamdaki uzaklaştırılmasına dayanan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada ise, ısıl işlem uygulanmış süt örneklerinde, *S. Typhimurium*'un canlı hücrelerinin tespiti için real-time PCR yöntemi, PMA uygulaması ile kombine edilmiştir. Bu amaçla *S. Typhimurium* ile inokule edilen süt örneklerine farklı sıcaklık (60, 65, 70 ve 75°C) ve sürelerde (15, 60, 300 ve 900 sn) ısıl işlem uygulanmış ve canlı bakteri sayısı, direkt real-time PCR, PMA/real-time PCR ve klasik kültüre alma yöntemleriyle karşılaştırılmalı olarak belirlenmiştir. Sonuçta test edilen tüm sıcaklık dereceleri ve sürelerinde PMA/real-time PCR yönteminin direkt real-time PCR tekniğinin aksine ölü hücrelerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları belli bir dereceye kadar önlediği ancak kültürel sayım sonuçlarına kıyasla daha yüksek sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla PMA/real-time PCR yöntemi ile elde edilen yüksek pozitif sonuçları elemeye etmek için, PMA uygulamasına ait koşulların optimizasyonuna yönelik daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(5): 518-524, 2017

Determination of Viable *Salmonella Typhimurium* Cells in Heat Treated Milk By PMA/Real-Time PCR Method

ARTICLE INFO

Research Article

Received 24 November 2016
Accepted 27 December 2016

Keywords:

Real-time PCR
Propidium monoazide
Live-dead bacteria differentiation
S. Typhimurium
Milk

*Corresponding Author:

E-mail: zkesmen@erciyes.edu.tr

ABSTRACT

Applying different technological processes during the production of food has a lethal effect on the bacteria but DNA of these bacterial strains may cause false positive results when detected by real time PCR technique because they preserve their existence for a certain period of time. To overcome this shortcoming of the real time PCR technique, a new method has been developed in recent years, based on the removal of dead cell DNA from the medium by treatment with Propidium Monoazide (PMA) before DNA extraction. In this study, real-time PCR method was combined with PMA application for the detection of live cells of *Salmonella Typhimurium* in heat treated milk samples. For this purpose, milk samples inoculated with *S. Typhimurium* were heat treated at different temperatures (60, 65, 70 and 75°C) and times (15, 60, 300, 900 sec) and number of live bacteria was determined comparatively by direct real-time PCR, PMA/real-time PCR and conventional cultural method. As a result, unlike the direct real time PCR technique, PMA/real-time PCR method prevents to a certain extent of false positive results from dead cells at all tested temperatures and times but higher results were obtained from PMA/real-time PCR method when compared to conventional cultural results. Therefore, further studies should be carried out to optimize the conditions of the PMA application in order to eliminate the high positive results detected by the PMA / real-time PCR method.

Giriş

Gıda kaynaklı bakteriyel bir patojen olan *Salmonella*'nın neden olduğu enfeksiyonlar, dünya genelinde halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Dünyada her yıl, 155.000'i ölümlerle sonuçlanan 93,8 milyon *Salmonella* gastroenterit vakası görülmekte ve bunların %80,3'ünün de gıda kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Majowicz ve ark., 2010). *Salmonella*'nın 2500'ün üzerinde serotipi belirlenmiştir (Andrews-Polymeris ve ark., 2010). Bunlar içerisinde nontyphoidal gastroenterit etkeni olan *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ve *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) en yaygın serotiplerdir (Lee ve ark., 2015).

Salmonella'nın birincil yaşam ortamı insan, çiftlik hayvanları ve diğer memeliler ile kuşlar ve böceklerin bağırsaklarıdır. Bu nedenle *Salmonella* enfeksiyonlarına neden olan gıdalar içerisinde hayvansal kaynaklı ürünler ilk sıralarda yer almaktadır (Wang ve ark., 2016). Et, süt ve yumurta ile bunlardan hazırlanan yeterince ısı işlem görmemiş ürünler, *Salmonella* açısından risk taşıyan gıdalardır. Gıda zincirinin her aşamasında *Salmonella* kontaminasyonunun kontrolü ve güvenli gıda üretiminin sağlanması için serotip seviyesinde tanımlama yapabilen hızlı, hassas ve spesifik analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *Salmonella* tayininde kullanılan klasik kültürel yöntemler, vakit alıcı ve kültüre alınmayan hücrelerin tespitinde başarısızdır (Jiang ve ark., 2013). Son yıllarda patojen mikroorganizmaların tespitinde klasik kültürel yöntemlere alternatif olarak nükleik asitlerin analizine dayalı yeni teknikler geliştirilmiştir (Byrne ve ark., 2009; Velusamy ve ark., 2010; Dwivedi ve Jaykus, 2011). Bu teknikler içerisinde hızlı, hassasiyeti ve spesifitesinin yüksek olmasının yanında kantitatif tayine de imkan vermesi gibi avantajları nedeniyle real-time PCR tekniği öne çıkmaktadır (McGuinness ve ark., 2009). Gıdalarda *Salmonella*'nın tespiti için kullanılan referans kültürel sayım yöntemi (Anonim 2004) zor ve uzun sürede (5-6 gün) sonuçlandığı için, gıda kaynaklı patojenlerin tespitine yönelik olarak yapılan real-time PCR çalışmalarında *Salmonella* üzerinde en yoğun çalışılan mikroorganizmalardan biri olmuştur (Hein ve ark., 2006; McCabe ve ark., 2011). *Salmonella* spp.'nin real-time PCR ile tespitine yönelik olarak yapılan birçok çalışmada türe spesifik *invA* gen bölgesi hedef alınmış (Li ve ark., 2016) ve deteksiyon limitini düşürmek için (<10 kob/ml) 16-48 saatlik bir zenginleştirme işlemi tavsiye edilmiştir (Nam ve ark., 2005; McCabe ve ark., 2011; Malorny ve ark., 2013).

Gıdaların hazırlanması sırasında uygulanan bazı teknolojik işlemler, mevcut mikroorganizmaların ölmesini sağlarken bunların DNA'ları üzerinde etkisiz kalabilmektedir. Dolayısıyla hücre canlılığını kaybettikten sonra bile DNA'nın ortamdaki varlığını devam ettirmesi, yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Yanlış pozitif sonuçları, minimize etmek amacıyla yapılan araştırmalar, daha çok ortamdaki ölü hücrelere ait kalıp DNA'nın ekstraksiyondan önce elemine edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Geri dönüşümsüz olarak hasar görmüş hücreler ile canlı hücreleri ayırmada en önemli kriterlerden biri hücre membranının bütünlüğüdür. Konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda etidium

monoazidenin (EMA) hasarlı hücrelere selektif olarak girdiği ve DNA'ya fotokimyasal olarak bağlanarak ölü hücrelere ait DNA'dan ileri gelen PCR amplifikasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Nogva ve ark., 2003). Ancak EMA, seçiciliğinin yetersiz ve uygulanabildiği mikroorganizma türlerinin de sınırlı olması nedeniyle yerini alternatif bir kimyasal olan propidium monoazide (PMA) bırakmıştır. PMA'da ışığa maruz kaldığında DNA'ya çapraz bağlanmayı sağlayan bir azide grup mevcut olup EMA ile kıyaslandığında, daha geniş bir aralıktaki hücre tiplerinde başarılı sonuç verdiği ve seçiciliğinin de oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Nocker ve ark., 2006). Nocker ve ark. (2006), canlı-ölü hücre karışımlarında PMA'nın EMA'ya kıyasla hem Gram-negatif ve hem de Gram-pozitif bakterilerin canlı hücrelerine karşı daha geçirimsiz olduğunu saptamıştır. Bu durum, canlı hücrelere ait DNA'ların seçici amplifikasyonunda PMA'nın EMA'dan daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Cawthorn ve Witthuhn 2008). Real-time PCR tekniği ile birleştirilen PMA uygulamasının gıda kaynaklı patojenlere ait canlı hücrelerin tespitinde başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Pan ve Breidt 2007; Nocker ve ark., 2009; Josefsen ve ark., 2010; Elizaquível ve ark., 2012).

Sonuç olarak son yıllarda, ön zenginleştirme ile kombine edilen real-time PCR yöntemi, *Salmonella* spp.'nin hızlı, hassas ve spesifik olarak tespiti için tavsiye edilen bir yaklaşımdır. Ancak gıdaların üretimi sırasında uygulanan farklı teknolojik işlemler bakteri üzerinde öldürücü etki göstermesine rağmen, DNA'sı belirli bir süre varlığını koruduğu için yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedirler. Canlı-ölü hücre ayırımı için DNA ekstraksiyonundan önce PMA muamelesi hızlı ve basit bir ön işlem olarak görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada da, gıda kaynaklı en yaygın gastroenterit etkenlerinden olan *S. Typhimurium*'un real-time PCR tekniği ile tespitinde basit bir ön işlem olarak PMA tekniğinin uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada, *S. Typhimurium*'un real-time PCR tekniği ile tespitinde, canlı/ölü hücrelerin ayırımı için PMA muamelesinin bir ön işlem olarak uygulanabilirliği araştırılmıştır. Uygulama ortamı olarak hayvansal kaynaklı bir ürün olan süt belirlenmiştir. Canlı/ölü hücre karışımları ise, *S. Typhimurium* ile kontamine edilen UHT süt ortamına farklı sıcaklık ve süreler ısı işlem uygulanarak elde edilmiştir.

İnokulasyon Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada referans suş olarak kullanılan *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu inokulasyon öncesi -80°C'de muhafaza edilmiştir. Luria-Bertani (LB) broth içerisinde 37°C ve 180 rpm'e ayarlı çalkalamalı inkübatörde, 18-24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen bakteri kültürü 7000 x g'de 5 dak. santrifüj edildikten sonra bakteri pelleti PBS (0,01 M pH 7,2) ile yıkanmış ve santrifüj yapılarak PBS uzaklaştırılmıştır. Cam tüpler içerisindeki bakteri pelletinin türbiditesi ölçülerek, MacFarland ile 0,5 değeri elde edilinceye kadar

%0,85'lik steril fizyolojik tuzlu su (FTS) eklenmiştir. Daha sonra FTS içerisinde bakterinin seri dilüsyonları hazırlanarak inokulasyon amacıyla kullanılmıştır. Aynı zamanda hazırlanan dilüsyonlardan Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) (Merck, Almanya) agara ekim yapılarak bakteri sayısı tespit edilmiştir.

Isıl İşlem Uygulaması

S. Typhimurium'un seri dilüsyonlarından, 50 ml'lik kavanozlar içerisindeki UHT süt örneklerinin bakteri konsantrasyonları 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ve 10^7 kob/ml olacak şekilde 6 farklı seviyede inokulasyon yapılmıştır. Daha sonra kavanozlar su banyosu içerisine yerleştirilerek 4 farklı sıcaklık (60, 65, 70 ve 75°C) ve 4 farklı sürede (15, 60, 300 ve 900 sn) ısı işlem uygulanmıştır. Isıl işlem sonrası, örneklerdeki canlı mikroorganizma sayısını belirlemek amacıyla, XLD agara dökme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Isıl işlem uygulanmamış örnekler, (0 sn) ise kontrol örnekleri olarak değerlendirilmiştir.

PMA Uygulaması

1 mg PMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5 [3-(diethylmethylammonio) propyl]-6phenyl dichloride) (Biotium, Inc. Hayward, ABD), %20 dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, Almanya) ile çözündürülerek 20 mM konsantrasyonda stok PMA çözelti hazırlanmıştır. 1,5 ml'lik şeffaf eppendorf tüplerine süt örneklerinden 500 µl'lik alınarak üzerine 0,625 µl PMA (20 mM) ilave edilip karıştırılmıştır. Böylece her bir tüpteki PMA konsantrasyonu 25µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 10 dakika (sık sık karıştırılmak suretiyle) bekletilmiştir. Bu işlemden sonra tüpler termal olarak stabil ve sabit bir ışık şiddeti sağlayan LED lambaya (Led-Active-Blue, Applied Science, İspanya) yerleştirilmiş ve 15 dakika süreyle 2 kez fotoaktivasyon uygulanmıştır (Liu ve Mustapha, 2014).

DNA İzolasyonu

PMA uygulanan örneklerden direkt DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla eppendorf tüplerinin içerisindeki örnekler 10.000g x10 dakika santrifüj (Hettich, Universal 320R, Almanya) edilerek üst faz atılmıştır. Tüpte kalan pelletin üzerine 250 µl liziz çözeltisi (200mM Tris-HCl (pH 8,5), 25mM EDTA (pH 8,0), 250mM NaCl, %2 SDS) ve 20 µl Proteinaz K (20mg/ml) (Sigma, Almanya) eklenip 56°C'ye ayarlı su banyosunda, yaklaşık 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra proteinleri çöktürmek amacıyla 100 µl sodyum asetat (5M, pH 5,2) ilave edilerek -80°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığında çözündürülen tüpler, 10.000g x 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz temiz tüplere alınmış ve sırasıyla kloroform:isoamil alkol (24:1, Merck, Almanya) ile yıkama ve soğuk isopropanol (Merck, Almanya) ile çöktürme işlemleri uygulanmıştır. DNA pelleti %70'lik etanol (Merck, Almanya) ile yıkayıp kurutulduktan sonra 25 µl TE buffer ile sulandırılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Real-Time PCR Analizi

Real-time PCR analizi *S. Typhimurium*'un *invA* genine spesifik primer ve TaqMan prob kullanılarak (Hein ve ark., 2006) gerçekleştirilmiştir. Toplam 20 µl

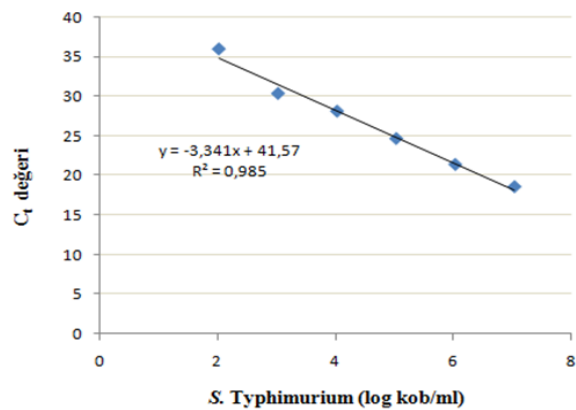
toplam reaksiyon hacmi için, 5 µl ticari real-time PCR karışımı (2X FastStart universal probe master mix, Roche, Almanya), 50-100 ng kalıp DNA (1 µl), 0,2 µM ileri (5'-GTGAAATAATCGCCACGTCGGGCAA-3') ve geri primerlerden (5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3') her biri ve 0,1 µM TaqMan probe (5'-Texas Red-TTATTGGCGATAGCCTGGCGGTGGGTTTTGTTG-BHQ1-3') kullanılmıştır. Termal döngü koşulları (Rotor-Gene Q, Quiagen, Almanya); 94°C'de 10 dk. ilk denatürasyonun ardından, 40 döngü süresince 94°C'de 20 s ve 60°C'de 1 dk. olarak uygulanmıştır. Kantitatif tayin için standart eğrinin oluşturulmasında, *S. Typhimurium*'un seri dilüsyonlarına (10^2 - 10^7 kob/ml) ait DNA'lar kullanılmış ve her bir dilüsyon seviyesine karşılık gelen Ct (cycle threshold) değeri tespit edilmiştir. Standart eğrinin eğimi (s) kullanılarak $E=10^{(-1/s)}$ eşitliği ile real-time PCR'in etkinliği belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler

Bu çalışma kapsamında, ısı işlem sonrası ortamda canlı kalan mikroorganizmaların tespitinde kültürel yöntem ile PMA/real-time PCR ve direkt real-time PCR yöntemleri arasındaki korelasyon Medcalc 14 (Acaciaaan 22, B-8400 Ostend, Belçika) istatistiksel analiz programı kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, IBM SPSS Statistics 20 (SPSS, Chicago, IL, ABD) istatistik programı ile Duncan testi yapılarak grupların ortalamaları karşılaştırılmıştır. Veriler %95 güven düzeyinde incelenmiş olup p değeri 0.05 ten küçük anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

S. Typhimurium ile 10^2 - 10^7 kob/ml seviyesinde kontamine edilen süt örneklerinden XLD agara yapılan ekimlerde $2,02 \pm 0,01$ - $7,02 \pm 0,01$ log kob/ml arasında değişen sayılarda bakterinin geliştiği gözlenmiştir. Aynı örneklerden DNA izolasyonu yapılarak real-time PCR ile her bir inokulasyon seviyesine karşılık gelen Ct değerleri belirlenmiş ve bu değerler kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 1). Bu eğriden *invA* genini hedef alan real-time PCR yönteminin etkinliği, %99 ve R^2 değeri ise 0,985 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca süt ortamına inokule edilen *S. Typhimurium* için real-time PCR yönteminin deteksiyon limiti 10^2 kob/ml olarak belirlenmiştir.



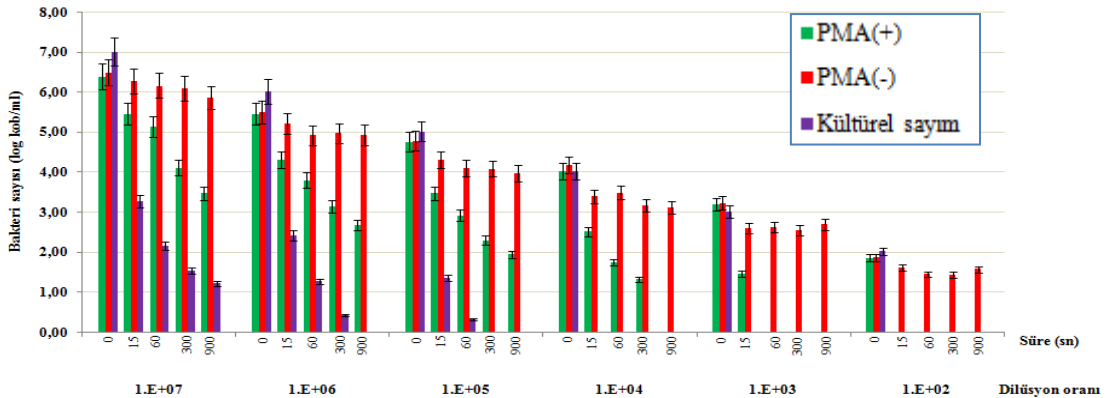
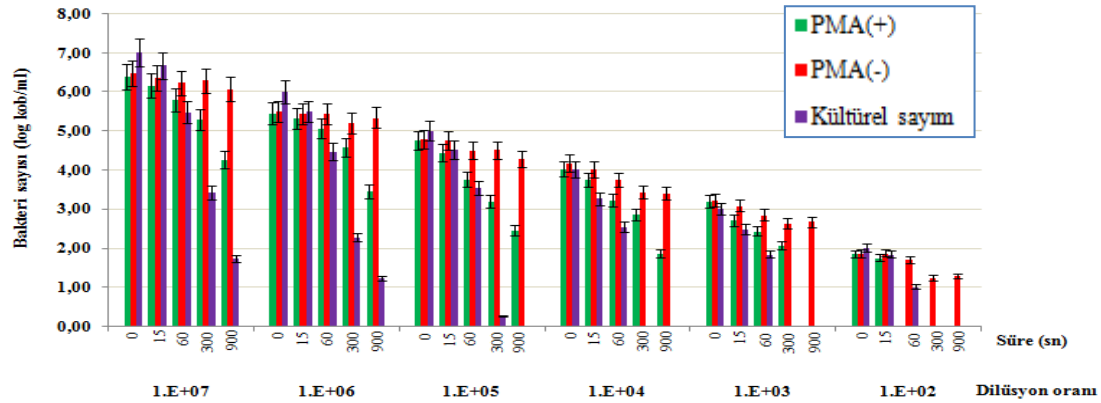
Şekil 1 Süt örneklerinde *S. Typhimurium*'un inokulasyon seviyelerine karşılık tespit edilen Ct değerlerine göre çizilen standart eğri

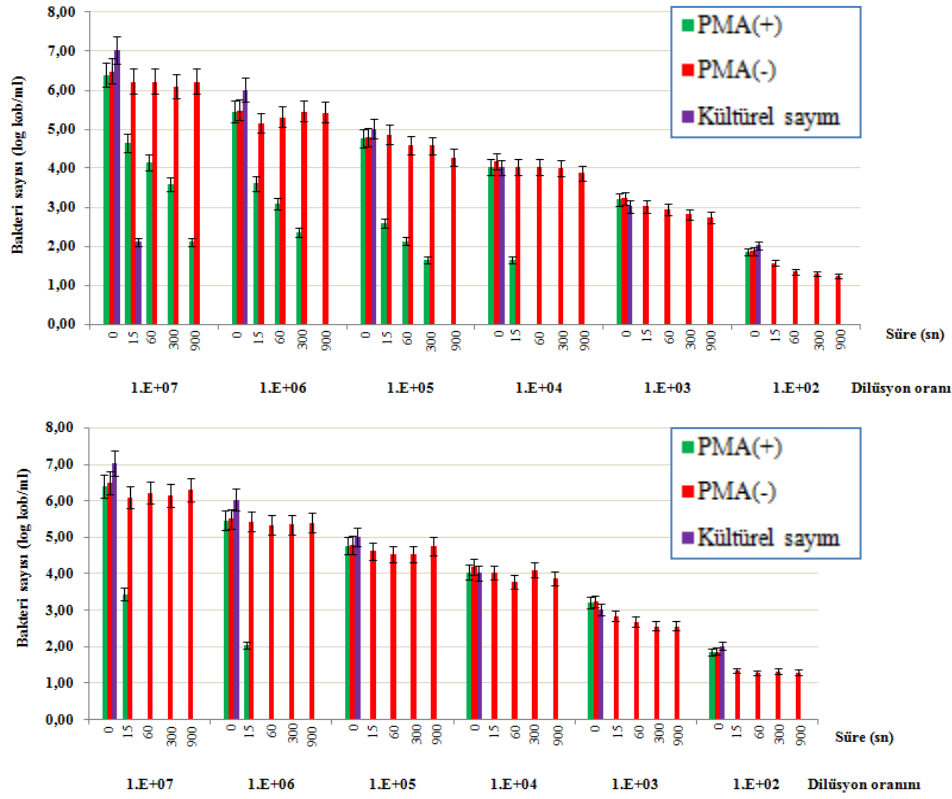
S.Typhimurium ile yaklaşık 7 log kob/ml seviyesinde kontamine edilen süt örneklerinde real-time PCR yönteminin deteksiyon limiti, 2,02 log kob/ml olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, Liang ve ark. (2011), *S. Typhimurium*'un peptonlu su içerisinde hazırlanan saf kültürü için real-time PCR yönteminin deteksiyon limitini 2 log kob/ml olarak tespit etmiştir. *S.Typhimurium* ile 8 log kob/g seviyesinde kontamine ettikleri marul örneklerinde ise, deteksiyon limitini 3 log kob/g olarak saptamışlardır. Gıda kaynaklı patojen bakterilerin real-time PCR ile tespitinde, real-time PCR yönteminin, ön zenginleştirme, filtrasyon veya immuno magnetik ayırma (IMS) işlemi gibi bir ön işleme ile birlikte uygulanmasına bağlı olarak deteksiyon limitinin daha düşük seviyelere indirilebilebileceği bildirilmiştir. Örneğin Hein ve ark. (2006), tarafından yapılan bir çalışmada, *Salmonella* spp. ile kontamine edilen gıdalarda 16 saatlik bir zenginleştirme işleminden sonra real-time PCR TaqMan probe yöntemi ile deteksiyon limiti alabalık ve kıyma et örneklerinde 2,5 kob/25g, tavuk etinde 5 kob/25g, sütte ise 5 kob/25 ml olarak tespit edilmiştir. Süt ve ürünlerinde SYBR Green I metodu kullanarak *Salmonella* spp.'nin tespitine yönelik yapılan bir çalışmada ise, *Salmonella* türlerine spesifik invA gen bölgesi hedef alınmış ve 18 saatlik bir zenginleştirme işleminden sonra deteksiyon limiti <10 kob/ml olarak tespit edilmiştir (Nam ve ark., 2005).

S.Typhimurium ile kontamine edildikten sonra farklı sıcaklık ve sürelerde ısıtılarak uygulanan süt örneklerinde bakteri sayısı, direkt kültürel sayım, real-time PCR ve PMA-real-time PCR yöntemleriyle tespit edilmiştir. 60°C'de ısıtılarak uygulanan süt örneklerinin tüm inokulasyon seviyeleri dikkate alındığında, ısıtılma

süresi uzadıkça bakteri sayısının da azaldığı, 15, 30, 60 ve 900 sn'lik ısıtılma uygulamalarının canlı bakteri sayısında, yaklaşık olarak sırasıyla 0,5, 1,5, 3,5 ve 5 log kob/ml'lik bir düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir. 15 ve 30 sn ısıtılma uygulanmış örneklerin, direkt kültürel sayım ve PMA/real-time PCR yöntemleri ile tespit edilen bakteri sayıları arasında önemli bir farklılık bulunmazken (<1 log kob/ml), 60 sn ve üzerinde ısıtılma işlemi uygulanmış örneklerde, PMA/real-time PCR yöntemi ile tespit edilen canlı bakteri sayısının, kültürel sayım sonuçlarına kıyasla en az 2 log kob/ml daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 2A).

Süt örneklerinin tüm inokulasyon seviyelerinde, 65°C'de 15-900 sn arasında değişen sürelerde ısıtılma uygulaması, canlı bakteri sayısında yaklaşık olarak 3,5-6 log kob/ml'lik bir azalmaya neden olmuştur. 15 sn ısıtılma uygulanmış örneklerin $\leq 10^4$ kob/ml'lik inokulasyon seviyelerinden yapılan ekimlerde, agar plaklarda koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Yine 60 ve 300 sn ısıtılma uygulanmış örneklerin $\leq 10^5$ kob/ml ve 900 sn ısıtılma uygulanmış örneklerin ise, $\leq 10^6$ kob/ml'lik inokulasyon seviyelerinden yapılan ekimlerde koloni oluşmadığı belirlenmiştir. PMA/real-time PCR yönteminde ise, canlı bakteri tespit edilmeyen inokulasyon seviyesi, 15 sn'lik ısıtılma uygulanan örnekler için $\leq 10^2$ kob/ml, 60-300 sn uygulanmış örnekler için $\leq 10^3$ kob/ml ve 900 sn uygulanmış örnekler için de $\leq 10^4$ kob/ml olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla 65°C'de ısıtılma uygulanmış tüm örneklerde, PMA/real-time PCR yöntemi ile tespit edilen canlı bakteri sayıları, direkt kültürel sayım sonuçlarına kıyasla yaklaşık olarak 2-2,5 log kob/ml daha yüksek bulunmuştur (Şekil 2B).





Şekil 2. *S. Typhimurium* ile kontamine edildikten sonra farklı sıcaklık ve sürelerde ısıl işlem uygulanan süt örneklerinin PMA/real-time PCR, real-time PCR ve kültürel sayım sonuçları. A: 60°C, B: 65°C, C: 70°C ve D: 75°C

70°C'de 15 sn ısıl işlem uygulaması *S. Typhimurium* sayısında 5 log kob/ml'lik bir azalmaya neden olmuş ve bu örneklerin $\leq 10^5$ kob/ml'lik inokulasyon seviyelerinden yapılan ekimlerde koloni oluşumu gözlenmemiştir. Diğer taraftan aynı örneklerin, PMA/real-time PCR yöntemi ile tespit edilen canlı bakteri sayısı, kültürel sayım sonuçlarından yaklaşık olarak 2,5 log kob/ml daha yüksek bulunmuştur. Daha uzun süreli ısıl işlem uygulanan (60-900 sn), örneklerden yapılan ekimlerin hiçbirinde koloni oluşumu tespit edilmemiştir. PMA/real-time PCR yönteminde ise, 60-300 sn'lik ısıl işlem uygulanan örneklerin $\leq 10^5$ kob/ml'lik inokulasyon seviyesinde canlı bakteri tespit edilmezken, 900 sn ısıl işlem uygulanan örnekler için bakteri tespit edilmeyen inokulasyon seviyesi $\leq 10^6$ kob/ml olarak bulunmuştur (Şekil 2C).

S. Typhimurium ile inokule edildikten sonra 75°C'de ısıl işlem uygulanan süt örneklerinden yapılan ekimlerin hiçbirinde koloni oluşumu gözlenmemiştir. PMA/real-time PCR yönteminde ise, 15 ve 60 sn ısıl işlem uygulanmış örneklerin sırasıyla $\leq 10^5$ kob/ml ve $\leq 10^6$ kob/ml'lik inokulasyon seviyelerinde, 300 ve 900 sn ısıl işlem uygulanmış örneklerin ise hiçbirinde canlı bakteri DNA'sı tespit edilmemiştir. (Şekil 2D).

Diğer taraftan ısıl işlem uygulanmış tüm örneklerde, direkt real-time PCR ile tespit edilen bakteri sayılarının, ısıl işlem uygulanmamış (0 sn) örneklerin sonuçlarına oldukça yakın olduğu bulunurken, kültürel sayım ve PMA/real-time PCR yöntemi ile tespit edilen değerlerden de istatistiki olarak önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir.

S. Typhimurium ile farklı inokulasyon seviyelerinde kontamine edildikten sonra farklı sıcaklık ve sürelerde ısıl işlem uygulanan süt örneklerinde, ısıl işlemin derecesi arttıkça, kültürel sayım-PMA/real-time PCR yöntemleri

arasındaki korelasyonun da arttığı belirlenmiştir (Çizelge 1). Isıl işlem uygulanan gıdalardaki canlı mikroorganizma sayısının tespitinde, PMA-qPCR yönteminin etkinliğine tesir eden faktörlerden biri de uygulanan ısıl işlemin derecesidir (Lee ve Levin, 2009). Çünkü uygulanan ısıl işlemin derecesi arttıkça, hücre zarında oluşan hasar da artmakta ve dolayısıyla PMA ölü hücrelere daha iyi nüfuz edebilmektedir. Dolayısıyla *S. Typhimurium* ile kontamine tüm örneklerde, ısıl işlemin derecesi arttıkça PMA'nın etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir.

Diğer taraftan farklı seviyelerde *S. Typhimurium* ile inokule edilen süt örneklerinde, direkt kültürel sayım ve PMA/real-time PCR yöntemleri ile tespit edilen hücre sayıları arasındaki korelasyon katsayılarının ise inokulasyon seviyesi azaldıkça arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 2). PMA uygulaması sırasında, ölü hücrelere nüfuz eden PMA'nın DNA'ya bağlanmasını sağlayan en önemli aşama PMA'nın fotoaktivasyon aşamasıdır. Fotoaktivasyon sırasında, PMA'nın yapısında bulunan azide grubunun oldukça reaktif olan nitren radikaline dönüştüğü ve oluşan nitren radikal DNA molekülünde bulunan C atomu ile karbon-azot kovalent bağ oluşturarak DNA yapısını modifikasyona uğrattığı ve böylece PCR analizi sırasında DNA'nın amplifikasyonun önlediği bilinmektedir (Nocker ve ark., 2006). Ancak, hücre yoğunluğunun fazla olduğu örneklerde, PMA ölü hücrelere nüfuz etmesine rağmen, ortamdaki hücrelerin PMA'nın fotoaktivasyonunu engelleyebileceği dolayısıyla, canlı hücrelerin qPCR ile tespitinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir (Løvdal ve ark., 2011; Wagner ve ark., 2008). Bu çalışmada da *S. Typhimurium* ile kontamine tüm örneklerde PMA'nın etkinliğinin ortamdaki mikroorganizma yoğunluğundan etkilendiği tespit edilmiştir.

Çizelge 1 Farklı derecelerde ısıtma işlemi uygulanmış süt örneklerinde *S. Typhimurium*'un tespit için kullanılan farklı yöntemler arasındaki korelasyon katsayıları

Yöntemler	Isıl işlem sıcaklık derecesi				Ortalama
	60°C	65°C	70°C	75°C	
Kültürel sayım-PMA/ real-time PCR	0,72	0,76	0,78	0,93	0,82
Kültürel sayım- real-time PCR	0,47	0,26	0,11	0,08	0,20

Çizelge 2 Farklı seviyelerde süt örneklerine inokule edilmiş *S. Typhimurium*'un tespitinde kullanılan farklı yöntemler arasındaki korelasyon katsayıları

Yöntemler	İnokülasyon seviyesi (kob/ml)					
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Kültürel sayım-PMA/ real-time PCR	0,96	0,90	0,78	0,77	0,71	0,68
Kültürel sayım- real-time PCR	0,21	0,09	0,06	0,04	0,03	0,03

Sonuçlar

Gıdalarda *S.Typhimurium* varlığının belirlenmesi amacıyla ön zenginleştirme işlemi takiben uygulanan real-time PCR yönteminde tespit edilen bakteri sayısının, gıdaya uygulanan ısıtma işlemi veya diğer teknolojik uygulamalar sırasında ölen hücrelerden mi yoksa, ön zenginleştirme aşamasında artan hücre konsantrasyonundan mı ileri geldiğini belirlemek mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada ısıtma işlemi uygulanmış süt örneklerindeki ölü hücrelerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların elemine edilmesi için PMA/real-time PCR tekniğinin uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Sonuç olarak, *S.Typhimurium* ile kontamine süt örneklerine uygulanan ısıtma işlemi sonrası canlı hücrelerin tespitinde, real-time PCR tekniği ile kombine edilen PMA ön işleminin, real-time PCR tekniğinin başarısını belli bir dereceye kadar artırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, uygulanan ısıtma işlemi derecesi ve süresi ile örnekteki mikroorganizma konsantrasyonunun PMA'nın performansını etkilediği belirlenmiştir. Dolayısıyla PMA/real-time PCR yönteminin gıdalardaki patojen bakterilere ait canlı hücrelerin tespitinde, klasik kültürel yöntemlere alternatif olarak kullanılabilmesi için PMA ön işleminin optimizasyonuna yönelik daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından FDK-2013-4673 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Andrews-Polymenis HL, Baumler AJ, McCormick BA, Fang FC. 2010. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infect and Immun*, 78: 2356-2369.

Anonim. 2004. EN ISO 6579:20024, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of *Salmonella* (EN ISO 6579:20024). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O'Kennedy R. 2009. Antibody-Based Sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors*, 9: 4407-4445.

Cawthorn DM, Witthuhn RC. 2008. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol*, 105: 1178-1185.

Dwivedi HP, Jaykus L. 2011. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Crit Rev Microbiol*, 37: 40-63.

Elizaquível P, Sanchez G, Aznar R. 2012. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control* 25: 704-708.

Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. 2006. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional pcr system suggested by the FOOD-PCR Project. *J Microbiol Methods*, 66: 538-547.

Jiang Q, Fu B, Chen Y, Wang Y, Liu H. 2013. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 6043-6050.

Josefsen MH, Lofstrom C, Hansen TB, Christensen LS, Olsen JE, Hoorfar J. 2010. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol*, 76: 5097-5104.

Lee JL, Levin RE. 2009. 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*, 76: 93-96.

Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47:264-276.

Li F, Li F, Chen B, Zhou B, Yu P, Yu S, Lai W, Xu H. 2016. 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*, 1-8.

Liang N, Dong J, Luo L, Li Y. 2011. Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR. *J Food Sci*, 76: 234-237.

Liu Y, Mustapha A. 2014. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. *Int J Food Sci*, 170: 48-54.

Løvdal T, Hovda MB, Björblom B, Møller SG. 2011. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J Microbiol Methods*, 85: 164-169.

- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, 50: 882-889.
- Malorny B, Mäde D, Löfström C. 2013. Real-time PCR Detection of Food-Borne Pathogenic *Salmonella* spp. "InReal-time PCR in Food Science Current Technology and Applications". (Ed) D. Rodríguez-Lázaro, Caister Academic Press. Spain, 57-77.
- McCABE EM, Burgess CM, Walsh D, O'Regan E, McGuinness S, Barry T, Fanning S, Duffy G. 2011. Validation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the h1A gene of *Salmonella enterica* serovars. *J Microbiol Methods*, 84: 19–26.
- McGuinness S, McCabe E, O'Regan E, Dolan A, Duffy G, Burgess C, Fanning S, Barry, T, O'Grady J. 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat Sci*, 83: 555-5562.
- Nam HM, Srinivasan V, Gillespie BE, Murinda SE, Oliver SP. 2005. Application of SYBR Green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int J Food Microbiol*, 102: 161–171.
- Nocker A, Cheung CY, Camper AK. 2006. 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*, 67: 310–320.
- Nocker A, Camper AK. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*, 72: 1997-2004.
- Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK, Brousseau R. 2009. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods*, 76: 253–261.
- Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K. 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-Nuclease PCR. *Biotechniques*, 34: 804–813.
- Pan Y, Breidt F Jr. 2007. 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*, 73: 8028–8031.
- Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C. 2010. An overview of food-borne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol Adv*, 28: 232–254.
- Wagner AO, Malin C, Knapp BA, Illmer P. 2008. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol*, 74: 2537-2539.
- Wang J, Li R, Hu L, Sun X, Wang J, Li J. 2016. Development of a quantitative fluorescence single primer isothermal amplification-based method for the detection of *Salmonella*. *Int J Food Microbiol*, 219: 22-27.