



**TAVUK ETLERİNDE *Salmonella* spp. VE
Campylobacter spp.'NİN STANDART KÜLTÜREL
YÖNTEM, İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL
AMPLİFİKASYON (LAMP) VE REAL-TIME
PCR İLE BELİRLENMESİ VE DOĞRULANMASI**

Mehmet YÜKSEL

Doktora Tezi

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Selahattin SERT

2018

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TAVUK ETLERİNDE *Salmonella* spp. VE *Campylobacter* spp.'NİN
STANDART KÜLTÜREL YÖNTEM, İLMİĞE DAYALI
İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (LAMP) VE REAL-TIME PCR
İLE BELİRLENMESİ VE DOĞRULANMASI

Mehmet YÜKSEL

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

TAVUK ETLERİNDE *Salmonella* spp. VE *Campylobacter* spp.'NİN STANDART KÜLTÜREL YÖNTEM, İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (LAMP) VE REAL-TIME PCR İLE BELİRLENMESİ VE DOĞRULANMASI

Prof. Dr. Selahattin SERT danışmanlığında, Mehmet YÜKSEL tarafından hazırlanan bu çalışma 16/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Başkan : Prof. Dr. Selahattin SERT

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan YETİM

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Muhammet ARICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Bülent ÇETİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 19/04/2018 tarih ve 16/30 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2016/267

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan alıntılar, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

TAVUK ETLERİNDE *Salmonella* spp. VE *Campylobacter* spp.’NİN STANDART KÜLTÜREL YÖNTEM, İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (LAMP) VE REAL-TIME PCR İLE BELİRLENMESİ VE DOĞRULANMASI

Mehmet YÜKSEL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Selahattin SERT

Bu çalışmanın amacı standart kültürel method, ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) ve Real-Time PCR (qPCR) kullanarak *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. varlığının tavuk etlerinde belirlenmesi ve izolatların bu moleküler yöntemlerle doğrulanmasıdır. Temel amaç, özellikle LAMP metodunun spesifiklik ve hızlılık açısından tavuk etlerinde hedef patojenlerin tespitinde kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla eşit sayıda baget, kanat ve göğüs etinden oluşan toplam 126 adet örneğin ön zenginleştirme kültürleri LAMP, qPCR ve geleneksel kültürel metot kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma boyunca klasik kültürel yöntemlerle elde edilen *Salmonella* ve *Campylobacter* izolatları biyokimyasal testler, LAMP ve qPCR ile doğrulanmıştır. Ayrıca tavuk etleri mezofilik ve psikrotrofik bakteri, koliform ve fekal koliform, maya-küf, *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus* gibi mikrobiyolojik özellikleri açısından da incelenmiştir. Bununla birlikte; izolatların 12 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Çalışmada *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. klasik kültürel yöntem, LAMP ve qPCR ile tespit edilmiş ve her üç methodla da aynı hassasiyet ve spesifiklik sonucuna ulaşılmıştır. *Salmonella* ve *Campylobacter* için pozitif örnek dağılımı üç yöntemle de sırasıyla 44/126 (%35) ve 32/126 (%25) olarak bulunmuştur. Analizi gerçekleştirilen örneklerde mezofilik ve psikrotrofik bakteri, koliform, maya-küf, *Staphylococcus aureus* sayısı sırası ile 5-6, 5-7, 2-4, 3-4, 1-3 Log kob/g arasında bulunmuştur. Örneklerin 24’ünde (%19) *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Elde edilen tüm izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm izolatlar üzerinde Meropenem ve ertapenem en yüksek duyarlılık etkisine sahipken; ampisilin, kanamisin ve nalidiksik asid’in ise en fazla direnç gösterilen antibiyotikler olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; LAMP’ın, klasik ve moleküler metodlarla gösterdiği uyum nedeni ile tavuk etlerinde *Salmonella* ve *Campylobacter*’in hızlı tespitinde kullanılabileceği görülmüştür. Özellikle LAMP metodu hızlı, spesifik, hassas ve düşük maliyet gibi özellikleriyle kısıtlı imkanlara sahip laboratuvarlarda uygulanabileceği gösterilmiştir.

2018, 136 sayfa

Anahtar Kelimeler: İlmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP), real-time PCR, *Campylobacter*, *Salmonella*, hidroksinaftol mavisi (HNB), tavuk eti

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION AND IDENTIFICATION of *Salmonella* spp. AND *Campylobacter* spp. BY STANDARD CULTURE METHOD, LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION AND REAL-TIME PCR IN CHICKEN MEATS

Mehmet YÜKSEL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Selahattin SERT

The aim of this study is to determine using the standard culture method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and Real-Time PCR (qPCR) methods for detection the presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in chicken meats, identificate of the obtained isolates with the molecular methods. The main objective of our study was to assess availability of LAMP in terms of rapidity and specificity, for detection of the target pathogens in chicken meats. For this purpose, pre-enrichment broth cultures a total of 126 consisting of equal number of baguettes, wings and chests of were analysed by using the LAMP, PCR and conventional culture methods. The isolates of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. obtained using conventional cultural methods were confirmed by both assays (LAMP, qPCR) and biochemical tests. Also, the samples were examined for microbiological properties in terms of mesophiles, psychrotrophs, coliforms and fecal coliforms, yeast-moulds, *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*. Moreover, susceptibility of the isolates against to the twelve different antibiotics were determined by the disk diffusion method. In the study, compared to isolation of targets by conventional culture testing, the LAMP and PCR assays showed 100% sensitivity and specificity. The positive sample ratios for the two targets were respectively found 44/126 (35%) and 32/126 (25%) by three methods. In examined samples, the counts of mesophiles, psychrotrophs, coliforms, yeast-moulds, *S. aureus* were found in the range of 5-6, 5-7, 2-4, 3-4, 1-3 Log CFU/g, respectively. *Listeria* spp. were determined in 19% (24/126) of the samples. All isolates were found to be multiply antibiotic resistant. The carried out antibiotic susceptibility test results indicated that all isolates showed susceptibility to meropenem, ertapenem at the highest level, while their resistance to ampicilin, kanamycine ve nalidixic acid were at the highly level. In conclusion, LAMP can be used for the rapid diagnosis of *Salmonella* and *Campylobacter* in the chicken meats, due to its compatible with standard culture method and qPCR. Especially, this study has shown that LAMP assay can be utilized with features, such as rapid, specific, sensitive and cost-effective in resource-limited laboratories.

2018, 136 pages

Keywords: Loop-mediated isothermal amplification, Real-time PCR, *Salmonella*, *Campylobacter*, Hydroxynaphthol blue (HNB), chicken meat

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi birikiminden faydalandığım, beraber çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli, danışmanım Sayın Prof. Dr. Selahattin SERT'e,

Çalışmalarım süresince, bilgisini ve deneyimlerini her zaman çok cömertçe paylaşan ve her manada yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e,

Çalışmalarım esnasında gerek maddi gerek manevi desteklerini gördüğüm, her konuda yanımda olan ve sürekli desteğini hissettiğim Eşim Arzu KAVAZ YÜKSEL'e

Her zaman desteklerini gördüğüm çok değerli Aileme TEŞEKKÜR EDERİM.

Mehmet YÜKSEL

Mart, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	20
2.1. Tavuk Eti ve Mikrobiyolojisi	20
2.2. Tavuk Etlerinde Patojen Mikroorganizmalar	22
2.2.1. <i>Campylobacter</i> spp. ve kampilobakteriyozis	23
2.2.1.a. Genel özellikleri	23
2.2.1.b. Antibiyotik dirençleri	26
2.2.1.c. <i>Campylobacter</i> spp. izolasyonu, belirlenmesi ve tanımlanması.....	26
2.2.2. <i>Salmonella</i> spp. ve salmonellozis.....	28
2.2.2.a. Genel özellikleri	28
2.2.2.b. Antibiyotik direnci	29
2.2.2.c. <i>Salmonella</i> spp. izolasyonu, belirlenmesi ve tanımlanması	30
2.2.3. <i>S. aureus</i> ve stafilokokal enterotoksinler	34
2.2.4. <i>Listeria</i> spp.	35
2.3. Nükleik Asit Amplifikasyonu	37
2.3.1. İlmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP).....	38
2.3.1.a. LAMP prensipleri ve primerlerin dizaynı	39
2.3.1.b. LAMP reaksiyonunda kullanılan enzim (<i>Bst</i> DNA Polimeraz)	40
2.3.1.c. LAMP reaksiyonunun gerçekleşme aşamaları	41
2.3.1.d. LAMP ürünlerinin belirlenmesi	43
2.4. Lateral Akış Testi (LAT-Lateral Flow Immunochromatographic Assay)	49
2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	52

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	54
3.1. Materyal.....	54
3.1.1. Tavuk etleri.....	54
3.1.2. Kontrol (referans) suşlar.....	54
3.2. Yöntem	55
3.2.1. Mikrobiyolojik analizler.....	55
3.2.1.a. Materyallerin yıkanması (rinsing) ve dilüsyon hazırlama	55
3.2.1.b. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı	55
3.2.1.c. Psikrotrofik bakteri sayımı	56
3.2.1.d. Maya-küf sayımı.....	56
3.2.1.e. Koliform sayımı ve fekal koliform tespiti	56
3.2.1.f. <i>Staphylococcus aureus</i> sayımı	57
3.2.1.g. <i>Listeria</i> spp. analizi	58
3.2.1.h. <i>Salmonella</i> spp. izolasyonu	59
3.2.1.i. <i>Campylobacter</i> spp. izolasyonu	59
3.2.1.j. Antibiyotik duyarlılık testi	60
3.3. LAMP ve PCR Uygulamaları.....	61
3.3.1. DNA ekstraksiyonu	62
3.3.1.a. İzolatlardan DNA ekstraksiyonu	62
3.3.1.b. Materyalden DNA izolasyonu.....	62
3.3.1.c. DNA saflığının belirlenmesi.....	63
3.3.2. LAMP uygulaması	63
3.3.2.a. Primerler ve primer karışımının hazırlanması	63
3.3.2.b. Hydroxynaphthol Blue (HNB) boyasının hazırlanması	65
3.3.2.c. LAMP reaksiyonu.....	65
3.3.3. qPCR uygulaması	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	68
4.1. Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri	68
4.2. Tavuk Etlerinden İzole Edilen Patojen Bakterilerin Varlığı ve Bazı Özellikleri	72
4.2.1. Tavuk etlerinde <i>Listeria</i> spp. varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları	72
4.2.2. Tavuk etlerinde <i>S. aureus</i> varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları	77

4.2.3. Tavuk etlerinde <i>Salmonella</i> spp. varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları.....	80
4.2.4. Tavuk etlerinde <i>Campylobacter</i> spp. varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları.....	85
4.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Bulguları	90
4.3.1. DNA ekstraksiyonu ve saflığın belirlenmesi.....	90
4.3.2. LAMP ile <i>Salmonella</i> spp. ve <i>Campylobacter</i> spp. identifikasyon ve belirlenme sonuçları.....	93
4.3.3. Real-time PCR sonuçları ve yöntemlere göre pozitif örnek dağılımı	102
4.3.4. qPCR ve LAMP için maliyet karşılaştırması	110
5. SONUÇ.....	112
KAYNAKLAR	115
EKLER.....	134
EK 1.	134
ÖZGEÇMİŞ	137

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CMOS	: Complementary metal-oxide semiconductor
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Double stranded DNA-Çift zincirli DNA
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	: Ethidium bromide monoazide
FRET	: Floresan rezonans enerji transferi
GBS	: Guillain-Barré Sendromu
HNB	: Hydroxy naphtol blue
ISO	: International Organization for Standardization
KOB	: Koloni oluşturan birim
LAMP	: Loop-mediated isothermal amplification
mCCDA	: Modifiye Charcoal Cephoperazone Desoxycholate Agar
mPCR	: Multipleks PCR
NaOH	: Sodyum hidroksit
ORFV	: Orf virüs
OTA	: Ochratoxin A
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis
PMA	: Propidium monoazide
qPCR	: Quantitative polymerase chain reaction
RAPD	: Random amplification of polymorphic DNA
ReA	: Reaktif artrit
RNA	: Ribonükleik Asit
UV	: Ultraviyole
VBNC	: Viable but nonculturable

Simgeler

a_w :	: Water activity-Su aktivitesi
fg	: Femtogram
mM	: Milimolar
pg	: Pikogram
pH	: Power of hydrogen-Hidrojen gücü
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mn^{+2} , kalsein (A) ve agaroz jel (B) ortamında LAMP sonucunun görülmesi.	8
Şekil 1.2. LAMP sonucunun tespit yöntemleri.....	9
Şekil 1.3. CMOS sensör entegre edilmiş LAMP sistemi.....	10
Şekil 1.4. Reaksiyon ortamında SYBR green ve HNB ile LAMP ürünlerinin belirlenmesi	15
Şekil 1.5. <i>Penicillium nordicum</i> küfüne ait LAMP reaksiyon ürünlerinin HNB ile tespiti	16
Şekil 2.1. Geleneksel kültürel yöntemle <i>Salmonella</i> spp. izolasyonu	31
Şekil 2.2. Real-time PCR TaqMan (Hidroliz veya Üniversal) prob yöntemi.....	33
Şekil 2.3. LAMP teknolojisi	38
Şekil 2.4. LAMP için primerlerin seçimi.....	40
Şekil 2.5. LAMP reaksiyonu.....	42
Şekil 2.6. Çeşitli boyutlarda LAMP ampliconları	43
Şekil 2.7. Magnezyum pirofosfat oluşumundan dolayı bulanıklığa bağlı olarak LAMP sonucunun gözlenmesi	45
Şekil 2.8. Floresan metal indikatörü (Kalsein) kullanarak LAMP belirleme prensibi ...	46
Şekil 2.9. LAMP sonucunun SYBR Green I ile belirlenmesi.....	47
Şekil 2.10. LAMP sonucunun HNB ilavesiyle gözlemlenmesi.....	48
Şekil 2.11. PicoGreen kullanılarak LAMP sonucunun UV ve gün ışığında pozitif ve negatif olduğunu gösteren örnekler	49
Şekil 2.12. Lateral akış tanımlama test kitinin genel yapısı	50
Şekil 2.13. Thiol gruplarıyla stabilize edilmiş altın nanopartikülleri	52
Şekil 2.14. Disk difüzyon (Kirby-Baurer) yönteminin esası	53
Şekil 3.1. Hedef patojenlerin belirlenmesi için geleneksel kültürel yöntem ve nükleik asit amplifikasyon teknikleri.	61
Şekil 4.1. Palcam ve ChromoCult katı besiyerlerinde <i>L. monocytogenes</i> kolonileri.....	72
Şekil 4.2. API Listeria test kitinin pozitif ve negatif görünüşleri.....	73
Şekil 4.3. Singlepath L'MONO lateral akış testiyle <i>L. monocytogenes</i> tespiti.....	73

Şekil 4.4. <i>S. aureus</i> 'un Baird-Parker Agar besiyerinde görünümü ve koagülaz özelliği.....	78
Şekil 4.5. mCCDA ve Skirrow besiyerlerinde <i>Campylobacter</i> spp. kolonileri.....	86
Şekil 4.6. Saf kültürlerden izole edilen DNA'lara ait spektrumlar ve saflık değerleri ...	91
Şekil 4.7. Bazı <i>Salmonella</i> spp. izolatlarına ve materyalden direkt ekstraksiyona ait DNA saflıkları	91
Şekil 4.8. Bazı <i>Campylobacter</i> spp. izolatlarına ve materyalden direkt ekstraksiyona ait DNA saflıkları	91
Şekil 4.9. DNA, protein ve DNA/protein karışımlarına ait standart spektrumlar.....	92
Şekil 4.10. <i>Salmonella</i> Typhimurium (RSHMB 95091) kültürünün LAMP ile doğrulanması	95
Şekil 4.11. HNB kullanarak LAMP reaksiyon sonucunun belirlenmesinde kullanılan renk skalası (Mohon <i>et al.</i> 2014).....	95
Şekil 4.12. <i>Campylobacter jejuni</i> (ATCC 33560) ve <i>Campylobacter coli</i> (ATCC 33559) için LAMP amplifikasyon sonuçları.....	96
Şekil 4.13. Materyallerden izole edilen bazı <i>Salmonella</i> spp. ve <i>Campylobacter</i> spp. kültürlerine ait LAMP sonuçları	97
Şekil 4.14. LAMP reaksiyon ortamında HNB varlığının farklı dalga boylarında absorbens değişimi	100
Şekil 4.15. Örnek için negatif qPCR sonucu	102
Şekil 4.16. Örnek için pozitif qPCR sonucu	103
Şekil 4.17. Bazı <i>Salmonella</i> spp. izolatları için PCR amplifikasyon eğrileri	104
Şekil 4.18. <i>Campylobacter</i> spp. için PCR amplifikasyon eğrileri	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Listeria</i> spp. biyokimyasal özellikleri.....	37
Çizelge 2.2. LAMP için polimeraz enzimleri ve özellikleri	41
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları (µg/disk).....	60
Çizelge 3.2. Ön zenginleştirme sıvılarından DNA ekstraksiyonu	63
Çizelge 3.3. Çalışmada LAMP için kullanılan primerler	64
Çizelge 3.4. LAMP reaksiyonu için primer karışım oranları.....	65
Çizelge 3.5. LAMP protokolü kullanılan bileşen ve miktar/konsantrasyonları.....	66
Çizelge 3.6. Örnek ve kontrol reaksiyon hacimleri	67
Çizelge 3.7. Rotor-Gene Q için PCR protokolü	67
Çizelge 4.1. Tavut etlerinin mikrobiyolojik özellikleri (Log kob/g)	69
Çizelge 4.2. Tavuk etlerinde toplam koliform sayıları ve fekal koliform varlığı	71
Çizelge 4.3. Tavuk etlerinde hedef patojenlere ait var/yok durumu ve <i>S. aureus</i> sayısı	74
Çizelge 4.4. <i>Listeria</i> spp. izolatlarına ait antibiyotik zon çapları (mm)	77
Çizelge 4.5. <i>S. auerus</i> izolatlarına ait antibiyotik zon çapları	80
Çizelge 4.6. <i>Salmonella</i> spp. için biyokimyasal testler ve API 20E sonucu	81
Çizelge 4.7. <i>Salmonella</i> spp. izolatlarına ait antibiyotik zon çapları.....	83
Çizelge 4.8. <i>Campylobacter</i> spp. izolatlarına ait antibiyotik zon çapları	88
Çizelge 4.9. LAMP, qPCR ve klasik kültürel metot ile örneklerde hedef patojenlerin dağılımı	94
Çizelge 4.10. Materyallerden elde edilen bazı <i>Salmonella</i> spp. izolatlarının doğrulanmasında LAMP sonuçlarının absorbans değerleri	101
Çizelge 4.11 Real-time PCR için muhtemel sonuçlar	102
Çizelge 4.12. Pozitif örneklerin yöntemlere göre dağılımı.....	106
Çizelge 4.13. LAMP için sarf bazında maliyet.....	110
Çizelge 4.14. qPCR için sarf bazında maliyet	111

1. GİRİŞ

Son yıllarda, gıda kaynaklı patojen bakterilere ait nükleik asit sekanslarının belirlenmesinde artış görülmektedir. Bu veriler, spesifik tanı için DNA ve RNA amplifikasyon tekniklerinin kullanımına imkan sağlamaktadır. Nükleik asit temelli moleküler tanı metotlarından Polymerase Chain Reaction (PCR) bu alanda öncülüğünü devam ettirmektedir. Sekanslara özgü izotermal nükleik asit amplifikasyon teknikleri; termal döngü (thermal cycler) cihazına ihtiyaç duyulmadan ve tipik olarak hızlı moleküler tanı uygulamaları için idealdir. En çok kullanılan izotermal tekniklerden birisi Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) olarak bilinen uygulamadır. Klasik PCR reaksiyonlarında gerçekleşen amplifikasyonları belirlemek ve yorumlamak için termal döngüyü sağlayan cihazların yanısıra görüntüleme ekipmanlarına da ihtiyaç vardır. Bununla birlikte; hem amplifikasyon işleminin hem de oluşan ürünlerin (varlığı ve miktarı) eş zamanlı olarak belirlendiği Real-Time PCR uygulamaları geliştirilmiştir. Bu yöntem gerçek zamanlı PCR, homojen PCR, kantitatif PCR (qPCR) olarak da adlandırılmaktadır (Tanner and Evans 2014).

Gıda kaynaklı patojenlerin yol açtığı enfeksiyonlar insan sağlığı açısından son derece önemlidir. *Salmonella* ve *Campylobacter*; bu patojenlerden en önemlileridir. Kontamine olmuş kümes hayvanlarının, özellikle tavuk etlerinin işlenmesi veya tüketilmesi; bu iki önemli patojenin insanlara geçiş kaynağını oluşturmaktadır. Enfeksiyonlardan dolayı gelişen rahatsızlıklar, klinik maliyet, ölüm vakaları hem sağlık açısından hem de sosyoekonomik manada sorun teşkil etmektedir. Belirtilen bu risklerin minimuma indirilmesi için kontaminasyon kaynağının ve etmeninin doğru, hızlı, ekonomik, kolay uygulanabilir ve özgün teşhisi gıda güvenliği açısından önem arz etmektedir.

Konunun önemine binaen genel olarak gıda patojenlerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Bununla beraber, son yıllarda yüksek hassasiyet ve spesifiklikleri nedeni ile LAMP ve Real-time PCR yönteminin uygulandığı araştırmalar da görülmektedir. Rodrı'guez-La'zaro *et al.* (2003) agarlı besiyerinde koloni oluşturan *Salmonella*'ları

doğrudan tanımlamak için hızlı, gerçek zamanlı ve TaqMan temelli qPCR kullanmışlardır. Bu PCR sisteminde *Salmonella*'ya ait *invA* geni hedef alınarak 2 farklı laboratavarda validasyon için 4 tekrarlı analizler gerçekleştirilmiştir. *Salmonella* cinsine ait 5 türden 50 farklı alttür ve 30 *Salmonella* dışı kültürün incelenmesiyle qPCR'ın hassasiyet ve etkinliği incelenmiştir. Sonuç olarak; kapsayıcılık ve münhasırlık açısından yöntemin %100 doğruluk gösterdiği, optimize edilmiş TaqMan qPCR sistemlerinin *Salmonella* spp. belirlenmesinde ve tür ayrımında rutin, hızlı, basit ve spesifik şekilde kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Malorny *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada 110 *Salmonella* ve 87 *Salmonella* olmayan kültürlerle qPCR sistemini test etmişlerdir. Bütün kültürlerin doğru şekilde tanımlandığı çalışmada yöntemin belirlenme limitleri de bulunmuştur. Süspansiyon ortamında 10^3 kob/mL seviyesinde kültür olduğunda belirlenme oranının %70, 10^4 kob/mL bulunduğunda ise %100 olduğu vurgulanmıştır. Tavuk etleri, kıyma, balık ve çiğ sütte ön zenginleştirme sonrası DNA ekstraksiyonu ve qPCR protokolüyle 24 saat, geleneksel kültürel yöntemle 4-5 gün içinde sonuç alındığı vurgulanmıştır. Araştırmacılar bu sebeple yöntemin hızlı olduğu ve metodolojiye katkılar sağladığı sonucuna varmışlardır.

Hara-Kudo *et al.* (2005) *Salmonella*'nın hızlı belirlenmesi için LAMP yönteminin test edildiği ilk çalışmalardan birini gerçekleştirmişlerdir. *Salmonella*'ya ait 220 suş ve özgüllüğün belirlenmesi için *Salmonella* dışında 62 suş'un genomik ekstraktları LAMP için kullanılmıştır. Hassasiyetin reaksiyon başına 2.2 kob/test tüpü olarak tespit edildiği çalışmada yöntemin PCR ile aynı özgüllüğü sergilediği bildirilmiştir. Fakat; hassasiyetin PCR yönteminden daha yüksek olduğu da vurgulanmıştır. Aynı çalışmada *S. Enteritidis* kültürünün yumurta sıvısına inoküle edildiği ve yöntem ile 2.8 kob/test tüpü düzeyinde pozitif sonuç; bunun yanında PCR ile negatif sonuç alındığı da rapor edilmiştir.

Hein *et al.* (2006) gıda örneklerinde *Salmonella* spp.'nin belirlenmesi için real-time PCR yöntemini klasik PCR yöntemine alternatif bir yöntem olarak değerlendirmişlerdir

Araştırmacılar; yapay olarak kontamine ettiği gıdaları 16 saatlik bir ön zenginleştirmeye tabi tuttukten sonra, tavuk etleri ve çiğ sütlerden 5 kob/25 mL, kıymalardan 2.5 kob/mL seviyesinde tespit gerçekleştirebildiklerini vurguladıkları çalışmada qPCR'ın TaqMan probolar ile klasik PCR'a alternatif olabileceği sonucuna varmışlardır.

Malorny *et al.* (2007) tüketime sunulan yumurtalarda ve kümes hayvanları etlerinde *Salmonella* Enteritidis'in belirlenmesi için real-time PCR kullanmışlardır. *S. Enteritidis* için spesifik 60-kb virülans plazmit'de *prot6e* gen hedef alınarak hazırlanan TaqMan prob ve primerler kullanılarak gerçekleştirilen analizde 79 *S. Enteritidis* suşu %95 doğrulukla tanımlanmıştır. PCR yönteminin hassasiyet ve özgüllüğünün kültürel yöntemle kıyaslandığı çalışmada %100 performans ve uyum alındığı rapor edilmiştir.

Okamura *et al.* (2008) tavuklarda *Salmonella* serogrup O9'un hızlı, spesifik ve hassas olarak belirlenmesi için LAMP uygulamasını kullanmışlardır. Kümes hayvanları ve tavuklardan elde edilen izolatların kullanıldığı çalışmada LAMP ve PCR için belirlenme limitinin sırasıyla 10^3 ve 10^6 kob/mL olduğu bulunmuştur. LAMP için nihai sonuç 30 dakika sürerken; PCR'da toplam 120 dakika sürmüştür. Ayrıca klasik kültür yönteminde iki basamaklı zenginleştirme işlemi gerekirken, LAMP için ön zenginleştirme basamağının yeterli olduğu da vurgulanmıştır. Çalışmada izolatların birbirinden ayrımı (serogrup O9) ve identifikasyonu başarı ile gerçekleştirildiği rapor edilmiştir.

Wang *et al.* (2008) gıda kaynaklı *Salmonella*'nın hızlı tespiti için LAMP yöntemini geliştirmiş ve değerlendirmişlerdir. Literatürde bu tarz çalışmalarda genellikle (developed ve evaluated) geliştirme ve değerlendirme kavramları kullanılmaktadır. *Salmonella*'ya ait *invA* genin 6 farklı bölgelerinden 2 iç (Forward inner, Backward inner) ve 2 dış (Forward outer, Backward outer) primer dizayn edilerek LAMP uygulanmıştır. İzotermal koşullar altında 65°C 60 dakika inkübasyondan sonra LAMP ürünlerinin belirlenmesi %2'lik agaroz jel ortamında ethidium bromide ile elektroforezde gerçekleştirilmiştir. LAMP analizinin hassasiyetinin reaksiyon hacminde 100 fg DNA olduğu belirlenmiştir. PCR işleminde ise 1 pg DNA konsantrasyonunda

sonuç verdiği rapor edilmiştir. Aynı yöntemde 100 ng seviyesinde *Salmonella* dışında genomik DNA ve 1 pg *Salmonella* DNA'sının olduğu reaksiyon ortamında, yabancı genomik maddenin amplifikasyon etkinliğine yan etki yapmadığı vurgulanarak yöntemin spesifikliği ve hassasiyeti açıklanmıştır. Ayrıca; izotermal koşulların sağlanması için su banyosu veya blok ısıtıcının yeterli olduğu ve analizin düzenli bir laboratuvarda rahatlıkla uygulanabileceği rapor edilmiştir.

Li *et al.* (2009) gıdalarda *Salmonella*'nın spesifik tespiti için LAMP testi geliştirmiş ve geçerlilik için *phoP* genine özgü primerler dizayn etmişlerdir. Bu primerlerin LAMP'da kullanılmasıyla 66 *Salmonella* suşu doğrulanmıştır. Yöntemin seçiciliğini test etmek amacıyla *Salmonella* dışında 77 tür test edilmiştir. Bu gen *Salmonella*'ların makrofaj saldırılarına karşı geliştirilen sistemi düzenlemekte ve virülans ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. 10^1 kob/mL *Salmonella* hücresi içeren süspansiyonlardan elde edilen genomik izolatların %100 belirlendiği bildirilmiştir. Çalışmada, LAMP metodu için örnek hazırlama protokolünde tamponlanmış peptonlu suda ön zenginleştirme ve ardından etkili bir DNA ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla *Salmonella* içeren 85 adet kıyma ve süt örneği analize alınmıştır. Analiz sonucunda klasik kültürel yöntemle aynı belirleme oranı elde edilmiştir. Ön zenginleştirme sonrası 35 kob/250 mL seviyesinde *Salmonella* içeren gıdalardan kolaylıkla belirlenme yapıldığı vurgulanmıştır. Klasik kültürel yöntem identifikasyon dahil 5 gün sürerken, ön zenginleştirme ve genomik ekstraksiyon dahil LAMP 24 saat gibi kısa bir süre içerisinde sonuç vermektedir. Araştırmacılar sonuç olarak; LAMP yönteminin rutin laboratuvarlarda uygulanan *Salmonella* analizine alternatif olabileceğini belirtmişlerdir.

Löfström *et al.* (2010) araştırmacılar tarafından *Salmonella*'nın kümes hayvanlarına ait dışkılarından belirlenmesi için toplam 20 saat süren bir qPCR prtokolü geliştirilmiştir. Bu tip çalışmalarda genellikle materyalin ön zenginleştirmesinden sonra etkili bir DNA saflaştırma işlemiyle PCR işlemine geçildiği görülmektedir. Çalışmada örnek bazında 25-33 kob seviyesinde belirlenme yapılabildiği bildirilmiştir. 1-10 kob *Salmonella* içeren örneklerin yanlış negatif sonuçlara sebep olabileceği ve 10-100 kob içerikli

örneklerin teşhisinde %100 uygunluk, doğrulama derecesi elde edildiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak; buna benzer çalışmaların yapılmasıyla yöntemin validasyonunun destekleneceği kanaatine varılmıştır.

Techathuvanan *et al.* (2010) *Salmonella*'nın et ve et ürünlerinden analizi için hızlı, basit ve yeni moleküler metot olan LAMP protokolü oluşturmuşlardır. 25 gram materyallere iki farklı seviyede inokülasyon yapılarak hem geleneksel yöntem hem de LAMP yöntemi ile belirlenme yapılmıştır. Materyallerden 10 saatlik ön zenginleştirme işlemi ile 10^2 kob/25 g, ön zenginleştirme olmadan 10^6 kob/25 g seviyesinde belirlenme yapılabildiği belirtilmiştir. Bu analizin yaklaşık olarak 1 gün sürdüğü ve klasik yöntemle göre çok hızlı sonuç verdiği, bu sebeple rutin laboratuvarlarda kullanma potansiyelinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Shao *et al.* (2011) tarafından *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp.'nin sütlerden eş zamanlı olarak belirlenmesi için LAMP yöntemi geliştirilmiştir. Bu sistemde iki farklı tasarımla her patojen için 6 adet primer dizayn edilmiştir. *Salmonella* spp.'de *invA*, *Shigella* spp. için *ipaH* genlerinden tasarlanan primerler yüksek spesifiktir sonuç verdiği görülmüştür. Multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) kullanılan sistemde amplifikasyon için 100 fg DNA'nın reaksiyon ortamında olması yeterli iken; multiplex PCR'da 1 pg DNA olması gerekmektedir. Sonuç olarak; mLAMP yönteminin 5 kob/10 mL inokülasyon seviyesinde sonuç ile hassas, hızlı, etkili ve spesifik olduğu rapor edilmiştir.

Ye *et al.* (2011) gıdalarda *Salmonella*'nın belirlenmesi için *in situ* LAMP yöntemini geliştirmiş ve test etmişlerdir. Araştırmacılar; yapay olarak kontamine ettikleri yumurta kabuklarında, belirlenme limitinin (detection limit) yaklaşık olarak 1 kob/cm² kabuk olduklarını belirlemişlerdir. *In situ* bir çalışma olarak alanında ilk olma özelliği taşıyan araştırmanın klasik kültürel ve PCR'a göre daha hızlı, kolay olduğu ve yüksek spesifiktir gösterdiği vurgulanmıştır.

Ravan and Yazdanparast (2012) insanlarda gastrointestinal rahatsızlıklara sebep olan

Salmonella serogroup D patojenlerinin belirlenmesinde ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ve LAMP yöntemini birlikte kullanarak yeni bir protokol oluşturmuşlardır. Çalışmada; ELISA prensip olarak PCR ve LAMP ampikonlarının görülmesinde kullanılmıştır. Çalışma nihayetinde; ELISA-LAMP yönteminin ELISA-PCR yöntemine göre, 10 kat daha hassas olduğu ve alternatif bir uygulama olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Zhang *et al.* (2012) tarafından *Salmonella*'nın gıdalardan hızlı teşhisi için *fimY* (fimbrial regulatory protein FimY) geni gözönüne alınarak LAMP için primerler tasarlanmış ve amplifikasyonun görüntülenmesi eş zamanlı bir bulanıklık ölçer platform ile gerçekleştirilmiştir. *Salmonella* kültürlerinden 13 kob/mL seviyesinde teşhis gerçekleştirildiği ve bu değerin PCR'dan 10 kat daha hassas olduğu bildirilmiştir. Çalışmada; düşük konsantrasyonda *Salmonella* ile kontamine olmuş gıdaların 3 saatlik bir ön zenginleştirme sonrası LAMP ile teşhis edilebildiği vurgulanarak yöntemin etkili, hızlı ve hassas olduğu sonucuna varılmıştır.

Soli *et al.* (2013) *Shigella*, *Salmonella* ve *Vibrio cholerae* için LAMP yönteminin uygulanabilirliğini değerlendirmek için qPCR metoduyla kıyaslamalar yapmışlardır. HNB ve SYBR green I kolorimetrik boyalarla hazırladıkları LAMP uygulamalarının türbidite ve görüntülemeye dayalı yöntemlere kıyasla hassasiyeti arttırdığı vurgulanmıştır. Çalışmada; klinik kaynaklı patojenlerin tespitinde LAMP uygulamaları için DNA ekstraksiyon metotlarının ve kolorimetrik boyaların optimizasyonunun önemine de değinilmiştir.

Delibato *et al.* (2014) Avrupa birliğinde *Salmonella* analizinde kullanılan klasik yönteme alternatif olarak real-time PCR yönteminin validasyonunu gerçekleştirmek amacıyla kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. 33 kişilik bir ekip tarafından yürütülen çalışmada et örnekleri materiyal olarak kullanılmış ve yapay kontaminasyonla 37°C±1, 18±2 saatlik inkübasyon sonrası klasik kültürel yöntem ve qPCR protokolleri uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında PCR ile 10 kob/25 g seviyesinde belirlenme gerçekleştirildiği, %100 doğruluk oranına sahip olduğu

görülmektedir. Real-time PCR yönteminin hızlı ve maliyeti düşük olduğu; bu sebeple bu platformların laboratuvarlarda kullanılabileceği ve ISO standard 16140:2003'e göre valide olduğu bildirilmiştir. Avrupa genelinde 13 laboratuvar da yürütülen çalışmada yöntemin validasyonu için güçlü bir sonuç elde edilmiş ve gıda örneklerine göre validasyon çalışmalarının yürütülmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Chen *et al.* (2015) LAMP uygulamasıyla gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı *Salmonella* serotiplerini belirlemişlerdir. *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* türlerinin 10 farklı suşu bu yöntem ile identifiye edilmiştir. Kültürler için belirlenme limitinin $1,33 \times 10^1$ kob/mL, materyal olarak kullanılan et için ise 2.0×10^1 kob/mL olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda LAMP yönteminin hızlı, spesifik ve hassas olduğu; bu sebeple gıdalardan *Salmonella*'nın hızlı belirlenmesi için kullanılabileceği rapor edilmiştir.

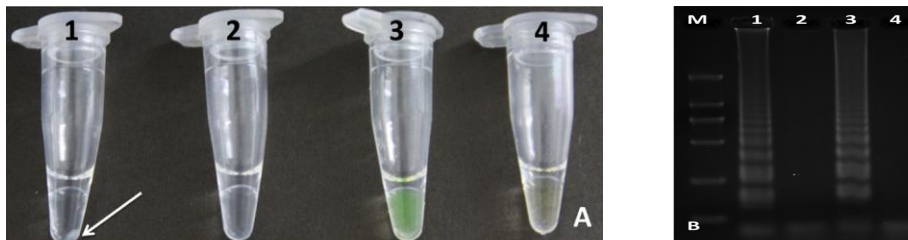
Wu *et al.* (2015) tarafından maruldan ön zenginleştirme olmaksızın düşük sayıdaki *Salmonella*'nın belirlenmesi için kaplanmış aktif karbon (coated activated carbon) ve LAMP yöntemi kombine edilmiştir. LAMP'ın sonuç verebilmesi için en düşük DNA seviyesinin 0.5 kob/g inokülasyondan sağlandığı belirtilmektedir. Midori green boyasının floresan ajan olarak kullanıldığı çalışmada sonuçlar Real Time Cycler ile elde edilmiştir. Aktif karbonun DNA amplifikasyon inhibitörlerinin elemine edilmesinde etkili olduğu ve bu sebeple kullanıldığı açıklanmıştır. Sonuç olarak bu metodun marul gibi diğer sebze ve gıdalardan *Salmonella* aranmasında başarılı sonuç vereceği görülmektedir.

Wu *et al.* (2015) *Salmonella enterica* ser. Enteritidis'in canlı ve ölü hücrelerini birbirinden ayırt etmek amacıyla ethidium bromide monoazide (EMA) ve LAMP yöntemini kombine ederek hızlı ve etkin bir protokol oluşturmuşlardır. Yaptıkları çalışmada 8.0 µg/mL konsantrasyonda EMA'nın DNA amplifikasyonunu inhibe etmediği bildirilmiştir. EMA; ısı uygulaması ile hücre duvarları zedelenen hücrelere penetre olarak DNA ile kovalent bağ oluşturduğu için PCR ve LAMP gibi yöntemlerde nükleik asitler amplifiye olamamaktadır. Bu prensiple amplifikasyon gerçekleşen

hücrelerin canlı, diğerlerinin cansız olduğu tespit edilmektedir. Çalışma sonucunda EMA-LAMP yönteminin, EMA-PCR yönteminden daha hızlı olduğu da vurgulanmaktadır.

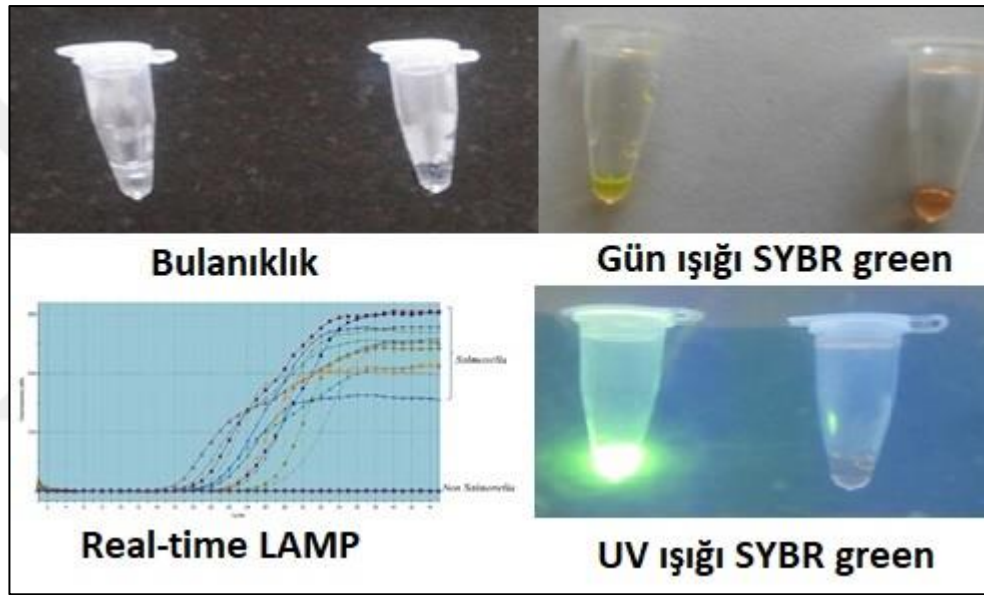
Abirami *et al.* (2016) bir araştırmalarında *Salmonella* ile doğal olarak kontamine olmuş tavuk karkası ve etleri ile üretim çevresinden *Salmonella* teşhisi için kullanıma hazır plak sistemi ve LAMP temelli bir kitin değerlendirmesini yapmışlardır. Araştırma sonucunda, 3M Petrifilm SALX System ve 3M MDA ticari sistemlerin ISO 6579:2002 referans metod kadar hassas, spesifik ve doğru olduğu, bu sistemlerin alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Li *et al.* (2016) gıdalardan *Salmonella* spp.'nin aranmasında hızlı ve hassas bir LAMP analizi geliştirdiklerini bildirdikleri çalışmada; Kong *et al.* (2013) tarafından ortaya çıkarılan *Salmonella* spp.'ye ait oldukça spesifik bir gen dizilimi (*gene62181533*) hedef alınarak 6 LAMP primeri dizayn edilmiştir. Yöntemin hassasiyetini ve özgüllüğünü test etmek amacıyla 32 *Salmonella* türünün 0,81 kob/mL seviyesinde inoküle edildiği süt örnekleri 12 saat ön zenginleştirmeden sonra kullanılmıştır. Bunun yanında toplamda 100 adet, doğal mikrobiyotaya sahip ve *Salmonella* inoküle edilmemiş gıda (sığır, tavuk ve çeşitli etler) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 100 gıda örneğinden *Salmonella* klasik kültürel, PCR ve LAMP yöntemleriyle aynı seviyede (%11) tespit gerçekleştirilmiştir. LAMP sonucunun görülmesi için Mn^{+2} iyonları ve kalsein reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Bu ilave edilen reagentler sayesinde reaksiyon ortamında meydana gelen bulanıklık ve renk değişimi amplifikasyonun pozitif olduğunu göstermektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Mn^{+2} , kalsein (A) ve agaroz jel (B) ortamında LAMP sonucunun görülmesi (Li *et al.* 2016).

Mashooq *et al.* (2016) *Salmonella* için prob temelli real-time LAMP uygulaması geliştirdikleri ve bu yöntemi değerlendirdikleri çalışmalarında DNA amplifikasyon tespitinde yeni bir yol bulduklarını vurgulamışlardır. Araştırmacılar oluşturdukları prob temelli primerleri LAMP'da kullanarak amplifikasyon sonuçlarını real-time cihazında, SYBR green boyasıyla UV ışığı altında floresana ve bulanıklığa bakarak belirlemişlerdir (Şekil 1.2). Ayrıca; geliştirilen yöntemin TaqMan prob temelli qPCR'a göre 10 kat daha hassas olduğu vurgulanmıştır.



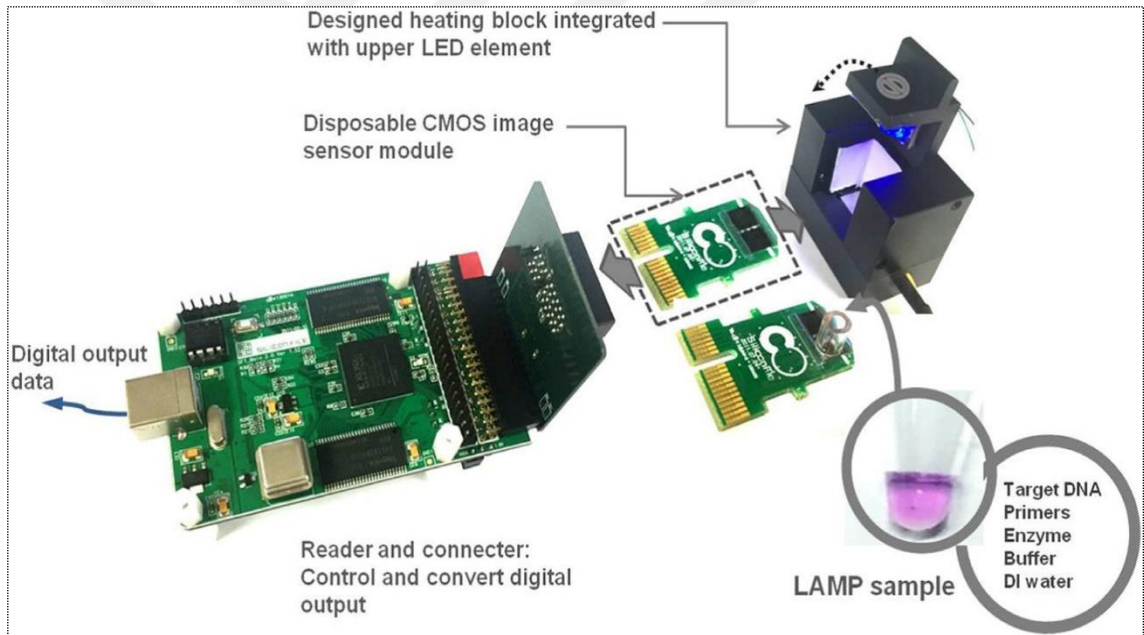
Şekil 1.2. LAMP sonucunun tespit yöntemleri (Mashooq *et al.* 2016)

Garrido-Maestu (2017) *Salmonella* spp., Enteritidis ve Typhimurium analizi için sistematik LAMP yöntemi geliştirmişlerdir. Gıda örneklerinde (tavuk göğsü, hindi filetosu, yumurta ve yumurta ürünleri) <10 kob/25 g düzeyinde belirleme için LAMP başarılı olmaktadır. LAMP klasik kültürel yöntem ve qPCR ile kıyaslandığında yüksek doğruluk gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Yan *et al.* (2017) gıdalarda yaygın olarak izole edilen *V. parahaemolyticus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* ve *L. monocytogenes* patojenleri için LAMP uygulamasını test etmişlerdir. 116 standart suşun kullanıldığı çalışmada 25 µL reaksiyon hacminde

amplifikasyon için 65°C 45 dakika işlem uygulamıştır. Araştırmada; her reaksiyon için 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 kob bakteri kültürü kullanılarak yöntemin belirlenme limiti tespit edilmiştir. Kullanılan bütün suşlar yüksek hassasiyetle doğrulanmış ve yanlış pozitif sonuçların olmadığı belirtilmiştir.

Wang *et al.* (2017) gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde LAMP protokolüne HNB ilave ederek reaksiyon ortamında amplifikasyonun oluşup oluşmadığını ve amplifikasyonun kantitatif sonucunu belirlemek amacıyla CMOS (complementary metal-oxide semiconductor) görüntü sensörüyle tasarlanan bir platform dizayn etmişlerdir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. CMOS sensör entegre edilmiş LAMP sistemi (Wang *et al.* 2017).

Platform üzerinde sensörün reaksiyonun meydana geldiği tüplerdeki renk değişimini algılayıp bir çevirici sayesinde okunabilir dijital veriler olarak sunduğu belirtilmiştir. Bu sistemde *E. coli* O157 kantitatif analiz için kullanılmış ve sistemin etkinliğini belirlemede *S. aureus* ve *Salmonella enterica* ile karşılaştırma yapılmıştır. Kantitatif analiz için *E. coli*'ye ait çeşitli konsantrasyondaki DNA'nın ($10 \text{ fg}/\mu\text{L}$) en düşük seviyede bile belirlenebildiği rapor edilmiştir. LAMP reaksiyon ortamında HNB boyasının

kolorimetrik amaçla kullanıldığı ve başlangıçta reaksiyon karışımının mor menekşe renginde olduğu belirtilmiştir. Amplifikasyonun gerçekleşmesiyle, reaksiyon boyunca ortamda yan ürün olarak oluşan pirofosfatların HNB+Mg⁺² kompleksinden Mg⁺² iyonlarını uzaklaştırarak ortam pH'sında değişiklik meydana getirdiği için rengin gökmavisine (sky blue) dönüştüğü belirtilmiştir. Sonuç olarak CMOS sensör entegre edilmiş ve kolorimetrik amaçla HNB kullanılan LAMP platformun DNA'nın kantitatif analizlerinde başarılı şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu araştırmanın yenilikçi bir yaklaşım olduğu ve multidisipliner şekilde geliştirildiğinde verimli bir yöntem olacağı açıktır.

Yang *et al.* (2003) tarafından insanlarda gıda kaynaklı rahatsızlara sebep olan patojenlerin başında gelen *C. jejuni*'nin kümes, süt ve çevresel örneklerden belirlenmesi için real-time PCR uygulaması geliştirilmiştir. Örneklerde zenginleştirme aşaması atlanarak yürütülen çalışmada yaklaşık olarak 1 kob seviyesinde, 60 dakika sürede sonuç alınmıştır. Materyal olarak 300 dondurulmuş tavuk eti, 300 süt örneği ve 300 su örneği incelenmeye alınmıştır. *C. jejuni* varlığına örneklerde sırasıyla %30.6 (92/300), %27.3 (82/300) ve %13.6 (41/300) oranında rastlanmıştır. Araştırma sonucunda; real-time PCR sisteminin hızlı, spesifik, hassas bir metot olduğu ve incelenen örneklerin sıklıkla kontaminasyona maruz kaldığı vurgulanmıştır. Bu sebeple tüketiciler için risk potansiyeli taşıyan bu kontaminasyonun önlenmesi için hijyenik koşullara ve üretim tekniklerine dikkat edilmesi gerektiği bildirilmiştir.

Yamazaki *et al.* (2009) *Campylobacter fetus*'un hızlı belirlenmesi için LAMP analizi kullanmışlardır. Geliştirdikleri yöntemin PCR ve geleneksel biyokimyasal metotlara göre daha hızlı ve basit olduğu bildirilmiştir. Yöntem ile 60 *C. fetus* suşu, 55 non-*fetus* *Campylobacter* ve 30 *Campylobacter* dışı türün belirlenmesi doğrulukla yapılmıştır. Yöntemin hassasiyetinin materyallere göre değişebileceği ve PCR ile aynı veya yüksek hassasiyet sergilediği belirlenmiştir.

Yamazaki (2013) LAMP ile tavuk etlerinden *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin hızlı ve hassas aranmasında kapsamlı bir protokol hazırlamıştır. Protokolde

LAMP için spesifik primerlerin hazırlanması, DNA ekstraksiyonu ve dikkat edilmesi gereken konular detaylıca izah edilmiştir. Tavuk etlerinde ön zenginleştirme sonrasında DNA ekstraksiyonundan itibaren sonucun 50 ile 90 dakika arasında alındığı rapor edilmiştir.

Sabike *et al.* (2017) piliçlerin intestinal içeriklerinden *Campylobacter jejuni* ve *C. coli*'nin klasik kültürel ve LAMP yöntemle belirlenmesini değerlendirmişlerdir. Toplam 131 örneğin incelendiği çalışmada patojenlerin prevelansı %29 (38/131) olarak bulunmuştur. Klasik kültürel yöntemde *Campylobacter* yükü 6.4-9.0 Log kob/g arasında tespit edilmiştir. Çalışma verilerine bakıldığında; bağırsak örneklerinden 90 dakika süreyle hızlı bir şekilde düşük maliyetle (1 USD) belirlendiği ve yöntemin performansının klasik kültürel yöntemle aynı olduğu sonucuna varılmıştır.

Zang *et al.* (2017) çeşitli örneklerden *Campylobacter jejuni* belirlemek için görsel olarak sonucu görülebilen LAMP yöntemi geliştirmiş ve değerlendirmişlerdir. Gıda örnekleri olarak perakende satışa sunulan toplamda 308 adet çeşitli gıdayı (tavuk eti, deniz ürünleri, sebze, meyve ve yenebilir mantarlar), 73 çevresel maddeyi ve 94 fekal örneği materyal olarak belirlemişlerdir. 475 farklı örnek üzerinde PCR ile %14.9, klasik kültür yöntemiyle %12.7, LAMP metoduyla %16.6 oranında *Campylobacter jejuni* tespit etmişlerdir. Çalışmada LAMP'ın etkinliğinin en yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca araştırmacılar LAMP yönteminin diğer bakterilere karşı %100 hassasiyet gösterdiğini açıklamışlardır. Sonuç olarak LAMP yönteminin PCR alternatifi olabileceği rapor edilmiştir. Bununla birlikte sonucun belirlenmesi amacıyla reaksiyon gerçekleştirildikten sonra ortama SYBR green gibi boyaların ilavesinin kontaminasyon riski oluşturabileceği, HNB gibi metal indikatörü boyaların başlangıçta ilavesiyle risklerin azaltılabileceği, HNB boyasının amplifikasyonun etkinliğini inhibe etmediği ve doğrudan görsel sonuca imkan verdiği çıkarımına varılmıştır. Bu çıkarımlar ile gıda örnekleri ve çevresel kaynaklardan *C. jejuni*'nin yüksek hassasiyetle tespitinin başarılabileceği dile getirilmiştir.

Haas *et al.* (2017) tarafından piliç sürülerinde *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* patojenlerinin izlenmesinde qPCR yaklaşımını değerlendirmişlerdir. Altın standart olarak kabul edilen klasik yöntemle qPCR arasında doğru bir korelasyon olduğu; hızlı, spesifik olan bu yöntemin gıda zinciri boyunca önlemler ve uygulamaların belirlenmesinde yol gösterici olduğuna değinilmiştir.

Cardoso *et al.* (2010) kümes hayvanlarında enterik enfeksiyonlara sebep olarak ölümlere yol açan *Coronavirus* tespitinde LAMP yönteminin uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Sonuç olarak tek tüpde, tek adımda kısa bir süre içerisinde amplifikasyonu HNB ile belirlemişlerdir. RT-PCR'ın bu alanda sonuç vermesi için en az 2 saate ihtiyaç duyulduğunu; LAMP yönteminde ise 45 dakika gibi bir sürenin gerektiğini belirtmişlerdir.

Venkatesan *et al.* (2015) keçi ve koyunlarda yaralar yapan Orf virüs (ORFV) etkenini hızlı belirlemede sonucu gözle görülebilen LAMP reaksiyonunu optimize etmek ve değerlendirmek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Klinik örneklerden belirleme oranlarının PCR, qPCR ve LAMP için sırasıyla %67.9, %91.1 ve %89.3 olduğunu rapor etmişlerdir. Amplifikasyon sonuçlarının görsel olarak gözlenmesi amacıyla SYBR Green I ve HNB boyası kullanılan çalışmada optimum reaksiyon koşullarının 65°C, 60 dakika inkübasyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada amplifikasyonların belirlenmesi amacıyla HNB kullanımının SYBR Green I, Pico green gibi çift zincirli DNA'ya özgü boyalarla aynı sonucu verdiğini ve bu boyalara kıyasla ekonomik olduğu da vurgulanmıştır. Araştırmacılar LAMP yönteminin Orf enfeksiyonlarının epidemiyolojik incelemelerinde ve klinik olarak tanımlanmasında PCR tekniğinde kullanılan ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan yapılabileceği sonucuna varmışlardır.

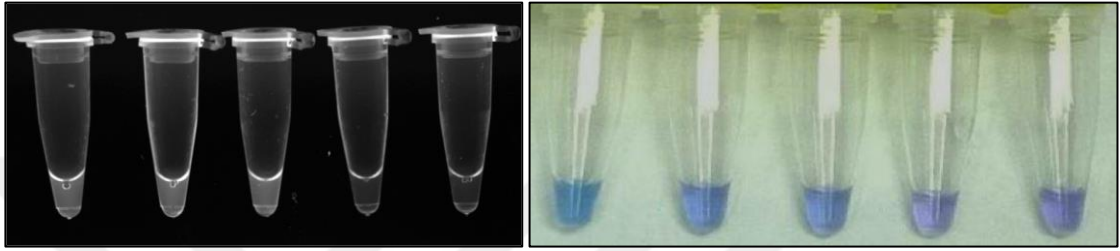
Dugan *et al.* (2012) *Bacillus anthracis* ve sporlarını belirlemek amacıyla ilk kez bir LAMP protokolü uygulamışlardır. HNB boyasıyla geliştirdikleri bu protokol ile germinasyonu sağlanan sporelerden ve aktive etmiş kültürlerden amplifikasyon başardıklarını bildirmişlerdir. Amplifikasyon sayesinde patojenik ve patojenik olmayan *Bacillus* suşların ayrımının da yapılabileceği belirtilmiştir.

Goto *et al.* (2010) *Pseudomonas aeruginosa*'a ait outer membrane lipoprotein (*oprL*) gen bölgesine özgü primerler hazırlayarak HNB ile kolorimetrik LAMP analizi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada; metodun serogrup ve diğer bakterilere karşı %100 özgüllük gösterdiği rapor edilmiştir. Yani; hedefe özgü tasarlanan primerlerle amplifikasyon işlemi HNB ile gözlemlenmiş ve diğer bakterilere ait DNA örneklerine karşı amplifikasyon görülmemiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar LAMP yönteminin *Pseudomonas aeruginosa* aranmasında PCR ve klasik kültürel yöntemle alternatif olabileceğini ve bu yöntemlere kıyasla daha uygulanabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Mao *et al.* (2012) balıklar için patojen bakteri olan *Pseudomonas putida* tespiti için LAMP reaksiyonuna özgü 4 primer dizayn ederek çalışma yürütmüşlerdir. LAMP reaksiyon koşullarının optimizasyonundan sonra, yöntemin reaksiyon başına 4.8 kob seviyesinde belirleme limitine sahip olduğu ve bu limitin klasik PCR'a göre 10 kat daha hassas olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada yöntemin hassasiyetinin belirlenmesi amacıyla 9 farklı Gram pozitif bakteri kullanılmış ve bütün *P. putida* izolatlarının yüksek hassasiyette belirlendiği bildirilmiştir. Çalışmada sonucun görsel olarak tespiti için SYBR green boyası mikrokristal mumsu bir yapı ile kaplandıktan sonra reaksiyona ilave edilmiştir. Bu kullanımının çapraz kontaminasyonları önlediği ve boyanın kaplama materyalinin 85°C'de eridikten sonra ortama yayılıp ampliconlara bağlandığı öne sürülmüştür. Sonuç olarak etken patojenin balıklardan hızlı belirlenmesinde yüksek duyarlılık gösterdiği, ekonomik olduğu ve görsel LAMP yönteminin uygulanabilirliğinin başarılı olduğu gösterilmiştir.

Chen *et al.* (2014) Q (Query) fever veya Q humması olarak bilinen enfeksiyona sebep olan *Coxiella burnetii*'nin belirlenmesi için LAMP analizi geliştirmişlerdir. Filogenetik olarak yakın olan *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia conorii* ve *Rickettsia rickettsi* mikroorganizmaların genomları yöntemin özgüllüğünü (specificity) tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Amplifikasyonların görüntülenmesi için %2 agaroz jel ortamında GelRed ile elektroforez işleminden sonra UV ışık altında belirlemenin yanı sıra HNB ile görsel tespit gerçekleştirilmiştir. Bu alternatif metodun prensibi

araştırmacılar tarafından şu şekilde izah edilmiştir: Metal iyon indikatörü HNB boyası sayesinde Mg^{+2} iyon konsantrasyonunun azalmasına takiben reaksiyon karışımında renk değişimi meydana gelmektedir. Bunun yanında SYBR green boyası; çift zincirli LAMP ürünleriyle etkileşerek UV veya gün ışığı altında floresan özellik sergilemektedir (Şekil 1.4).

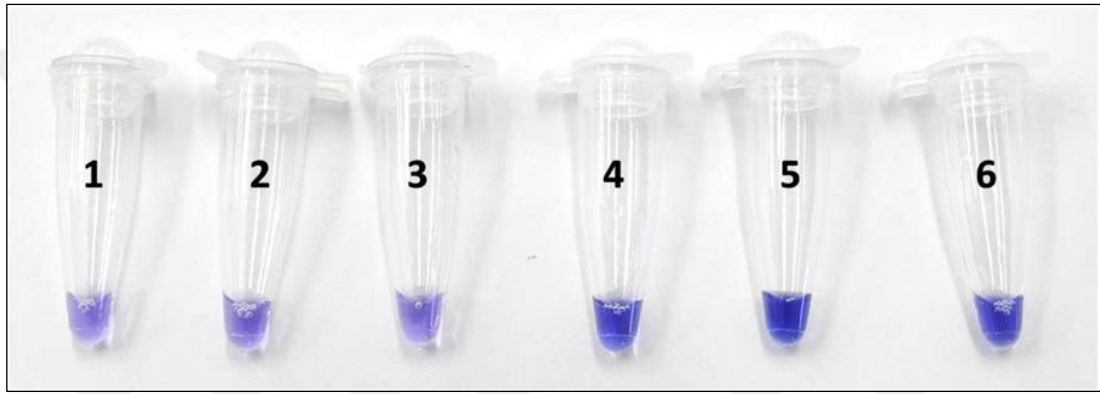


Şekil 1.4. Reaksiyon ortamında SYBR green ve HNB ile LAMP ürünlerinin belirlenmesi (Chen *et al.* 2014).

Araştırmacılar çalışma sonucunda LAMP yöntemiyle süt, kan ve hayvansal kaynaklardan *C. burnetii* analizinin yapılabileceği ve bu şekilde hızlı bir belirlemenin gerçekleşeceğini bildirmişlerdir.

Niessen *et al.* (2013) bakteriyel patojen ve fungal kontaminantların analizlerinde LAMP uygulamalarını geniş kapsamlı bir derleme ile göstermişlerdir. Araştırmacılar 2000’li yıllardan itibaren bu yöntem ile çalışmaların arttığını ve PCR gibi nükleik asit bazlı yöntemlere alternatif olduğunu vurgulamışlardır. Özellikle PCR yönteminde kullanılan bazı ekipmanların LAMP uygulamasında zorunlu olmaması bir avantaj olarak görülmektedir. Genomik örneklerin yüksek saflıkta hazırlanması ve inhibitör içermemesi PCR için çok önem arz ederken; LAMP yönteminin inhibitörlere karşı düşük duyarlılıkta olduğu da izah edilmiştir. Gıda mikrobiyolojisi alanında yüksek kaliteli yayınların yer aldığı bir dergide yayınlanan çalışmada sonuç olarak; LAMP yönteminin otomasyon ve yeni dizaynlarla gelişmeye açık olduğu ve gıda analizlerinde daha da etkili olacağı bildirilmiştir.

Ferrara *et al.* (2015) yaptıkları bir çalışmada gıda güvenliği açısından gıda kaynaklı küflerin hızlı, düşük maliyetli, basit bir yöntemle belirlenmesinin önemine değinerek *Penicillium nordicum* küfünün teşhisi için LAMP yöntemi geliştirmişlerdir. *P. nordicum* özellikle kurutulmuş et ürünleri gibi yüksek proteinli gıdalarda ochratoxin A (OTA) üretebilmektedir. Çalışmada; LAMP reaksiyonu boyunca amplifikasyonun doğrudan tüp içerisinde HNB boyasının mor menekşe renginden mavi renge dönüşümüyle çıplak gözle görülebileceği rapor edilmiştir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. *Penicillium nordicum* küfüne ait LAMP reaksiyon ürünlerinin HNB ile tespiti (Ferrara *et al.* 2015)

Araştırmacılar; Şekil 1.5’de görüldüğü üzere 4-6 tüplere *P. nordicum* ITEM 9634 kültürü inoküle edilmiş kurutulmuş et ürünlerinde 5 gün inkübasyondan sonra DNA ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. 1-3 tüplere ise herhangi bir inokülasyon yapılmamıştır. Mor menekşe rengin değişmemesi amplifikasyonun negatif, mavi renge dönüşüm ise amplifikasyonun pozitif olduğunu göstermektedir. Analiz yönteminin küfe ait 100 fg genomik DNA veya 10^2 konidium seviyesinde belirleme gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak; kurutulmuş et ürünlerinde *P. nordicum*’un belirlenmesi ve tanımlanmasında hızlı bir DNA ekstraksiyon metoduyla LAMP yönteminin uygun olacağı gösterilmiştir.

Mohon *et al.* (2014) Symptomatic Falciparum Malaria (septomatik sıtma) hastalığına sebep olan *Plasmodium falciparum*’un hızlı, ekonomik ve etkin belirlenmesi amacıyla

LAMP reaksiyon karışımında 120 µM Hydroxynaphthol Blue (HNB) boyası kullanarak yeni bir LAMP metodu geliştirmişlerdir. Bu yeni yöntem ile kan örneklerinden 5 parazit/µL seviyesinde 35 dakikada sonuç alınmıştır. Ayrıca, LAMP yöntemini qPCR ile karşılaştırmış ve %98.1 oranında hassasiyet gösterdiğini belirlemişlerdir. Bunun birlikte araştırmacılar, LAMP yönteminin geniş ölçüde kullanımı ve geliştirilmesiyle PCR gibi moleküler yöntemlere alternatif olabileceği sonucuna varmışlardır.

Kumar and Mondal (2015) LAMP ile süt ve meyve sularında *Escherichia coli*'nin görsel belirlenmesi için bir çalışma yürütmüşlerdir. HNB boyası kullanarak *E. coli*'nin doğrudan tespitinde belirlenme limiti 10^1 - 10^4 kob/mL, PCR'da ise 10^2 - 10^5 kob/mL olarak bulunmuştur. DNA ekstraksiyonunda NaOH ortamında kaynatma metodunun süt ve meyve suyundan gelen asitlikleri nötrlediği için verimi arttırdığı vurgulanmıştır. Çalışma içeriğine bakıldığında LAMP uygulaması için sıcaklık derecesi, Mg^{+2} , Betain ve dNTP konsantrasyonlarının etkileri detaylıca incelenmiştir. Ayrıca; LAMP ürünlerinin HNB boyası ile belirlenmesinin, agaroz jel ortamında görüntüleme gibi geçerli olduğu rapor edilmiştir.

Liu *et al.* (2015) tarafından *Listeria monocytogenes*'in gıdalarda aranmasında LAMP yönteminin hassasiyeti ve spesifikliğı araştırılmıştır. Yöntemin hassasiyetinin 1.7 kob/reaksiyon olduğu ve PCR'a göre 147 kat (251 kob/reaksiyon) daha hassasiyet sergilediğı görülmüştür. Yöntemin kültürel tekniğe göre %100 performans gösterdiği ve PCR yönteminin pozitif örneklerden 1 tanesini negatif olarak belirlediğı bildirilmiştir.

Zhong *et al.* (2016) gıda kaynaklı önemli bir patojen olan *Vibrio parahaemolyticus*'un belirlenmesi için propidium monoazide (PMA) boyası ile kombine edilmiş LAMP yöntemini geliştirmiş ve yöntemin uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. Bu kombinasyonun seçilmesindeki sebebin hedef patojenin canlı fakat standart besiyerlerinde kültürü yapılamayan (viable but non-culturable, VBNC) formunun tespiti olduğu bildirilmiştir. Çalışmaya baktığımızda; bu formda olan bakteriler kültürel yöntemlerle belirlenemediğı için bu yöntemin seçilmesinin önemli olduğu

görülmektedir. Bu çalışma VBNC formundaki bakterilerin belirlenmesi açısından yol göstericidir.

Hong (2017) tarafından gıdalarda enterotoksijenik *Clostridium perfringens*'in hızlı tespiti için LAMP metodu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında yapay olarak kontamine edilmiş gıdalardan DNA ekstraksiyon metotları da (kaynatma, NaOH uygulaması, manyetik ayırma) incelenmiştir. *C. perfringens*'e ait 15, farklı bakterilerden 30 suş kültürü LAMP hassasiyetinin belirlenmesi için gıdalara kontamine edilmiştir. 15 adet hedef suşun yöntem ile doğrulandığı ve DNA ekstraksiyonu için manyetik partiküllerle ayırma yönteminin yüksek verimlilik gösterdiği bildirilmiştir.

Yukarıda bazı çalışmalara ait sonuçlar çıkarımlarla birlikte verilmiştir. Bu çalışmalar genellikle materyallerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinin yanısıra; yöntemlerin bu belirlemede validasyonu, hızı, spesifikliği, hassasiyeti gibi özelliklerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Bu araştırmada;

1. Öncelikle *Salmonella* ve *Campylobacter* belirlenmesine yönelik nükleik asit amplifikasyonuna dayalı metotların (LAMP ve qPCR) kullanılması ve altın standart olarak kabul edilen geleneksel kültürel metotlara alternatifliğinin araştırılması,
2. Bilimsel çalışmalarda sıklıkla kullanılan qPCR ve LAMP metotlarının üstünlüklerinin kıyaslanması, yüksek maliyetli cihazlara gereksinim duyan PCR yöntemine alternatif olarak LAMP uygulamasının kullanılıp kullanılamayacağının belirlenmesi,
3. Bununla birlikte; hem geleneksel hem de bu nükleik asit temelli yöntemlerle teşhis edilecek ve tanımlanacak patojenlerin prevalansının belirlenmesi, tavuk etlerinin genel mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması gerçekleştirilecektir. Ayrıca; *Salmonella*, *Campylobacter*, *S. aureus*, *Listeria* spp. belirlendiği takdirde antibiyotik duyarlılıklarının tespiti amaçlanmaktadır.

Real-time temelli metodlar kantitatif bilginin yanında kalitatif verilerde sunmaktadır. Klasik PCR'dan farklı olarak görüntüleme cihazına ihtiyaç duyulmadan amplifikasyonun florometrik olarak takip edildiği bu yöntemde sonuç daha kısa sürede alınabildiğinden tavuk etlerinde etkenlerin teşhisi hızlı bir şekilde yapılabilecektir.

LAMP yöntemini seçmemizin en temel sebepleri; ülkemizde gıda alanında bu metot ile gerçekleştirilen yeterli sayıda çalışmanın mevcut olmaması, diğer moleküler metotlara alternatif olup olamayacağının araştırılmamış olmasıdır. Ayrıca LAMP reaksiyonunun sonucunun belirlenmesi amacıyla doğrudan ortama HNB ilavesinin uygun, sağlıklı ve ekonomik bir yöntem olma durumu incelenecektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Tavuk Eti ve Mikrobiyolojisi

Tavuk etleri, kavramsal olarak *Gallus gallus* türlerinin tüm karkasını, parçalanmış kemikli kısımlarını veya karkasın bir kısmını temsil eder. Tavuk etleri, tüketiciler arasında son 30 yılda popüler hale gelmiştir. Gerek fiyatı, kolay bulunabilirliği, besleyici değerlerinin yüksek olması, sindirilebilirliği (protein kalitesi) gibi özelliklerden dolayı tercih sebebi olmuştur. Kısaca; duyuşal özellikleri ve besleyiciliğinin yanı sıra düşük maliyetinden dolayı popüler hale gelmiştir. Ayrıca, son çeyrek yüzyılda kümes hayvanları işletmeciliğinin teknolojik yeniliklere ayak uydurmasıyla tüketicilere daha güvenli ve kaliteli ürün ulaştırmak kolay hale gelmiştir. Bu avantajlarıyla tavuk etleri her bütçeden insanlara hitap etmektedir. Tavuk etlerinde kalite, makro ve mikro besin içeriğinin yanı sıra mikrobiyolojik değerlerle birlikte ele alınır. Tüketicinin sağlığını etkileyecek patojen mikroorganizma bulaşmamış ve mikroorganizmalar tarafından arzu edilmeyen biyokimyasal değişimlere maruz kalmamış tavuk etleri sağlıklı ve kaliteli olarak değerlendirilebilir (Mead 1995; Bhaisare *et al.* 2014).

Tavuk etleri yüksek su içeriği, azotlu bileşenleri, vitamin ve mineral gibi diğer büyüme faktörleriyle bakteriyel üreme için ideal bir ortamdır. Ayrıca, pH ve su aktivitesi (a_w) (0.98-0.99) üreme için de uygundur. Tavuk etlerinin pH değeri 6.2-6.4 arasındadır. Tavuk etlerin gerek su aktivitesi, gerek pH değeriyle çeşitli mikroorganizmalar için uygun bir çoğalma ortamı olarak kabul edilebilir (Çetin 2006).

Tavuk etlerinin mikrobiyolojisi, işlenmemiş ürünlerin depolama boyunca hem raf ömrü hem de gıda kaynaklı patojenlerin sebep olabileceği hastalıklar açısından önemlidir. Tüketicilerin bu tehlikelere karşı bilinçlenmesi, yetkili otoritelerin denetim ve standartları bu iki önemli hususun kontrolü için öncelik teşkil etmektedir.

Pazarlama ve üretim aşamasında tavuk etlerinin mikrobiyolojik yükü temelde süre, sıcaklık ve başlangıçtaki mikrobiyal yük gibi üç faktöre bağlıdır. İşlenmemiş tavuk etlerinin depolama sıcaklığının 0°C’de olması mikroorganizmaların çoğalmasını kontrol altına almak için yeterlidir. Düşük mikrobiyal yük ve uygun sıcaklık değerleri ürünün raf ömrünü uzatabilir. Sıcaklık koşullarının 5°C’den 0°C’ye getirilmesiyle raf ömründe üç günlük bir uzama söz konusu olmaktadır. Tavuk etlerinin mikroorganizma yükü ile bozulma arasında bir korelasyon olduğu yapılan araştırmalar neticesinde görülmüştür. Ekşimsi bir kokunun oluşması; mikrobiyal yükün milyon, sümüksü bir bozulmanın görülmesi ise 100 milyon seviyesinde mikrobiyel bir yükün olduğunu göstermektedir (Wabeck 2002).

Bozucu mikroorganizmalar yağ ve proteinleri parçalama neticesinde, diğer biyokimyasal değişimlerle arzu edilmeyen tat ve kokuya sebep olurlar. *Pseudomonas* cinsi bakteriler çiğ tavuk etlerinde bozulmanın en büyük etkenidir. Bu cins bakteriler mikrobiyal yük içerisinde düşük seviyede olsa bile işleme sırasında, özellikle soğukta depolama aşamasında hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Bu bakteriler, kuvvetli proteolitik enzimleri sayesinde, tavuk etlerine özgü mikrobiyal bozulma belirtisi olan kokunun yanı sıra, UV ışığı altında görülebilen yeşil renkli pigmentlerin sebebidir (Mead 2004b).

Koliform grubu bakteriler, öncelikle *Escherichia* ve *Enterobacter* cinsi bakteriler tavuk etlerinde hijyen koşullarının ve patojenik bakterilerin varlığının bir indikatörü olarak görülmektedir. *Escherichia coli* baskın tür olarak bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar, hayvanın bağırsak sistemlerinden, işleme sırasında temizlik kurallarına uymayan personelden ürüne geçebilmektedir. Bu mikroorganizmaların seviyesi, işletmede dezenfeksiyon ve sanitasyon uygulamalarının bir ölçütü, işleme boyunca kontaminasyon ve/ya çapraz kontaminasyonun derecesini gösteren bir faktör olarak değerlendirilir. Genellikle sıcaklık koşullarının $\leq 4.4^{\circ}\text{C}$ olduğunda bu mikroorganizmaların çoğalması durmaktadır (Wabeck 2002; Khalafalla *et al.* 2015).

Tüketim için işlenmeye hazır tavuk etlerinde düşük sayıda koliform grubu varlığı, toplam bakteriyel sayının düşüklüğünü göstermenin yanı sıra ilave muhafaza

yöntemlerinin uygulandığının göstergesi de olabilir. Çünkü; koliform grubu bakteriler fakültatif anerob özelliğe sahiptirler ve karbondioksit veya azot içeren atmosferik ortamlarda muhafaza edilen tavuk etlerinde psikrofil koşulda bile çoğalabilirler. Bu mikroorganizmaların hijyen ve sanitasyon uygulamalarıyla kontrol altında tutulması önem arz etmektedir (Wabeck 2002).

2.2. Tavuk Etlerinde Patojen Mikroorganizmalar

Gıda patojenlerinden kaynaklanan birçok rahatsızlık kontamine olmuş tavuk etlerinin tüketimiyle ilişkilidir. Bu ilişki çiğ ürünün patojen mikroorganizmalarla kontaminasyondan sonra çapraz kontaminasyona yol açabilmesiyle yorumlanmaktadır. Kontamine olmuş çiğ üründen işlenmiş ürüne, ürün hazırlama alet-ekipmanlarına (tahta, bıçak gibi) patojenler taşındığında risk ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, ürünler yetersiz ısı ileme tabi tutulduğunda patojen mikroorganizmalar inhibe olmadıklarından uygun koşullarda çoğalarak tüketiciye taşınabilir (Yüksel vd 2013).

Tavuk etleri; *Salmonella*, *Campylobacter*, *S. aureus*, *E. coli* ve *Listeria* gibi patojenik mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir. Bazı durumlarda da *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp. ve *Cl. perfringens* potansiyel olarak bulunabilmektedir. Ancak, *Salmonella*, *Campylobacter*, az oranda *Listeria* kanatlı etlerinde en önemli gıda kaynaklı patojenler olarak kabul edilmektedir. Normalde sağlıklı tavukların etlerinde patojen mikroorganizma bulunmaz. Fakat kesim esnasında fekal maddelerden karkas yüzeylerine bulaşma ve işleme sürecinde çevre, alet-ekipman, personel gibi etkenlerden dolayı çapraz kontaminasyon olabilmektedir (Bhaisare *et al.* 2014).

Yukarda bahsedilen patojenlerin çoğu gastroenterit (mide ve bağırsak) rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Elde edilmiş veri ve istatistiklere bakıldığında *Salmonella* spp. bu tip rahatsızlıklara öncülük etmektedir. *Campylobacter* spp. ise bakteriyel gastroenterit vakalarının çoğunluğundan sorumlu olmasına rağmen, vakalarla bakteri arasında ilişki izolasyon ve belirlemenin zorluğu veya hatalı tanımlardan dolayı tam kurulamamaktadır (Satin 2002; Ellerbroek 2004).

2.2.1. *Campylobacter* spp. ve kampilobakteriyozis

2.2.1.a. Genel özellikleri

Campylobacter cinsi bakteriler 0.2-0.8µm×0.5-5µm boyutlarında Gram negatif, mikroskopik olarak ince spiral kıvrık görünümlü, iki veya daha fazla hücrenin birbiriyle S veya V şeklinde grup oluşturma özelliğindedirler. Türlerin çoğu sarmal olarak kıvrılan tipten hareket kabiliyetine sahiptir (Gültekin Debruyne ;2008*et al.* 2008).

Campylobacter cinsi; 2010 yılındaki veriler itibarıyla 32 tür (species) ve 13 alt tür (subspecies) içermektedir. Bazı türlerin insan ve hayvan sağlığı için tehlikeli olduğu bilinmektedir. Gıda kaynaklı rahatsızlıklara bakıldığında termofilik türlerin ön plana çıktığı, bunlar arasında *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* türlerin yer aldığı belirtilmektedir (Euzéby 2010; EFSA 2013; Euzéby 2014; Frasao *et al.* 2017).

C. gracilis haricindeki türler oksidaz aktivitesi gösterirler. Karbonhidratları okside edemez ve fermentasyona uğratmazlar, bunun yerine amino asitlerden veya trikarboksilik asit döngüsü ara maddelerinden enerji sağlarlar. *Campylobacter jejuni* hippüratı ve indoksil asetatı hidrolize eder, nitratları redükleyebilir (Vandamme 2000).

Bu bakteriler olumsuz çevre şartlarında VBNC formuna geçerler (Portner *et al.* 2007). Cappelier (1997) tavuk çiftliklerinin çevresindeki topraklardan bu bakterileri VBNC formda gözlemlemiştir. Bu formdaki bakteriler tavukların intestinal sistemine transfer edildiğinde çoğaltılıp kültüre edilebildiği bildirilmiştir (Cappelier 1997).

Campylobacter spp. obligat mikraerofiliktir ve genellikle 37°C’de çoğalabilirler. Ancak *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* gibi türler 42°C’de de üreyebilirler. Bu mikroorganizmalara termofilik *Campylobacter* türleri denilmektedir. Termofilikler içerisinde en sık karşılaşılan *C. jejuni* ve *C. coli*’nin tespitinde bu özellikten faydalanılır. 42°C’de *C. jejuni* ve *C. coli* hızlı ürer, bunun yanında diğer fekal kaynaklı bakterilerinin

üremeleri baskılanır (Erdem vd 1999).

Termofilik *Campylobacter* türleri 37-42°C arasında, optimum 41,5°C çoğalabilirler. 30°C'nin altındaki sıcaklıklarda ise çoğalamazlar. Çünkü düşük sıcaklıklara uyumu sağlayan soğuk şok protein geni yoktur. Levin (2007) bu mikroorganizmalar 55°C ve üzerinde termofilik özellik taşımadığından literatürde termotolerant olarak refere etmektedir. Bu türler su aktivitesi (a_w) 0,987'nin altında olan çevre şartlarında çoğalamazlar ve NaCl konsantrasyonu %2'nin üzerinde olduğu koşullara karşı da hassastırlar.

Dondurma-çözündürme (Freezing-thawing) işlemlerine karşı çok hassas olan bu bakterilerin popülasyonu zamanla azalır. Saf kültürlerle yapılan deneysel çalışmalarda, *Campylobacter* spp. -15°C'de 3 gün gibi bir sürede inaktif hale gelmektedir. Ancak kontamine olmuş gıdalarda dondurma işlemi bu patojeni tamamen elemine etmez (Stern and Kotula 1982; Lee *et al.* 1998). Hazeleger *et al.* (1995) yaptıkları çalışmalarda *C. jejuni*'nin 4°C'de daha uzun dayandıklarını belirlemişlerdir. *Campylobacter* spp. pH 4,9'un altında, 9,0'un üstünde çoğalamazlar. En uygun pH değeri 6,5-7,5'tir.

Spor oluşturmeyen, besiyeri açısından seçici ve hassas olan (fastidious) bu bakteriler genelde mikroaerofiliklerdir. Oksijen bakımından en iyi gelişme, oksijenin düşük oranda (%5 O₂, %10 CO₂ ve %85 N₂) olduğu ortamlardır (Garénaux *et al.* 2008).

Kampilobakteriyozis salgınlarının sayısı düşük olmasına rağmen, *Campylobacter* spp. gastroenterit rahatsızlıkların başta gelen sebeplerinden biri olarak düşünülmektedir. *C. jejuni* ise klinik vakalarda en sık rastlanan türdür. Kanada, İngiltere ve daha birçok ülkede Kampilobakteriyozis vakalarının salmonellozis ve şigellozis vakalarından daha çok olduğu bildirilmektedir. Kampilobakteriyozis genellikle yaz aylarında meydana gelmekte ishal, kanlı ishal, ateş, karın ağrıları, mide kramplarının yanısıra reaktif artrit (ReA), pankreas iltihabı, menenjit, kalp iç zarı iltihabı, Guillain-Barré syndrome gibi rahatsızlıklarla kendini göstermektedir. Guillain-Barré syndrome, bir periferik sinir sistemi rahatsızlığı olup, otoimmün sistemini etkilediğinden dolayı akut sarkık felç ile

sonlanmaktadır. Özellikle bu rahatsızlıklarının çoğunun klinik olarak *C. jejuni* ilişkili enfeksiyonlarla ortaya çıktığı düşünülmektedir (Chan *et al.* 2001; Gilbert and Slavik 2004; Yan *et al.* 2005; Ray and Bhunia 2008).

Çiğ, işlenmemiş ve yetersiz ısıl işlemle hazırlanan tavuk etleri *Campylobacter* enfeksiyonlarının öncelikli kaynaklarıdır. Tavuk etlerinin büyük oranda bu patojen ile kontamine olduğu düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar sporadik kampilobakteriyozis vakalarının yaklaşık yarısının tavuk etlerinin işlenmesi esnasında veya tüketilmesiyle gerçekleştiğini göstermektedir. Ticari olarak yetiştirilen tüketime hazır kümes hayvanları etlerinin çoğunluğu *Campylobacter* türleri ile kontamine olabilmektedir. Ayrıca bu hayvanların dışkı ve salgılarıyla toprak ve su kaynakları kirlenebilmektedir. Bu enfeksiyon, kontamine olmuş gıda ve içme suyu tüketimi ile de gerçekleşmektedir. Bununla birlikte çoğu vaka raporlarında çiğ ve/veya az pişmiş kümes hayvanları etleri *Campylobacter* enteriti ile ilişkili bulunmuştur (Meng and Doyle 1998; Chan *et al.* 2001; Inglis *et al.* 2004).

Literatüre önemli veriler sağlayan Mead (2004a) kampilobakteriyozis vakalarının zamanla azalmasını veya sporadik olarak gerçekleşmesini, kümes hayvanları üretim ve işleme tesislerine yönelik yasal düzenlemelerin ve kontrol önlemlerinin etkili olduğunu rapor etmiştir.

Campylobacter tavuklarda sınırlı sayıda enfeksiyona sebep olmakta veya hastalığın klinik belirtileri görülmemektedir. Böylece uzun bir süreçte (43 gün) intestinal sistemden atılan fekal içerikler tavuk karkaslarının kontamine olma riskini artırmaktadır (Sahin *et al.* 2001; Inglis *et al.* 2004). Bu mikroorganizmaların kültüre edilmesi zor olduğundan, *Campylobacter* salgınlarının sebebi doğru olarak yorumlanamamıştır. *C. jejuni* soğutma ve dondurma koşullarında canlı kalma kabiliyetine sahiptir. Diğer mikroorganizmalar gibi *C. jejuni* stres proteinleri üretir ve böylece olumsuz çevre şartlarına karşı daha dayanıklı hale gelir. Özellikle tavuk etlerinin soğuk zincirle muhafaza edildiği düşünüldüğünde bu mikroorganizmanın halk sağlığı ve gıda

güvenliği açısından önemi ortaya çıkmaktadır (Chan *et al.* 2001; Gilbert and Slavik 2004).

2.2.1.b. Antibiyotik dirençleri

Campylobacter spp. florokinolon tipi antibiyotiklere karşı edinilmiş ve çapraz dirence sahiptir. İnsan kaynaklı izolatların yaklaşık %40'nın siprofloksasin'e karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Olah *et al.* 2006). Kümes hayvanları kaynaklı izolatların ise tetrasiklin'lere dirençli, siprofloksasin'e karşı daha düşük oranda dirençli olduğu bildirilmiştir. Tavuk etlerinde *Campylobacter* spp.'nin böyle direnç göstermesi özel bir öneme sahiptir (Ursinitsch *et al.* 2004). Direncin hızlı bir şekilde ortaya çıkması, kümes hayvanlarında kullanılan ilaçlara bağlanmaktadır. Ayrıca, dirençlilik kazanan türler olumsuz çevre koşullarına karşı daha uyumlu hale gelmektedir (Mead 2004; Yan *et al.* 2005). Bu antimikrobiyal direncin mekanizması bakteriye multi-drug efflux pumps (çoklu ilaç dışı akış pompası) ile izah edilmektedir. Bu mekanizma ile antimikrobiyal maddeler bakteri hücresinden uzaklaştırılmaktadır (Olah *et al.* 2006).

2.2.1.c. *Campylobacter* spp. izolasyonu, belirlenmesi ve tanımlanması

Campylobacter spp. oksijen ve okside edici radikallere karşı hassas olduğundan analizler için birkaç seçici besiyeri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri defibrine edilmiş kan, demir (Fe^{+2}), piruvat gibi oksijen indirgeyiciler ve çeşitli kimyasallar (özellikle antibiyotikler) içerir. Geliştirilmiş metotların çoğunda öncelikle sıvı besiyerinde ön zenginleştirme işleminin ardından selektif katı besiyerlerine ekim yapılır. Bu metodolojinin prensipleri ISO (International Organization for Standardization, Uluslararası Standartlar Teşkilâtı) tarafından sunulan standart metot yönergelerinde izah edilmiştir (ISO 2006).

Gıda örneklerinde zarar görmüş bakterilerin geri kazanımı için bazal sıvı besiyerlerine kimyasallar ilave edilmeden öncelikle 37°C, sonrasında 41,5°C'de inkübasyon yapılır.

Ancak; bu uygulama sıvı besiyerlerinde tavuk etlerinden maksimum sayıda izolasyon için tek başına yeterli değildir (Mason *et al.* 1999).

Ön zenginleştirme amacıyla Bolton brot (BB), *Campylobacter* enrichment brot (CEB) ve Preston brot (PB) gibi seçici besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri genellikle Oxyrase denen ve sıvı ortamlarda çözünmemiş oksijeni gideren enzim içerirler. Bu enzim özellikle doğal olarak kontamine olmuş örneklerden *Campylobacter* spp.'nin izolasyonunu geliştirmekte ve oksijenin seviyesini etkili bir şekilde indirgemektedir. Ancak kan ilavesi yapılmış sıvı besiyerlerinde bu enzim gerekmez, özel olmayan atmosferik koşullarda izolasyon yeterli şekilde yapılmaktadır. Seçici katı besiyerlerinde izolasyon için Preston, charcoal cefoperazone deoxycholate (CCDA) ve Butzler agar gibi besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerlerinin performans açısından birbirleriyle eşit olduğu bildirilmektedir. CCDA besiyerinde inkübasyon 37°C'den ziyade 42°C'de yapılması önerilmektedir. Bu sıcaklık değerinde izolasyon oranı arttığı vurgulanmaktadır (Zanetti *et al.* 1996; Abeyta *et al.* 1997; Tran 1998; Baylis *et al.* 2000).

ISO standartlarında en güncel kültürel metodolojide *Campylobacter* spp.'nin hem izolasyon hem de sayımında mCCDA kullanımı tavsiye edilmektedir. Bolton brot ön zenginleştirme aşamasında kullanıldığında mikroaerofilik ortamda 37°C'de 4-6 saat, 42°C'de 40-48 saat inkübasyondan sonra mCCDA ve diğer katı besiyerlerine ekim yapılır. Bu metot prensipte kolay olsa da rutin laboratuvar ortamlarında hem kültürleri izole etmek hem de referans kültürleri muhafaza etmek zordur.

Campylobacter spp. belirlenmesinde yukarıda bahsedilen metodoloji altın standart olarak kabul edilmekle birlikte kısa süre içerisinde tür düzeyinde tanımlamaya imkan sağlayan, yüksek duyarlılığa sahip moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Daha hızlı sonuç veren bu tekniklerde, en çok real-time PCR ve multipleks PCR kullanılmaktadır (Persson *et al.* 2005; Schuurman *et al.* 2007). Bu metotların yanında fluorescence *in situ* hybridization (FISH), latex agglutination, fiziksel zenginleştirme (filtrasyon) gibi birkaç metot geliştirilmiştir. *C. coli* ve *C. jejuni* ayrımı için yapılan

hipürat hidroliz testini okumak ve yorumlamak bazen fenotipik reaksiyonlardan dolayı zorlaşmaktadır. Bu sebeple bu metotlar içerisinde en etkili olanı PCR'dır. PCR metodu immunomanyetik separasyon ile kombine edildiğinde 6 saat gibi kısa bir süre içerisinde düşük seviyede kontaminasyon olan örneklerde bile hızlı belirleme yapılabilmektedir (Docherty *et al.* 1996; Waller and Ogata 2000).

Gıda örneklerinden real-time PCR ile tavuk etlerinden 1 kob seviyesinde, 2 saatten kısa sürede belirleme yapıldığı bildirilmiştir (Debretsion *et al.* 2007). Epidemiyolojik çalışmalarda da moleküler tiplendirme amacıyla PCR, random amplification of polymorphic DNA (RAPD) ve pulsed field gel electrophoresis (PFGE) gibi tekniklerden yararlanılmaktadır.

2.2.2. *Salmonella* spp. ve salmonellozis

2.2.2.a. Genel özellikleri

Salmonella spp. *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alan Gram negatif, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen fakültatif anaerob bakterilerdir. *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hariç tüm *Salmonella* türleri peritrik flagellaları ile hareket kabiliyetine sahiptirler (Tindall *et al.* 2005).

Salmonella bakterisinin sebep olduğu salmonellozis salgınının ilk defa laboratuvarda doğrulanması, 1888 yılında Gaertner tarafından sığırdan ve bu hayvanın etini tüketen bir insanın intestinal organlarından *Bacterium enteritidis*'in (*S. Enteritidis*) izole edilmesiyle gerçekleşmiştir (Bell and Kyriakides 2002).

Salmonella'nın üreme ve gelişimi sıcaklık, pH, su aktivitesi, nutrientler gibi birçok faktöre bağlıdır. *Salmonella*'ların gelişimi için gereken optimal a_w 0,99 olmasına rağmen, büyük bir kısmının 0,93 gibi düşük a_w değerinde canlılıklarını sürdürebilmektedir. Gelişim için optimal pH değeri 6,5-7,5 arasındadır; ancak 4,5-9,9

pH aralığında üreme yeteneğine sahiptir. Yapılan bir çalışmada *S. Pullorum*, *S. Oranienburg* ve *S. Senftenberg*'in sıvı yumurta albümini içindeki gelişiminin pH değeri 8'e yaklaştıkça ilerleyen bir şekilde azaldığı, pH değeri 9,5'in üzerinde olduğunda gelişemediği bildirilmiştir. *Salmonella* spp. 5-47°C arasında üreyebilmekte, optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir (Yüksel 2013).

Salmonella bakterisi, son yüzyılda epidemiyolojik olguların istatistiksel olarak detaylı şekilde kayda alınmasından sonra, birçok ülkede gıda zehirlenmelerinin birincil ve en yaygın sebeplerinden birisi olarak tespit edilmiştir. Salmonellozisi önlemeye yönelik iyi hazırlanmış talimat ve yönergelerle rağmen, *Salmonella* ile ilişkili olguların insidensi ve şiddeti bazen artış gösterebilmektedir (Alakomi and Saarela 2009; Lee *et al.* 2015).

Salmonellozis vakalarının çoğunluğu (%80) self-limiting (kendiliğinden geçen) olarak adlandırılan olgulardır. Yani bu zehirlenmeye ait belirtiler görüldükten sonra iyileşme olabilmektedir. Sınıflandırmaya göre 2616 *Salmonella* serotipi olmakla birlikte, Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde insanlarda zehirlenme vakalarında *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ve *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) en yoğun karşılaşılan serotiplerdir (Guibourdenche *et al.* 2010; Lee *et al.* 2015; Ryan *et al.* 2017).

2.2.2.b. Antibiyotik direnci

U.S. Food and Drug Administration'a göre 2003 yılından beri *Salmonella* spp.'nin yanı sıra diğer bakterilerde ortaya çıkan antimikrobiyal direnç halk sağlığı için global bir tehdit olarak değerlendirilmektedir. Çoklu antimikrobiyal direnç kazanmış hayvan kökenli *Salmonella* serovarlarının insanlara taşınması bu durumu daha önemli hale getirmektedir. Tetrasiklin, ampisillin, kloromfenikol, streptomisin, nalidiksik asid, trimetoprim gibi antibiyotiklere karşı dirençlilik tavuk etlerinden izole edilen serovarlarda sıklıkla görülmektedir (Mouttoutu *et al.* 2017).

2.2.2.c. *Salmonella* spp. izolasyonu, belirlenmesi ve tanımlanması

1. Geleneksel kültürel metot

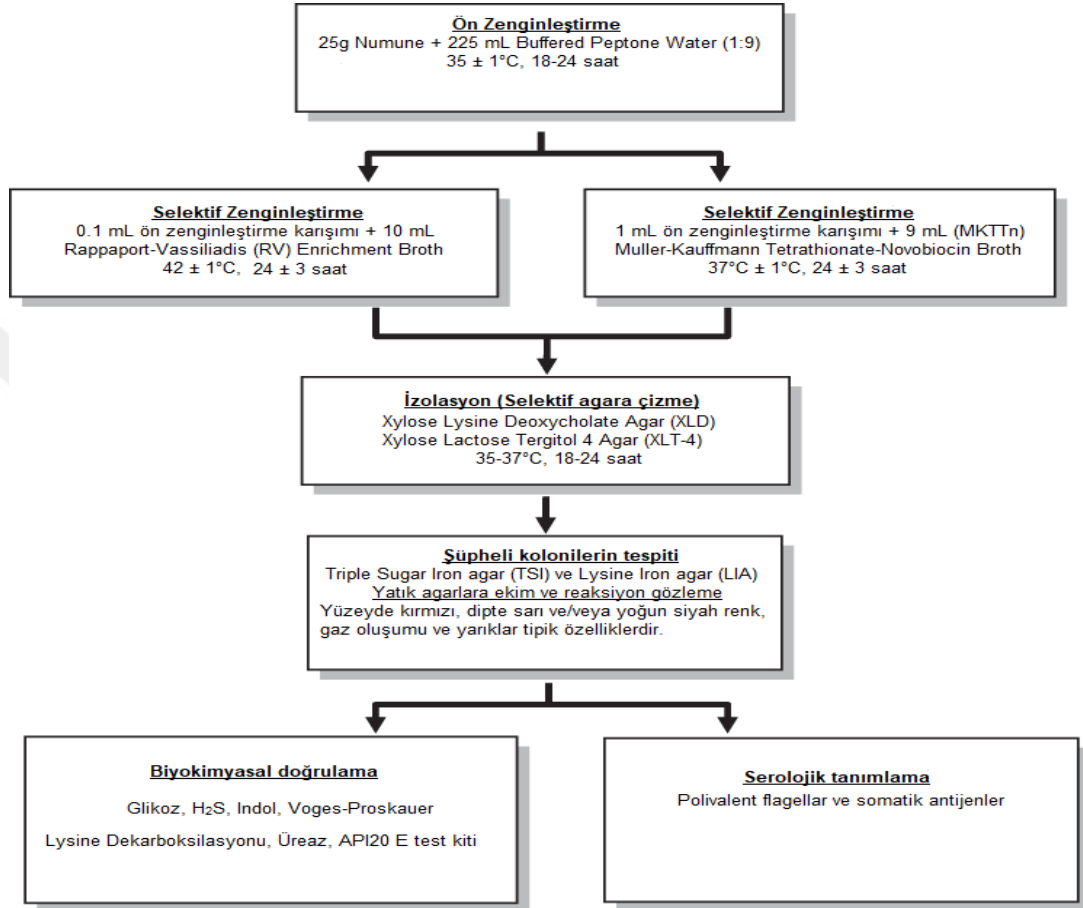
Salmonella türlerinin çoğu insan için ölümcül olarak düşünülmemekle birlikte, ölüm oranı az olsa bile tehlikeli boyutlarda gıda zehirlenmelerine sebep olabilmektedir. Bu sebeple bir örnekte bir hücrenin tespitini yapabilecek kadar hassas, etkili, spesifik metotların geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (Lee *et al.* 2015).

Salmonella gözetim ve izleme prosedürleri etkili ve güvenilir belirleme yöntemlerine dayandırılmaktadır. Böylece, gıda güvenliğini geliştirmeye yardımcı olunmaktadır. Bu gözetim ve izleme süreci; kontaminasyona sebep olan kaynağın tespitiyle başlamakta ve gıda zincirinin tümünü kapsamaktadır (Rodríguez-Lázaro *et al.* 2007; Alakomi and Saarela 2009).

Uluslararası ölçütte *Salmonella* analizi, gözetim ve izleme çalışmaları standart hale getirilmiştir. International Organization for Standardization (ISO) tarafından ISO 6579:2002 kodlu düzenleme uzun süre yürürlükte kaldıktan sonra, 2017 yılında ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain (Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* -- Part 1: Detection of *Salmonella* spp.) olarak revize edilmiştir (ISO 2017).

Geleneksel olarak *Salmonella* spp. izolasyonu; belirli hacim veya ağırlıktaki örneğin selektif olmayan ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif agarlara ekim, şüpheli kolonilerin biyokimyasal ve serolojik tanımlamalarını içermektedir. Analizin zenginleştirme basamağı International Organization for Standardization (ISO), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), U.S. Food and Drug Administration (FDA) ve Food Safety and Inspection Service (FSIS) gibi uluslararası kuruluşlar tarafından standart hale getirilmiştir. Ön zenginleştirme amacıyla buffered peptone water (BPW), selektif zenginleştirme aşamasında ise Rappaport-Vassiliadis

(RVS) ve Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTn) kullanılmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Geleneksel kültürel yöntemle *Salmonella* spp. izolasyonu (Lee *et al.* 2015)

Genel olarak ön zenginleştirmede kullanılan sıvı besiyerleri seçici olmayıp, örneklerde zarar gören hücrelerin onarımını sağlamaktadır. Karışık mikrobiyotada rekabetçi mikroorganizmaları inhibe etmek amacıyla selektif zenginleştirmede besiyerlerine brilliant green, thiosulphate, deoxycholate, malachite green, novobiocin, tetrathionate, cycloheximide, nitrofurantoin, ve sulphacetamide gibi maddeler de katılabilir. Selektif zenginleştirme basamağında kullanılan bu maddeler rekabetçi mikrobiyotayı inhibe ederek, izolasyonun etkinliğini ve seçiciliğini artırmaktadır. Bu şekilde selektif zenginleştirme besiyerlerinde yaklaşık olarak 10^4 kob/mL seviyesinde bulunan mikroorganizma selektif agarlarda izole edilebilmektedir.

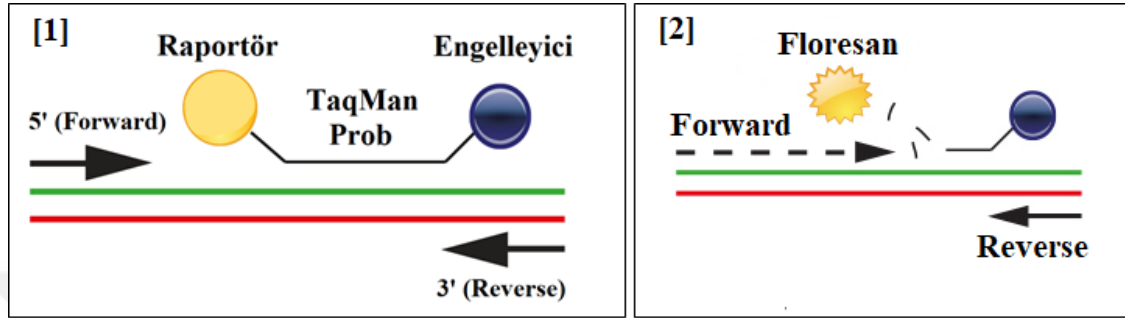
İzole edilen şüpheli koloniler triple sugar iron agar (TSI) and lysine iron agar (LIA) ile hazırlanmış yatık agarlara usulüne göre ekildikten sonra tipik reaksiyonlar gözlemlenir. *Salmonella* spp.'ye özgü reaksiyonlar belirdikten sonra şüpheli kolonilere diğer biyokimyasal testler uygulanır. Bu biyokimyasal testlerin minyatürize edilmiş hali olan API20 E test kiti kolaylık sağlamaktadır (Sørensen *et al.* 2004).

2. Real-time PCR (qPCR) metodu ve *Salmonella* belirlenmesinde kullanımı

1990'lı yıllardan beri, tek bir aşamada Ds-DNA'lara özgü floresan boyaların veya DNA problarının kullanımıyla belirlemenin yapıldığı ikinci nesil PCR teknolojileri geliştirilmiştir. Bu yeni teknoloji real-time PCR olarak literatürlere geçmiş ve klasik PCR reaksiyonlarından farklı olarak tüm aşamaların kapalı bir tüp içerisinde, yanlış pozitif tanımlara sebep olan kontaminasyon risklerinden uzak bir yöntem olarak uygulanmaktadır. Real-time PCR'da veriler, PCR reaksiyonun sonundan ziyade, işlem süresince toplanmaktadır. Bu veri toplama müddetince hedef sekansın varlığıyla birlikte miktarının doğru bir şekilde ölçülmesi hedeflenmektedir. Real-time PCR'da amplifikasyonun belirlenmesi, reaksiyon boyunca floresansın ölçümüyle ilgilidir. Sonuç temelde iki kategoride yorumlanır: ds-DNA boyalarının interkalasyonu (boyanın çift zincirli DNA'lara etkileşmesi) ve sekansa özgü hibridizasyon problarının floresan rezonans enerji transferi (FRET) yöntemleridir. En çok kullanılan boya SYBR Green boyası kullanılmaktadır. Bu boya orijinal olarak floresan özellikte olmayıp, DNA'nın çoğalmasıyla interkalasyon gerçekleştiğinde floresan ışıma vermektedir (Wittwer *et al.* 1997; Daştan 2006).

SYBR Green boyası bütün ds-DNA'lara bağlandığı için özgünlüğe sahip değildir. Bu sebeple amplifikasyon gerçekleştikten sonra spesifik ve spesifik olmayan PCR ürünlerinin ayrımında erime eğrisi analizi (melting curve analysis) kullanılır. Eğer yüksek hassasiyette bir PCR analizi isteniyorsa FRET problemleri kullanılmalıdır. Bu manada genellikle TaqMan veya hidroliz ve hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır (Livak *et al.* 1995; Wittwer *et al.* 1997). Hidroliz problemlerinde (TaqMan), 5' ucunda raportör ve 3' ucunda Quencher (engelleyici) iki floresan boya ile 20-30 oligonükleotid

baz çifti kullanılır. DNA polimeraz 5' nükleaz aktivitesiyle hedef amplifikasyon ürünlerine prob bağlarını hidroliz eder. Salınan raportör boyalar engellenemediğinden kolayca belirlenebilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Real-time PCR TaqMan (Hidroliz veya Üniversal) prob yöntemi (Dall'Olio and Tizzoni 2017).

Gıdalardan *Salmonella*'nın belirlenmesine yönelik qPCR yöntemi ilk olarak 1997 yılında literatüre kazandırılmıştır (Chen *et al.* 1997a). Chen *et al.* (1997a) *Salmonella* saf kültürleriyle, *Salmonella* olmayan saf kültürler ve *Salmonella* ile doğal olarak kontamine olmuş tavuk yıkama suyu, et ve süt gibi gıdalardan qPCR metoduyla yüksek seçicilikte, doğru olarak tespit gerçekleştirmiş ve validasyon almışlardır (Chen *et al.* 1997a; Chen *et al.* 1997b). Bu yıllarda primer ve prob sekansları yayınlanmadığından, henüz uygulamalar ilerleyememiştir. Daha sonraları *invA* (*Salmonella* Invasion Gene A) kullanılarak primer ve proplar geliştirilmiştir. *invA* kullanılarak Roche Diagnostics tarafından geliştirilen Light Cycler Technology'nin FRET hibridizasyon ile kombinasyonundan yüksek seçicilik ve hassasiyette çiğ süt, sığır kıyması ve balıklarda yapılan analizlerle sonuçların mükemmel olduğu belirtilmiştir (Perelle *et al.* 2004). Tartavarthy ve Cannons (2010) tarafından *ompF* (outer membrane porin F gene) kullanılarak TaqMan proplar geliştirilmiştir. Buna benzer olarak *Salmonella* enterotoxin (*stn*) geni ile çalışmalar genişletilmiştir (Moore and Feist 2007).

Internal amplification control (IAC) ile *fimC* (fimbrial chaperone protein) (Piknová *et al.* 2005; Krascenicsová *et al.* 2008), *ssrA* (pathogenicity gene) (McGuinness *et al.* 2009), *ssaN* (Secretion system apparatus) (Chen *et al.* 2010), *hlyA* (hyperinvasive locus

A) (McCabe *et al.* 2010; McCabe *et al.* 2011; Prendergast *et al.* 2012) genlerine göre problemler hazırlanmış ve analizlerde geçerlilik alınmıştır. En çok validasyonun alındığı gen *hlyA* olup, laboratuvar araştırmalarında diğer genlere yönelik çalışmalar devam etmektedir.

2.2.3. *S. aureus* ve stafilokokal enterotoksinler

Staphylococcus aureus yaygın ve fırsatçı bir patojen olup, potansiyel olarak ölümcül, invazif enfeksiyonlardan, ciddi yüzeysel cilt hastalıklarına kadar geniş bir aralıkta rahatsızlıklara sebep olabilir (Lowy 1998). Yaygın olarak gıdaların kontaminasyonu ile insanlara taşınan bu patojen, toksin kaynaklı virülens, invaziflik ve antibiyotik direnç özelliklerinden dolayı önem arz etmektedir.

Bu mikroorganizma hem hastane kökenli hem de toplum tarafından bulaşan önemli bir patojen olarak ortaya çıkmıştır. *S. aureus* spor formuna sahip değildir. Gıda işleme ve üretim sürecinde gıdalara kontamine olabilmektedir. Geniş bir sıcaklık (7-48.5°C; optimum 35-37°C) ve pH (4.2-9.3; optimum 7-7.5) aralığında, %15 tuz konsantrasyonuna kadar çoğalabilmektedir (Le Loir *et al.* 2003; Bhatia and Zahoor 2007).

S. aureus; Gram pozitif, kok şeklinde ve fakültatif anaerobiktir. Ancak; optimum çoğalma için anaerobik koşullardan ziyade aerobik koşullar gerekmektedir (Roberts and Greenwood 2002).

İnsan burnu, cildi, açık yaralar, giysi ve yüzeyler gibi kuru ortamlarda hayatta kalabilme yeteneğindedir ve kuruluğu tolere edebilmektedir (Chaibenjawong and Foster 2011). Bu özellikler çeşitli gıdalarda çoğalma imkanı vermektedir. Ayrıca, *S. aureus* ilk kontaminasyonun gerçekleştiği eller ve yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmektedir (Scott and Bloomfield 1990; Jacxsens *et al.* 2011; Kadariya *et al.* 2014).

Bazı *S. aureus* suşları bir veya birden fazla stafilokokal enterotoksin üretme kabiliyetindedirler. Bu enterotoksinler insanlarda gıda zehirlenmelerine sebep olabilmektedir. Bir kısım gıda zehirlenme vakaları kümes hayvanlarının toksin üretilmiş etlerinin tüketimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kérouanton *et al.* 2007). Bu çeşitli toksinler ısı uygulamalarında ve rutin sterilizasyon koşullarında bile stabil kaldığı görülmüştür (Bhatia and Zahoor 2007). Bu mikroorganizma ve toksinlerinin tavuk etlerinde bulunmasındaki en büyük sorun, bakterilerin methicillin-resistant (MR) özellikte olabilmeleridir. Çünkü bu sorun sadece klinik kaynaklı bir sorun olmaktan çıkmış toplum kökenli hale gelmiştir. Bazı et ve et ürünleri, kümes hayvanları etleri, süt ve süt ürünlerinde belirlenmeleri, aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol tetracycline gibi antibiyotiklere karşı dirençli olmaları gıda güvenliği açısından tehlike arz etme potansiyelinde olduğunu göstermektedir (Kitai *et al.* 2005; Kwon *et al.* 2006; Pesavento *et al.* 2007; Normanno *et al.* 2007; De Boer *et al.* 2009).

2.2.4. *Listeria spp.*

Listeria spp. genomik ve fenotipik veriler ile 6 türden (*Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*) oluşmaktadır. *L. monocytogenes*'in dahil olduğu bu 6 türden farklı özellik sergileyen 11 yeni tür ile birlikte tür sayısı 17 olarak kabul görmektedir (Gasanov *et al.* 2005; Orsi and Wiedmann 2016). Bu türlerden *L. monocytogenes* insan patojeni olarak tanımlanmıştır. Bu tür fakültatif anaerobik, Gram pozitif ve spor oluşturmeyen, konak hücre içerisinde çoğalabilen, gıda kaynaklı patojenler arasında virü lent özelliği yüksek olan bakterilerden bir tanesidir. Nadir de olsa *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* insanlarda hastalığa sebep olabilmektedir. *L. monocytogenes* yaygın olarak kısaca *Listeria* olarak bilinir ve insanlara genellikle kontamine olmuş gıdalarla taşınmaktadır (Chodorowska and Kuklinska 2002). Diğer gıda patojenlerinden farklı olarak bu bakteri buzdolabı sıcaklığı gibi düşük sıcaklıklarda çoğalabilmektedir (Huss *et al.* 2000). Nitekim bu özelliğinden dolayı ilk izolasyon çalışmalarında soğuk ön zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Yayıldığı çevre ortamlarına örnek olarak tarım alanları, sebzeler, hayvanlar ve gıda

hazırlama ekipmanları ve satış yerleri, mutfak yüzeyleri, yemeye hazır gıdalar verilebilir.

İnsanlarda listeriozis vakaları genellikle pastörize edilmemiş süt ve ürünleri, yumuşak tip peynirlerin tüketimiyle ilişkilendirilmektedir. Bunun yanında yetersiz ısıl işleme tabi tutulmuş kümes hayvanları ve küçükbaş hayvanların etleri de kontaminasyonun görüldüğü kaynaklardır. Bu bakterinin izolasyonu ilk olarak coleslaw olarak bilinen lahana salatasında farkedilmiştir. Gıda zehirlenmesi şüphesiyle hastanede tedavi altına alınan bir hastanın buzdolabında bulunan lahana salatasından izole edilen *Listeria*'nın insanlarda hastalığa sebep olduğu epidemik olarak gösterilmiştir (Schelech *et al.* 1983). Bu farkındalık; bakteriyi taşıyan hayvanların intestinal atıklarının bulaştığı sularla sulanan topraklarda yetişen sebzelerin kontaminasyona maruz kaldığını göstermiştir.

Listeria türlerinin izolasyonu insan ve hayvan dışkılarında, çürüyen artık sebzelerde, çeşitli süt ürünlerinde, toprak ve sularda yapılmıştır. Fakat, izolasyon en yoğun olarak sığır ve koyunların yeni doğmuş, düşük veya ölümle sonuçlanan yavrularında görülmüştür (Chand and Sadana 1999).

Tavuk etlerine genellikle işletmelerde kontamine olmuş bir kaynaktan diğer kaynaklara bulaşma şeklinde bir durum söz konusu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca işletmelerde kullanılan ekipman, tahta yüzeylerine biofilm oluşturarak yaşam döngüsünü uzatan *listeria* bu şekilde kontaminasyonunu devam ettirebilmektedir.

Listeria spp. ve *L. monocytogenes* izolasyonu ve identifikasyonu için birçok kurum tarafından metotlar önerilmiştir. Geleneksel metotların temelinde gıda örneklerinin sıvı besiyerinde ön zenginleştirilmesi, selektif ikincil bir zenginleştirme ve agarlı besiyerinde tespitten sonra biyokimyasal doğrulama ve tür ayrımı vardır. Ön zenginleştirme aşamasında besiyerine ilave edilen antibiyotikler *Listeria* spp. dışında Gram negatif, Gram pozitif bakterileri, maya ve küfleri inhibe etmektedir.

Listeria spp. biyokimyasal olarak tanımlanması katalaz pozitif, oksidaz negatif, glikoz fermantatif, nitratları nitrite indirgeyememe, laktik asit üretme gibi özelliklere bakılarak yapılmaktadır. Türlerin ayrımında ise basit olarak karbonhidrat kullanımı dikkate alınmaktadır (Çizelge 2.1) (Moura *et al.* 2016).

Çizelge 2.1. *Listeria* spp. biyokimyasal özellikleri (Gasnov *et al.* 2005; Pagotto *et al.* 2006)

		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
	β- hemoliz	+	-	+	+	-	-
	Katalaz	+	+	+	+	+	+
	Oksidaz	-	-	-	-	-	-
Karbonhidrat	Ramnoz	+	+/-	-	-	+/-	+/-
	Mannitol	-	-	-	-	-	+
	Ksiloz	-	-	+	+	+	-
	Dekstroz	+	+	+	+	+	+

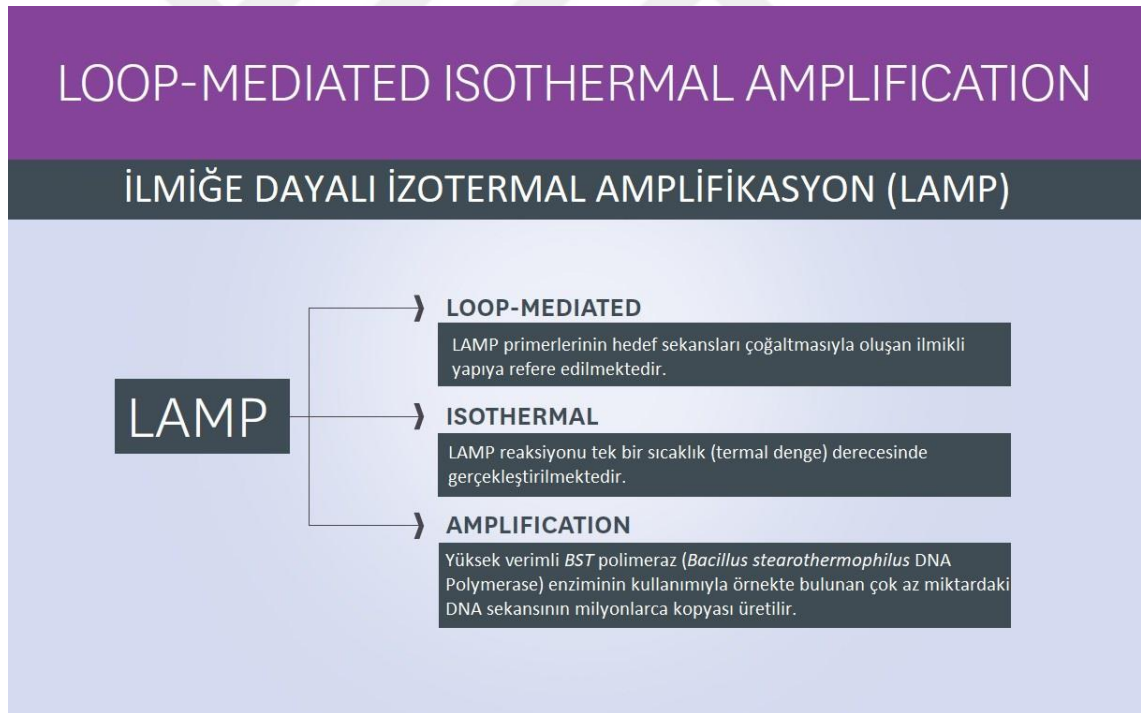
2.3. Nükleik Asit Amplifikasyonu

Nükleik asit amplifikasyonu, hem enfeksiyon rahatsızlıklarının tanımlanmasında hem de ileri genetik araştırmalarda kullanılan en önemli metotlardan biridir. Polymerase chain reaction (PCR), bu kapsamda biyoteknoloji ve medikal laboratuvar ortamlarında en çok kullanılan güvenilir ve yüksek duyarlıklılı bir tanımlama aracıdır. Fakat, yüksek ücretli termal cihazlara, görüntüleme ekipmanlarına ihtiyaç duyulduğundan PCR rutin laboratuvar ortamlarında diğer yöntemler kadar kendine yer bulamamıştır. Zamanla nükleik asit sekanslarına bağlı olarak farklı amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiş ve/veya modifiye edilmiştir. Bunlardan birisi de, strand displacement amplification (SDA) olarak bilinen iplikçik yer değiştirme amplifikasyonudur. Modifiye edilen ve/veya geliştirilen bu yöntemlerde farklı zamanlarda, farklı sıcaklıkta denatürasyon gerekmediğinden yüksek ücretli termal cihaz ihtiyacı ortadan kalkmaktadır. Bunun yerine bir su banyosunda, bir ısıtıcı metal blok üzerinde izotermal amplifikasyon reaksiyonu kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir.

2.3.1. İlmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), çoğaltılması arzu edilen DNA kısımlarını yüksek duyarlılık ve etkinlikte, izotermal koşullarda (63-65°C), iplikcik yer değiştirmesi esasına dayanarak çoğaltabilen nükleik asit temelli bir yöntemdir (Notomi *et al.* 2000). İplikcik yer değiştirme reaksiyonu, DNA sentezi sırasında akış aşağı üretilen DNA iplikçiklerini yer değiştirme özelliğine sahiptir (Walker *et al.* 1992).

Şekil 2.3'te LAMP yönteminin kavramsal olarak incelenmesi görülmektedir. Böylece bu kavramın Türkçe kullanımındaki terim ve metodolojik esaslar gösterilmiştir.



Şekil 2.3. LAMP teknolojisi (Anonymous 2018b).

LAMP metodu, çoğaltılması istenen DNA'da altı farklı bölgeden tanımlanıp özel olarak dizayn edilen 4 veya 6 primer eşliğinde DNA polimeraz sayesinde gerçekleştirilir. Bu şekilde LAMP, izotermal olarak inkübe edilmiş reaksiyon ortamında spesifik bir gen

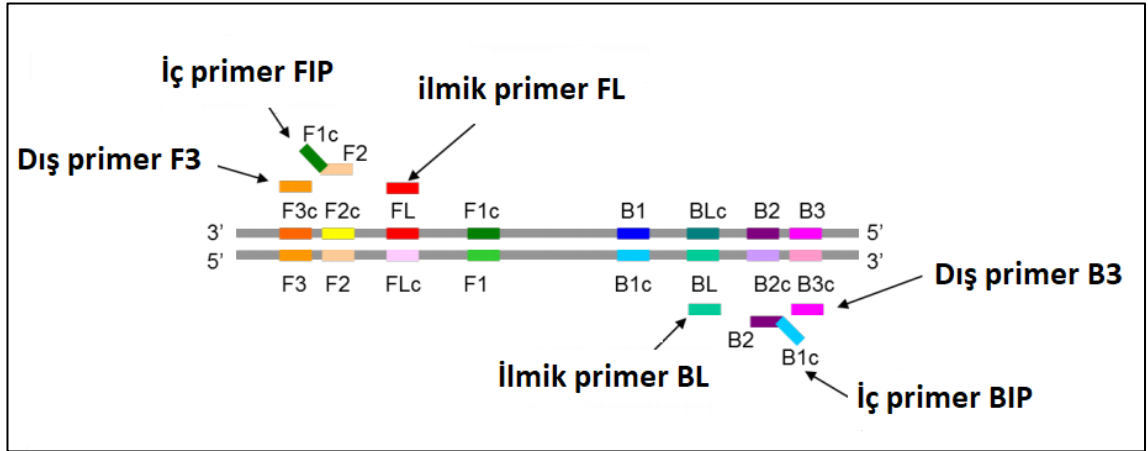
bölgesini çoğaltıp belirleyebilir (Notomi *et al.* 2000; Nagamine *et al.* 2002a).

Diğer nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden farklı olarak, LAMP basitliğinin yanısıra iyi amplifikasyon etkinliği gibi avantajlara sahiptir. LAMP için bir termal döngü cihazı olmaksızın bir su banyosu veya standart bir ısıtıcı blok ile amplifikasyon işlemi başarılabılır. Ayrıca, amplifikasyonun kontrolünde gel elektroforezi ve görüntüleme ekipmanı da gerekmez (Tomlinson and Boonham 2008). LAMP reaksiyon sonucu, interkalatör özelliğe sahip PicoGreen, SYBR Green I, ethidium bromide gibi özel boyalarla veya Hydroxynaphthol blue (HNB), Malachite green (MG), Calsein gibi metal indikatörlerle görülebilir (Parida *et al.* 2008).

2.3.1.a. LAMP prensipleri ve primerlerin dizaynı

LAMP'ın prensibi; sürekli döngülü iplikçik yer değiştirme işleminde *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA polimeraz enzimi sayesinde DNA sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu DNA sentezinde 4-6 primer kullanılır. Bu primerlerden dört tanesi zorunlu, diğer ikisi ise amplifikasyonu hızlandırıcı ilmik primerleridir. İç primerler olarak forward inner primer (FIP) ve backward inner primer (BIP), dış primerler ise F3 (forward outer) ve B3 (Backward outer), ilmik primerler ise LoopF (loop forward) ve LoopB (loop backward) olarak tanımlanır. İlmik primerler iç iki primer tarafından ulaşılamayan ilave bölgelere bağlanarak amplifikasyon işlemini hızlandırır (Nagamine *et al.* 2002a; Nagamine *et al.* 2002b).

F3 ve B3 primerler iplikçik yer değiştirme işleminde önemli işleve sahiptir. FIP ve BIP primerler ise ilmik oluşumunda fonksiyonel rol oynar (Parida *et al.* 2008). Bu iki primer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) saflığında olmalıdır. Primerlerin dizaynı gen üzerinde sekiz hedef bölgeye göre yapılır: F3c, F2c, F1c ve FLP primer kısımlar 3' yönünde, B1, B2, B3 ve BLP primer kısımları ise 5' yönünden seçilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. LAMP için primerlerin seçimi (Anonymous 2018c)

İç ve ilmik primerler farklı mekanizmalarla harekete geçer. Ayrıca, ilmik primerler LAMP reaksiyonunu kolaylaştırır ve hızlandırır. Orijinal LAMP metodunda 1 saat süre ile sonuç alınırken, ilmik primerler sayesinde 30-45 dakikada sonuç alınabilir. Bu döngüsel primerler reaksiyona dahil edildiğinde kısa süre içerisinde yüksek miktarda DNA kopyası üretilir (Nagamine *et al.* 2002b).

LAMP için primerler dizayn edilirken belirli kriterler göz önüne alınır (Dhama *et al.* 2014):

1. İç primerlerin sekansı AT (Adenin-Timin) (AT-rich sequence) açısından zengin olmamalıdır.
2. GC (Guanine-Cytosine) içeriği %50-60 aralığında olmalıdır.
3. GC açısından zengin sekans seçildiğinde erime sıcaklığı (Melting Temperature) %60-65, AT açısından zengin sekans seçildiğinde ise %55-60 olmalıdır.
4. Dizayn edilen primerler, ikincil bir ilmik oluşacak şekilde yapı içermemelidir.

2.3.1.b. LAMP reaksiyonunda kullanılan enzim (*Bst* DNA Polimeraz)

LAMP reaksiyonunun özgül bir yanı olan DNA polimeraz enzimi klasik PCR

protokollerinde kullanılan enzimden farklı özelliklere sahiptir. Bu enzim DNA'yı polimerize etmenin yanı sıra, LAMP döngüsünde iplikçik yer değiştirme kabiliyetine de sahiptir. Polimerizasyon amacıyla *Bst* polimeraz ve *Bsm* polimeraz adında iki enzim kullanılır. *Bst* polimeraz enzimi *Bacillus stearothermophilus* termofilik bakterisinden, *Bsm* polimeraz ise *Bacillus smithii*'den izole edilmiştir. Her iki enzim 5'-3' DNA polimerizasyonunu katalizleyebilir. Fakat; bu enzimler 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi sergilemez. Her iki enzime ait genel özellikler Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. LAMP için polimeraz enzimleri ve özellikleri

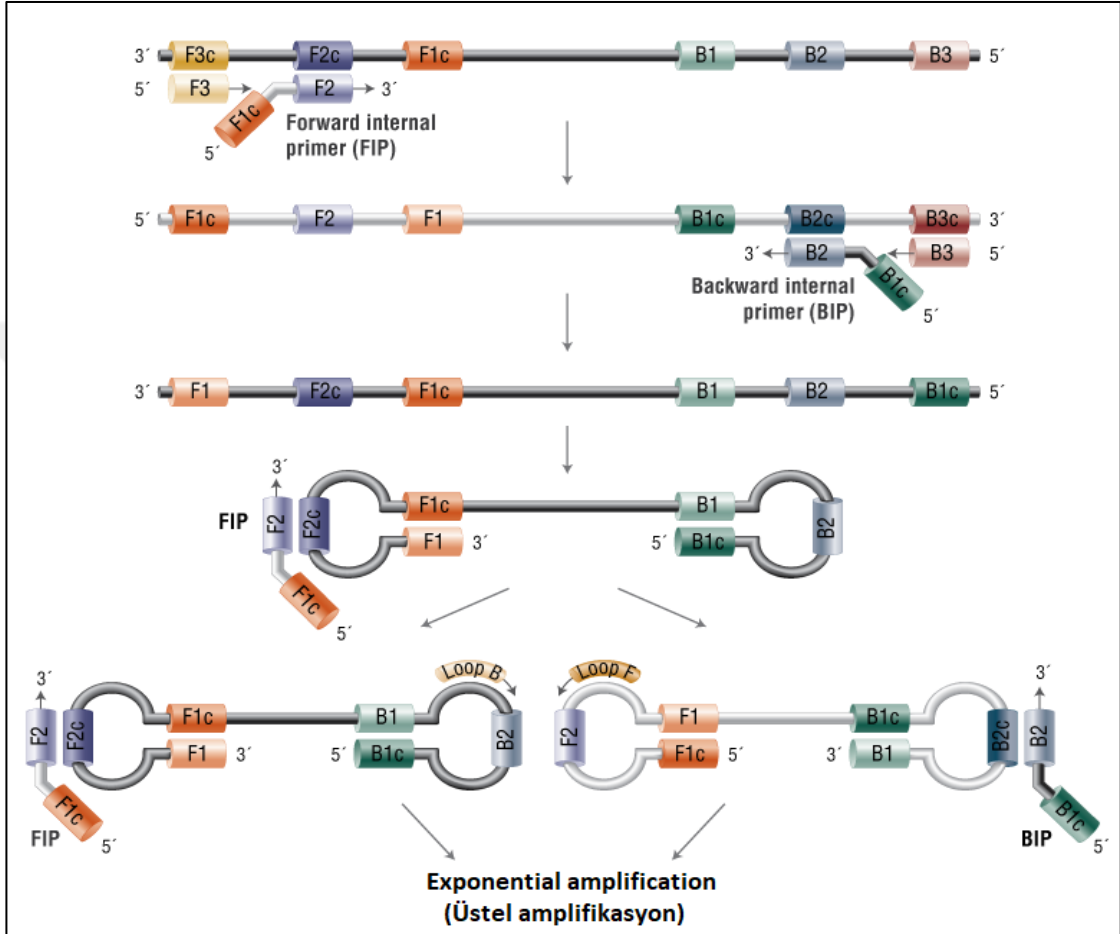
Enzim	Kaynak	Rekombinant kaynak	Çalışma sıcaklığı	Aktivite
<i>Bst</i> DNA polimeraz	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	30-65°C	Strand displacement (iplikçik yer değiştirme) ve DNA polimerizasyon
			Optimum 65°C	
<i>Bsm</i> DNA polimeraz	<i>Bacillus smithii</i>	<i>E. coli</i>	30-63°C,	strand displacement (iplikçik yer değiştirme) ve DNA polimerizasyon
			Optimum 60°C	

Her iki enzim genetik çalışmalarda kullanılmak üzere rekombinant olarak elde edilmektedir. *Bst* enzimi *Bacillus stearothermophilus*'a ait DNA polimeraz genin *E. coli* bakterisinin maltoz bağlayan protein (maltose binding protein) (MBP) genine kodlanmasıyla rekombine edilmiştir. *Bsm* enzimi ise genellikle *Bacillus smithii*'den *polA* geninin *E. coli*'ye klonlanması sonucu rekombinant olarak üretilir. Her iki enzim 80°C'de 10 dk süreyle inaktif hale gelmektedir. Enzimler ekzonükleaz aktivitesi göstermez ve bu sebeple PCR işlemlerinde kullanılamaz (Chander *et al.* 2014; Fischbach *et al.* 2015).

2.3.1.c. LAMP reaksiyonunun gerçekleşme aşamaları

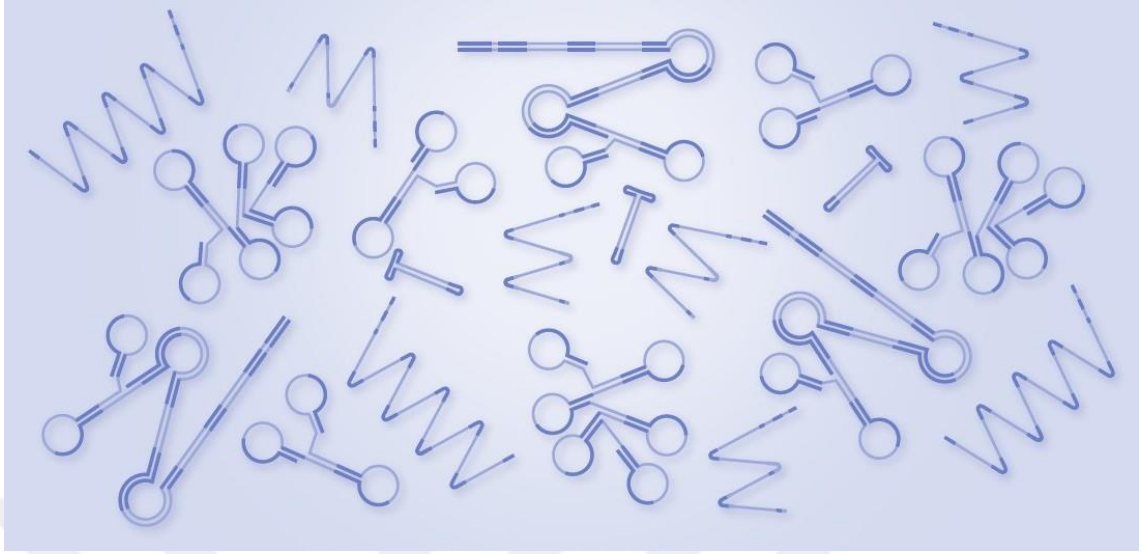
LAMP teknolojisi Notomi *et al.* (2000) tarafından geliştirilen ve daha sonra patenti Eiken Chemical Co., Ltd.'ye (Japonya) devredilen etkin, hassas ve kolay moleküler bir

yöntemdir. Yöntemin prensibi belirtilen ilk araştırmacılar ve patent sahibi firma tarafından Şekil 2.5’te belirtilmiştir. Prensibin detayları EK 1’de sunulmuştur.



Şekil 2.5. LAMP reaksiyonu (Anonymous 2018c)

Dumbel benzeri ürünün oluşumu izotermal amplifikasyonu gerçekleştirmede LAMP için temeldir (Şekil 2.6). Çünkü; ilmi yapıları genellikle tek iplikçiktir ve temelde BIP/FIP tarafından yapı oluşturulur. Bu şekilde ilmi yapılarının oluşum mekanizması farklı denatürasyon basamaklarını ortadan kaldırır. Oysaki farklı denatürasyon sıcaklık uygulamaları PCR işleminde tek iplikçikli DNA elde etmek için gerekli bir işlemdir (Notomi *et al.* 2000).



Şekil 2.6. Çeşitli boyutlarda LAMP ampliconları (Anonymous 2018b)

İlk dumbel benzeri yapı oluşuktan sonra, döngü dumbel benzeri yapı ve tamamlayıcı ürünler arasında iç primerlerle gerçekleşmektedir. Elde edilen son ürünler, farklı uzunlukta temel ilmiklerden ve temel ilmik DNA yapısında unsurlardan, çoklu ilmiklerle birlikte karnabahar (cauliflower) benzeri yapılardan oluşur.

Amplifikasyon gerçekleştiğinde, LAMP yüksek miktarda hedef DNA'nın çoklu kopyalarını içeren DNA iplikçikleri oluşturur. Bu reaksiyon süresince, bulanık çözelti şeklinde presipitat oluşturan magnezyum pirofosfat meydana gelir ve reaksiyon sonlandırıldığında bu sonuç gözle görülebilir hale gelir. LAMP sonucunda amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için birçok yöntem vardır. Aşağıda bu yöntemler sırasıyla belirtilmiştir (2.3.1.d).

2.3.1.d. LAMP ürünlerinin belirlenmesi

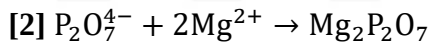
LAMP ürünlerinin doğrudan ve dolaylı olarak belirlenmesi için birçok metot mevcuttur. Amplifikasyon sonucu doğrudan veya direkt olarak belirlenebilmektedir. Geleneksel jel elektroforez, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), moleküler floresansa dayalı teşhis doğrudan; bulanıklık (turbidity), DNA interkalasyon boyaları (DNA-

intercalating dyes), elektrokimyasal lüminesans ve metal iyon indikatörleri temelli teknikler ise dolaylı belirleme yöntemleridir (Kumar *et al.* 2017).

1. Bulanıklık (Turbidity)

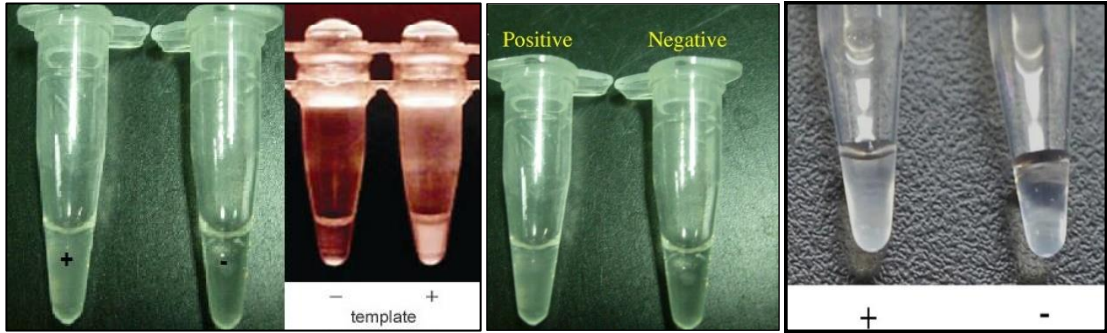
DNA polimeraz tarafından DNA polimerizasyonunda bir yan ürün olarak dNTP (Deoxynucleotide)'lerden pirofosfatlar yayılır [1]. Bu pirofosfat iyonları yüksek miktarda üretildiği zaman, LAMP tamponu içerisinde bulunan Magnezyum iyonlarıyla tepkimeye girerek bir çökelti oluşturur [2]. Bu çökelti çıplak gözle görülebildiği gibi, bulanıklık ölçen cihazlarla spektroskopik olarak da belirlenebilir (Şekil 2.7).

LAMP reaksiyonunda beyaz çökelti oluşumu aşağıdaki formülle ifade edilebilir (Mori *et al.* 2001; Mori and Notomi, 2009):



Birçok çalışmada bu mekanizmada DNA amplifikasyonun pozitif olduğunun göstergesi olarak bulanıklığın oluşumu kabul edilmiştir (Notomi *et al.* 2000; Yoshida *et al.* 2005; Parida *et al.* 2008). Bulanıklığa bağlı oluşan beyaz çökeltinin görülebilmesi ortamda amplifikasyonun varlığına işarettir. Ayrıca; Parida *et al.* (2008) bu beyaz çökeltinin görülebilmesi için 4µg'dan fazla DNA'nın reaksiyon ortamında olması gerektiğini bildirmiştir.

Magnezyum pirofosfat (MgP_2O_7) suda çözünmediği için reaksiyon ortamında çökelti oluşturur. Bu çökelti ışığı absorbe ederek insan gözünün görebildiği seviyede beyazlık oluşturur. Böylece herhangi bir cihaza ihtiyaç duyulmadan sonuç yorumlanabilir.



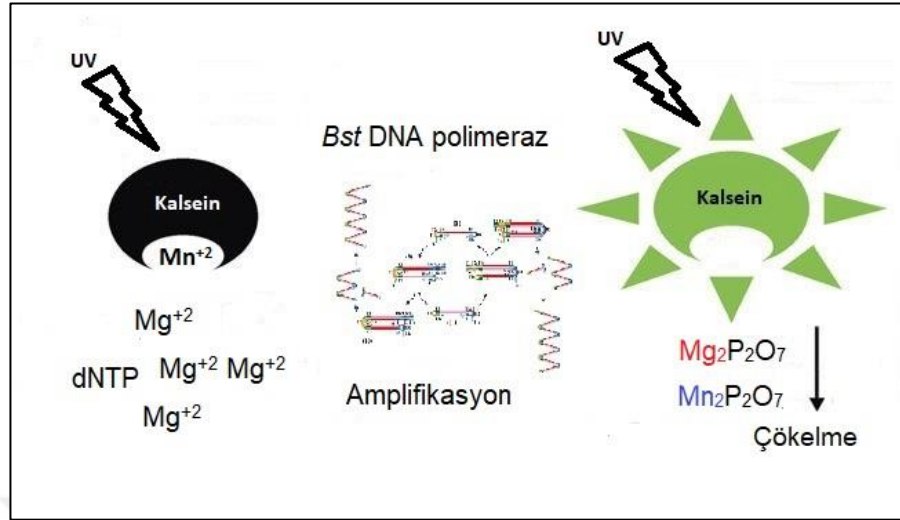
Şekil 2.7. Magnezyum pirofosfat oluşumundan dolayı bulanıklığa bağlı olarak LAMP sonucunun gözlenmesi (Zhang *et al.* 2010; Huang *et al.* 2017)

2. Calcein (Kalsein) ve $MnCl_2$ (Manganese(II) chloride)

Kalsein, fluorexon olarak da bilinen floresan bir boyadır. Bu boya 495 nanometre (nm) dalga boyunda uyarılır ve 515 nm’de ise yayılım verir. Kalsein alkali pH derecesinde Ca^{+2} , Mg^{+2} iyonlarının indikatörü olabilir. Nötr pH’da ise özellikle Fe^{3+} ve Mn^{2+} iyonlarının yanısıra Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} iyonlarla kuvvetli tepkimeye girer ve kalsein bu iyonlar tarafından bastırılır. Kalsein Dimethyl sulfoxide (DMSO) ve Dimethyl formamide (DMF) polar çözücülerde iyi çözünür ve sudaki çözünürlüğü çok düşüktür. Kalsein ışığa ve ısıya karşı çok duyarlıdır ve $+4^{\circ}C$ ’de karanlıkta muhafaza edilmektedir (Zhang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014).

Kalsein sadece nötral tampon ortamlarında güçlü floresan sinyal verir (Yu *et al.* 2008). Bu sebeple nötral pH’da DNA amplifikasyonunun gerçekleştirildiği tekniklerde iyi bir indikatör olarak kullanılabilir.

Kalsein magnezyum tarafından söndürülebilir veya bastırılabilir. LAMP reaksiyonu gerçekleştiğinde, pirofosfat iyonları, polimerizasyonun yan ürünü olarak ortama verilir. Salınan bu iyonlar manganez pirofosfat denen kompleksi oluşturur ve pirofosfat iyonları kalseinden daha kuvvetli olduğu için kalsein’den manganez iyonlarını ayırır. Sonuç olarak Kalsein magnezyum iyonlarıyla birleşir ve UV ışık altında parlak floresan yayar. Bu şekilde hedef DNA’nın varlığının göstergesi olarak bu ışıma kabul edilir (Şekil 2.8).

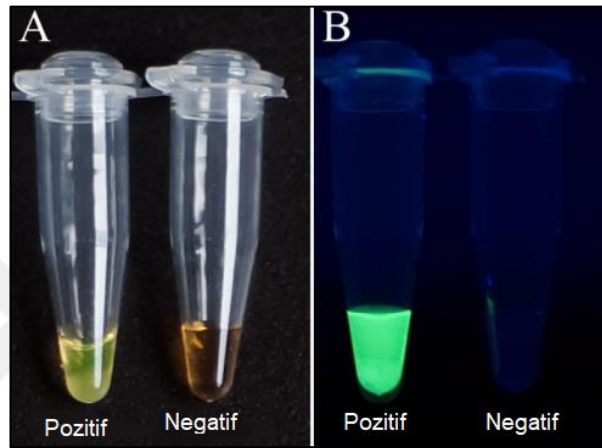


Şekil 2.8. Floresan metal indikatörü (Kalsein) kullanarak LAMP belirleme prensibi (Tomita *et al.* 2008).

3. SYBR Green I

Floresan spektroskopisi, nükleik asitler ve proteinler gibi makromolekül ve komplekslerinin görüntülenmesi, dinamik interaksyonlarının araştırılmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknik birçok analitik alanda karşımıza çıkmaktadır. Farklı floresan özelliğe sahip problemlerin kullanımına dayanan yöntemde, florepoblar makromoleküllerle (özellikle RNA, DNA) tepkimeye girdiğinde ışık şiddetinde artış görülebilir. Bu özellik sayesinde DNA-protein interaksyonlarının araştırılması, kromozomların boyanması, DNA'nın nitel ve nicel olarak belirlenmesi gibi konular üzerinde kolaylıkla araştırmalar yapılabilir. Örneğin; ethidium bromide (EB) boyası DNA baz çiftleriyle interaksyona girer. Acridine Orange hem DNA hem de RNA ile etkileşebilen diğer bir boyadır. Bu gibi klasik boyalar 100 kat'tan daha az seyreltik olduklarında nükleik asitlerle tepkimeye girebilmektedir. Fakat; son zamanlarda farklı genetik çalışmalarda kullanılan SYBR Green I (SG) ve PicoGreen (PG) gibi boyalar 1000 kat'tan fazla seyreltilse dahi etkinlik gösterebilmektedir. Yani; çift zincirli DNA (Double-Stranded DNA- dsDNA) ile ışığa yapabilme özelliğine sahiptirler (Hill *et al.* 2008; Dragan *et al.* 2012).

LAMP reaksiyonlarının sonuçlarının yorumlanabilmesi için kullanılan boyalardan bir tanesi de SYBR Green I'dir. Reaksiyon ortamında amplifikasyonun pozitif olduğunu 1000 kat seyreltilmiş boyanın floresan yeşil ışığa vermesi ile anlaşılır. Eğer ışığa rengi orijinal tucuncu olarak kalırsa reaksiyon negatif şeklinde yorumlanır. Bu renk değişimi çıplak gözle görülebildiği gibi UV ışık altında da gözlemlenebilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. LAMP sonucunun SYBR Green I ile belirlenmesi (Nie *et al.* 2012)

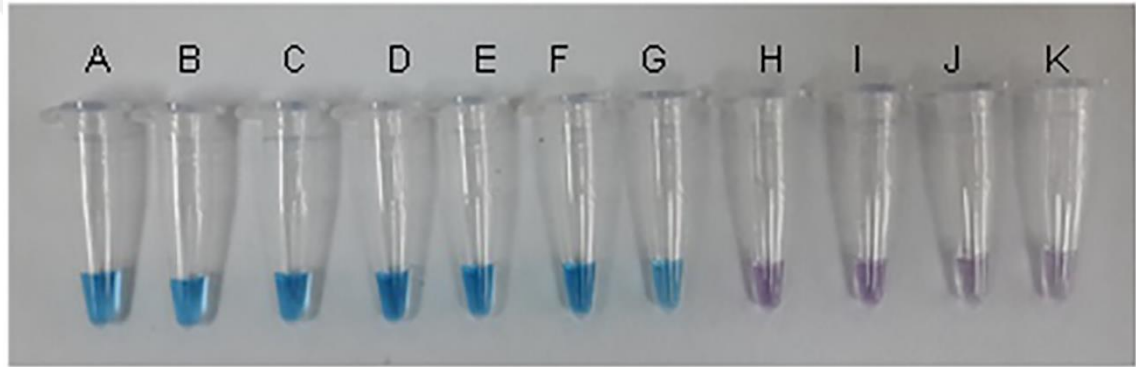
A) LAMP reaksiyonu bittikten sonra ortama normal gün ışığı altında seyreltilmiş SG'den eklendikten sonra meydana gelen yeşil renk pozitif sonuç, turuncu renk ise negatif olarak tanımlanır. **B)** Aynı tüplerin UV ışık altında gözlemlenmesi sonucu ışığa veren tüp pozitif olarak yorumlanır.

4. Hydroxynaphthol Blue (HNB)

HNB kolorimetrik bir indikatör olarak, pH 10'da Mg^{+2} , pH 13'te ise Ca^{+2} iyonlarının tirasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir (Ito and Ueno 1970). Goto *et al.* (2009) nükleik asit araştırmalarında kullanılan ve yukarıda bahsedilen boyalardan farklı olarak HNB'nin LAMP sonuçlarının yorumlanmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir. Araştırmacılar HNB'nin, Alkali şartlarda (pH 8.8, 25°C) *Bst* DNA polimeraz'ın DNA sentezlemesi sonucu Mg^{+2} iyonlarının konsantrasyonundaki değişimi gözlemlemek için yeni bir indikatör olabileceğini göstermiştir. HNB'de renk değişimi reaksiyon ortamının pH'sına bağlıdır. Çözelti içerisinde dNTP olmaksızın 8 mM Mg^{+2} konsantrasyonu olduğunda pH 8.6-9.0 arasında renk magenta (morumsu kırmızı), pH 8.4'te ise mor menekşedir. Bu çözelti ortamında 1.4 mM konsantrasyonda dNTP eklendiğinde ise pH'dan bağımsız olarak HNB'nin magentadan mor menekşeye döndüğü

gözlemlenmiştir. Renkteki bu değişim dNTP'ler tarafından Mg^{+2} iyonlarının çelatlanmasından kaynaklanmaktadır.

Bu hipotez çerçevesinde, çözelti ortamında 6 mM ve daha fazla Mg^{+2} konsantrasyonu varsa HNB mor renkte görünecektir. Fakat; *Bst* DNA polimeraz ile DNA kopyalarının çoğaltılması işleminde Mg^{+2} yoğunluğu azalır ve bu süreçte 6 mM seviyesinin altına düşer. Böylece HNB'nin rengi gök mavisine döner ve amplifikasyonun pozitif olduğu bu şekilde gözlemlenir (Şekil 2.10) (Goto *et al.* 2009; Lau *et al.* 2015).

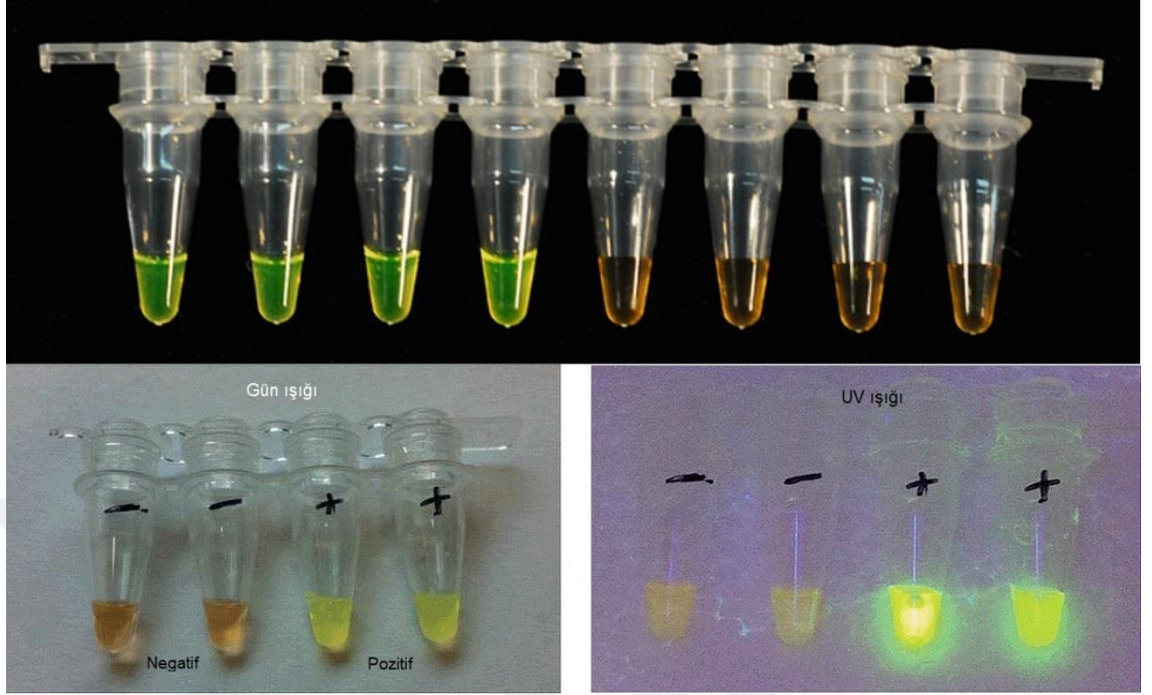


Şekil 2.10. LAMP sonucunun HNB ilavesiyle gözlemlenmesi (Lau *et al.* 2015)
A-G: Gök mavi (pozitif), H-K: Mor menekşe (Negatif)

5. PicoGreen (PG)

PicoGreen boyası, çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan özellik kazanan bir yapıya sahiptir. Genel özellikleri SG ile benzerdir. En yüksek 480 nm dalga boyunda uyarılır ve 520 nm'de emisyon en yüksektir. Dragan *et al.* (2010) PG'nin dsDNA'ya bağlandığında yüksek miktarda ışıma yaptıklarını bildirmişlerdir.

PG amplifikasyonun gerçekleştirildiği ortama Tris-EDTA (TE) ile 1:200 oranında seyreltilerek ilave edilir. Reaksiyon ortamına ilave edildikten sonra UV ışık altında veya günışığında incelenir. SG boyasında olduğu gibi, normal ışık koşullarında turuncu bir renk negatif reaksiyonu, yeşil renk ise pozitif reaksiyonu temsil eder. UV ışık altında ise parlak yeşil renk pozitifdir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. PicoGreen kullanılarak LAMP sonucunun UV ve gün ışığında pozitif ve negatif olduğunu gösteren örnekler (Ward and Harper 2012; Carnevale *et al.* 2015).

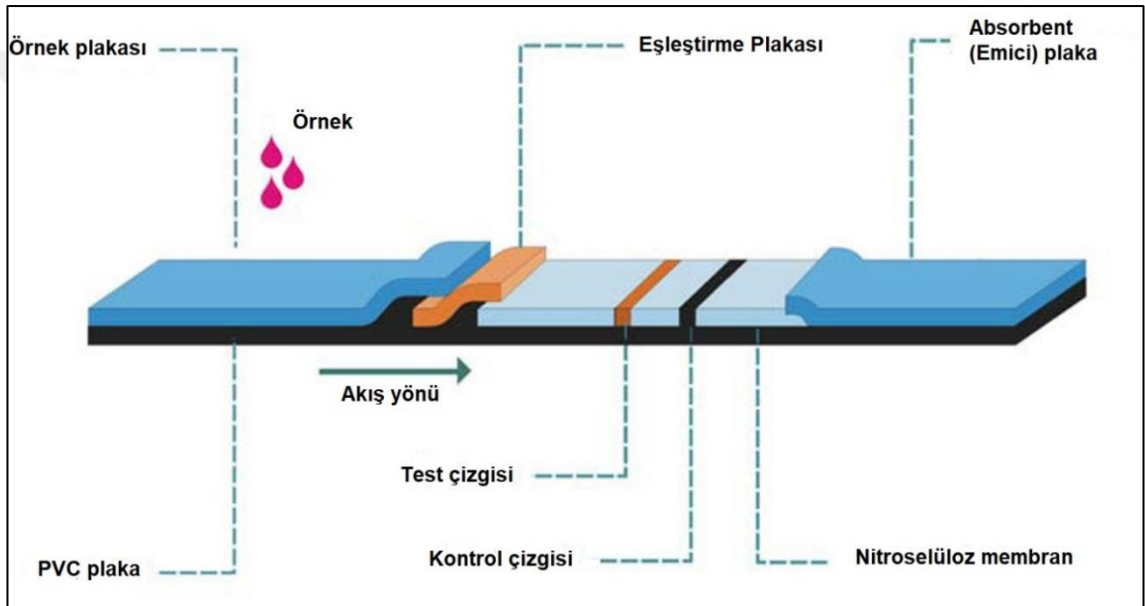
2.4. Lateral Akış Testi (LAT-Lateral Flow Immunochromatographic Assay)

Tek platform üzerinde kısa süre içerisinde çıplak gözle bir tanımlama sonucunu görebilmek için birçok ticari kit geliştirilmiştir. Bu yeni teknolojiler, identifikasyon çalışmalarında hız, basitlik, ucuzluk gibi avantajları beraberinde getirmektedir. Lateral akış testinin ilk örneği, gebelik testlerinde koryonik asit'in tespitiyle geliştirilmiştir. Sonucun çıplak gözle görülerek yorumlanması, kullanımın basit ve ucuz olması bu test platformunu kullanışlı hale getirmiştir (Ngom *et al.* 2010).

LAT kitleri 4 temel bileşenden oluşmaktadır (Şekil 2.12):

1. Destek plakası üzerinde nitroselüloz membran
2. Örnek veya örnek uygulama plakası
3. Eşleştirme plakası
4. Absorbent (emici) plaka

Test şeridindeki bu dört bileşen sıvı akışını düzenlemek için birbiriyle uyumlu şekilde plastik strip içerisinde konumlandırılır. Absorbent plaka veya emici tampon denen bileşen sribin yürütücü kısmıdır. Gözenekli nitroselüloz membran ise reaksiyon için zemin oluşturduğundan en önemli bileşendir. Yakalayıcı proplar denen nükleik asit veya antikorlar, bu nitroselüloz membrana immobilize edilerek kontrol ve test şeritleri hazırlanır. Yakalayıcı plaka konjuge edilmiş partiküller içerir ve bu içerik hedefe özgü boyanmış antikor gibi yapılardan oluşur.



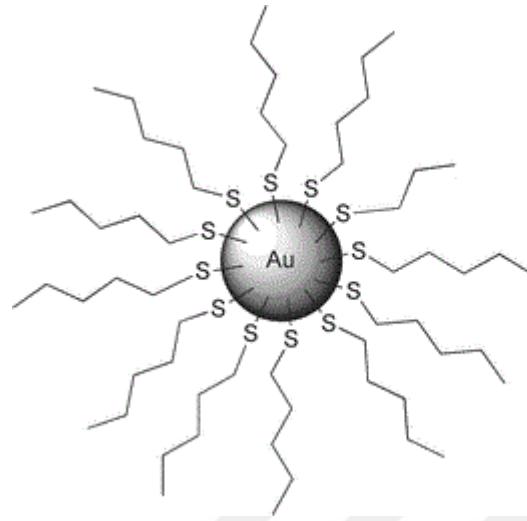
Şekil 2.12. Lateral akış tanımlama test kitinin genel yapısı (Xi *et al.* 2013).

Gıda patojenlerinin belirlenmesinde ve tanımlanmasında pratik şekilde kullanılan immünokromatografik lateral akış (lateral flow) testi, Sandwich ELISA sistemi ile çalışmaktadır. Bu testte antijen, kit içindeki altınla işaretlenmiş (gold-labelled) ve antikor emdirilmiş bir konjugat plakadaki antikorla etkileşir ve bu antijen-antikor kompleksi konjugat plakadan yürütücü plaka aracılığıyla diğer uçtaki emici (absorbent) plakaya doğru hareket eder. Yürütücü plaka test (örnek) şeridi (T) ve iç kontrol şeridi (C) olmak üzere iki adet yakalayıcı antikor şeridi içermektedir. T şeridine gelen antikor-antijen kompleksi burada reaksiyona girer ve hareket sonlanır. Yeterli miktarda altınla kaplanmış antikor-antijen kompleksi yakalayıcı antikorlara bağlanınca 20 dakika gibi

sürede gözle görülebilir bir kırmızı şerit oluşur. Eğer örnekte hedef patojen yoksa (T) şeridinde kırmızı renk meydana gelmez. Test kitinin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla örnekte hedef patojen olsun veya olmasın, altınla işaretlenmiş antikorların fazlası (T) şeridinden akışa devam ederek (C) şeridine gelir ve buradaki antikorlarla bağlanarak kırmızı şerit rengi oluşturur. Bu test kitlerinde genellikle patojene ait flagella antijenlerinin varlığının belirlenmesi prensibi geçerlidir (Koçan ve Halkman; 2010).

Bu test kitinin kullanımında, küçük hacimlerde sıvı örnek veya homojenize edilmiş katı örneklerin sıvı halleri kullanılır. Test kitinin performansının olumsuz etkilenmemesi için tamponlarla pH ayarlaması önerilmektedir (Posthuma-Trumpie *et al.* 2009).

LAT'ın kullanımı kolaydır ve eğitilmiş personele ihtiyaç duyulmadan basit bir prosedürle uygulanabilmektedir. Örnek hazırlama aşamasından sonucun okunmasına kadar geçen süre 30 dakika gibi kısadır. LAT kitleri metalik nanopartiküller (altın ve gümüş), silika, karbon, kuantum parçacıkları ve hassasiyeti artırmak için enzimlerle oluşturulmaktadır. Yani hedeflenen patojende bulunan antijene özgü antikorlar bu partiküllere kodlanmaktadır. Bunlar içerisinde şekil, büyüklük, yüzey modifikasyonuna uygunluk, homojenite gibi avantajlardan dolayı nanopartiküller en çok tercih edilenlerdir. LAT uygulamaları için en çok kullanılan nanopartikül ise altın partiküllerdir (Gold nanoparticles-AuNPs) (Şekil 2.13). Altın ve tiol molekülleri arasında oluşan güçlü kovalent yapıda, tiol moleküllerine karşı altının afinitesinin sağlam olması bu kullanımı ön plana çıkarmaktadır. Bu özellikten dolayı altın nanopartiküllerinin yüzey kimyası kolayca kontrol edilebilmekte ve tiol grupları antikor, nükleik asit gibi yapılarla konjuge edilebilmektedir (Kaittanis *et al.* 2010).



Şekil 2.13. Thiol gruplarıyla stabilize edilmiş altın nanopartikülleri (Roy and Pericas 2009)

LAT sistemlerinde altın nanopartiküllerinin kullanımının avantajları şunlardır (Parolo *et al.* 2013):

1. Güçlü kırmızı renginden dolayı düşük konsantrasyonlarda bile belirlenebilir.
2. Düşük maliyet
3. Üretim kolaylığı
4. Biyouyumluluk

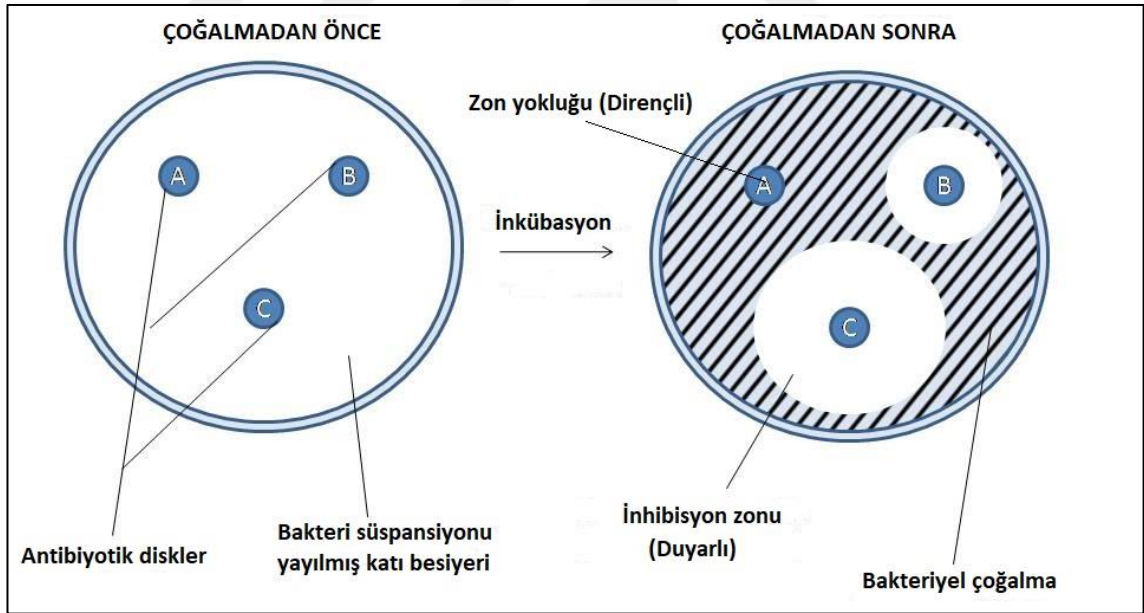
2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç ve duyarlılıkların saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. *In vitro* antibiyotik dirençlilik ve duyarlılık analizleri, izole edilen patojenin tedavi esnasında ulaşılan *in vivo* düzeyinin uygun veya yeterli olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla yapılmaktadır. Genel olarak mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu amaçla uygulanan yöntemler;

1. Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme metodu (Minimum İnhibitör Konsantrasyon)

2. Disk difüzyon (Kirby-Baurer) yöntemi

Disk difüzyon (Kirby-Bauer) yönteminde; belirli bir konsantrasyon ve miktarda antibiyotik ajan emdirilmiş kağıt diskler, patojen bakterinin taze kolonilerinden hazırlanan standart (0,5 McFarland) süspansiyonun katı besiyeri yüzeyine yayılımı yapıldıktan sonra yerleştirilir ve uygun koşullarda inkübe edilir. Bu şekilde kağıt disklerde bulunan antibiyotikler azalan miktarlarda difüze olur ve patojen üzerinde etkili olduğu seviyelerde çoğalmayı durdurur. Böylece disk etrafında patojenin üreyemediği bir alan oluşur ve bu alan dairesel bir inhibisyon zon olarak tabir edilir (Şekil disk1). Bu zonun çapı ölçülür ve bu değer doğrudan patojenin duyarlılığı ile ilişkilendirilir. Kağıt disk etrafında inhibisyon zonunun oluşmaması, bakterinin antibiyotik ajana karşı dirençli olduğunu gösterir (Şekil 2.14) (Jorgensen and Turnidge 2007).



Şekil 2.14. Disk difüzyon (Kirby-Baurer) yönteminin esası (Anonymous 2018a)

Bu çalışmanın amacı; klasik kültürel yöntem, ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP), Real-Time PCR kullanarak tavuk etlerinden *Salmonella* ve *Campylobacter* tespiti, bunun yanı sıra örneklerin bazı mikrobiyolojik özelliklerinin araştırılması ve bazı patojenlerin antibiyotik duyarlılıklarının ölçülmesi olarak belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tavuk etleri

Erzurum'da bulunan yerel marketlerden temin edilen 126 adet taze, dondurulmamış tavuk eti (42 kanat, 42 kemiksiz göğüs, 42 baget) araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Tavuk etleri daha önceden karkastan kesilip parçalar halinde polietilen ambalajlarda ve streç film ile kaplanmış şekilde satışa sunulduğu görülmüştür. Materyalin temin edildiği satış yerlerinde muhafaza sıcaklığı $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ olup, raf ömürlerine en az bir hafta kadar süre olan materyaller sıcaklığın korunması için buz aküleri içeren strafor kutu içerisinde taşınmış ve analizlere kadar sıcaklığı 4°C ayarlanmış soğutucuda muhafaza edilmiştir. Örnekler laboratuvara ulaştırıldıktan sonra en geç 30 dakika içerisinde analizlere alınmıştır. 2017 yılının Ocak-Şubat-Mart ayları içerisinde her ay herbir numune çeşidinden 14'er adet olacak şekilde toplam 42 örnek mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur.

3.1.2. Kontrol (referans) suşlar

Bu araştırmada, mikrobiyolojik ve/veya moleküler genetik analizlerde referans suşlar olarak *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (RSHMB 95091), *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), *Campylobacter coli* (ATCC 33559), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kullanılmıştır. Bu suşlar Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Muhafaza edilen kültürlerin (-80°C) aktive edilmesi Trypticase Soy Yeast Extract (TSYE) brot besiyerinde yapılmıştır. *C. jejuni* ve *C. coli* için TSYE besiyerine %5 oranında defibrine at kanı ilave edilmiştir.

3.2. Yöntem

Bu araştırmada belirtilen materyallerden; **i)** öncelikle *Campylobacter* spp. ve *Salmonella* spp.'nin geleneksel metot, PCR ve LAMP yöntemleriyle belirlenmesi, **ii)** Bununla birlikte mikrobiyolojik analizler kısmında (3. 2. 1) aerobik mezofilik bakteri, psikrofilik bakteri, maya-küf, *S. aureus*, *Listeria* spp., koliform sayımı ve tespiti **iii)** Ayrıca, kültürel yöntemlerle izole edilen ve doğrulanan *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları saptanması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerin yöntemleri aşağıda belirtildiği gibidir.

3.2.1. Mikrobiyolojik analizler

3.2.1.a. Materyallerin yıkanması (rinsing) ve dilüsyon hazırlama

Materyaller ağırlıklarına göre 200-400 mL steril Buffered Peptone Water (Tamponlanmış Peptonlu Su, TPS) ile filtreli stomacher poşeti içerisinde 5 dk süreyle yıkama (rinsing) işlemine tabi tutulmuştur. Bu yıkama suyundan 25'er mL *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp., 10 mL *Listeria* spp. için kullanılmıştır. Mikrobiyolojik analizler için dilüsyonlar Peptonlu Fizyolojik Tuzlu Su (MRD- Maximum Recovery Diluents) ile hazırlanmıştır. 500 mL kapasiteli otoklava dayanıklı cam şişelere 10 gram (20 gram/L) TPS (Oxoid, CM0509) tartılıp 121°C'de 15 dakika sterilizasyon yapılmıştır. MRD için 1 litre saf suya %0,85 NaCl+%0,1 pepton çözündürülüp test tüplerine 9'ar mL dağıtılmış ve sterilize edilmiştir.

3.2.1.b. Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayımı

TAMB sayımında Plate Count Agar (Merck, 1.05463) uygulama yönergesine göre hazırlanmış ve petri plaklarına dökülmüştür. Plaklara yayma kültür yöntemiyle hazırlanan dilüsyonlardan ekim yapılmıştır. Petri kutuları 35±1°C'de 48±2 saat

inkübasyona tabi tutulmuştur. Sayım işlemleri dilüsyon faktörü ve koloni sayısı dikkate alınarak Log kob/g şeklinde verilmiştir (Maturin and Peeler 2001).

3.2.1.c. Psikrotrofik bakteri sayımı

Psikrotrofik bakteri sayımı TAMB sayımında (3.2.1.b) izah edildiği gibi PCA'a ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 7°C sıcaklıkta 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sayım işlemleri dilüsyon faktörü ve koloni sayısı dikkate alınarak Log kob/g şeklinde verilmiştir (Maturin and Peeler 2001).

3.2.1.d. Maya-küf sayımı

Maya-küf sayımı için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck, 1.00466) yönergeye göre hazırlandıktan sonra uygun dilüsyonlardan ekip yapılmıştır. Işıksız ortamda en fazla 3 petri kutusu istiflenmesiyle 25°C'de 7 gün süreyle inkübasyondan sonra sayım yapılmıştır. Sayım işlemleri dilüsyon faktörü ve koloni sayısı dikkate alınarak Log lob/g şeklinde verilmiştir (Tournas *et al.* 2001).

3.2.1.e. Koliform sayımı ve fekal koliform tespiti

Toplam koliform sayımı için Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck, 1.01406) kullanılmıştır. Besiyeri kaynatılarak steril edilip bir su banyosunda $48\pm 2^\circ\text{C}$ 'ye soğutulur. Petri kutularına aseptik şartlarda dilüsyonlardan 1'er mL konulur ve üzerine soğutulan besiyerinden 8-10 mL ilave edilir ve homojen olacak şekilde karıştırılır. Besiyeri katılaştıktan sonra 5-6 mL besiyeri ikinci kez aktarılır ve katılaştıktan sonra 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Dökme kültür yöntemine göre tipik koloniler dikkate alınarak sayım sonucu hesaplanır (Feng *et al.* 2002; Çetin 2006).

Fekal koliform (*E. coli*) tespiti için ise brom krezol moru (Bromocresol Purple, Merck) ilave edilerek hazırlanan EC Brot (Merck, 1.10765) kullanılmıştır. Brot durham tüpü

içeren test tüplerine 9'ar mL dağıtılıp steril edildikten sonra materyallere ait yıkama (rinsing) sularından tüplere 1 mL aktarılmış ve 44,5°C'de inkübe edilmiştir. Test tüplerinde mor renkten sarı renge dönüşüm ve durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Pozitif tüplerden bir öze dolusu alınarak Eosin Methylene Blue Agar'a (Merck, 1.01342) sürme yapılmış ve metalik yeşil parlak renk oluşturan koloniler *E. coli* olarak tespit edilmiştir.

3.2.1.f. *Staphylococcus aureus* sayımı

Baird-Parker Agar Base (Merck, 1.05406) besiyeri 58 g/950 mL saf suda çözündürülüp sterilizi edilmiştir. 48-50°C soğutulan besi yerine 50 mL yumurta sarısı-tellurit emülsiyonu (Merck, 1.03785) ilave edilerek petri plaklarına dökülmüştür. Hazırlanan her bir dilüsyondan 1 mL dilüent 0.3, 0.3, 0.4 oranında 3 petri plağına yayma ekim yapılmıştır. Petri plakları ters çevrilmeden dilüentleri absorbe etmesi için 1 saat inkübatörde bekletilmiş ve çevirilen plaklar 45-48 saat 35-37°C sıcaklıkta inkübasyonu bırakılmıştır. Plaklarda 1,5-2,5 mm çapında siyah, parlak konveks ve zonlu, iğne ile alındığında zamksı kıvamda olan koloniler *S. aureus* şüpheli koloniler olarak belirlenmiştir. Ardından şüpheli koloniler 0,2-0,3 mL Brain Heart Infusion (BHI) brot (Merck 1.10493) içeren tüplere aktarılmış ve 18-24 saat 35-37°C'de inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler Tryptic Soy (TSA) agar (Merck, 105458) besiyerine çizilmiş ve 18-24 saat 35-37°C'de geliştirilmiştir. Yardımcı test olarak TSA'da üreyen kültüre katalaz testi uygulanmış ve aktivite gösteren kültürler koagülaz testine tabi tutulmuştur. Katalaz aktivite testi için %3'lük H₂O₂ kolonilere damlatılmış ve gaz çıkışı koloniler Katalaz pozitif olarak kabul edilmiştir. Liyofilize tavşan plazması (Bactident coagulase; Merck 1.13306) 3 mL steril saf su ile çözündürültükten sonra plazmadan 0.2-0.3 mL BHI'deki kültürlerle ilave edilmiştir. 35-37°C'de inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak 6 saatte bir kontrol edilmiş ve tüp ters-düz edildiğinde yerinden oynamayan, pıhtı oluşturanlar koagülaz pozitif olarak kabul edilmiştir (Bennett and Lancette 2016).

3.2.1.g. *Listeria* spp. analizi

Listeria spp. tespitinde ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, biyokimyasal doğrulama basamakları takip edilmiştir. Ön zenginleştirme amacıyla steril kavanoz içerisinde 10 mL tavuk yıkama suyuna 90 mL Half Fraser Brot eklenmiş ve 30°C’de aerob koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan her bir örnekten 1 mL homojenizat alınıp 9 mL Fraser Brot içeren tüplere aktarılıp aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Zeytin yeşili-siyah renk veren örneklerden birer öze dolusu Chromocult *Listeria* Selective Agar (Merck 1.00427), Oxford *Listeria* Selective Agar (Merck 1.07004) ve PALCAM Agar (Merck 1.11755) besiyerlerine çizim yapılmıştır. Besiyerlerinde üreyen yaklaşık 1 mm çaplı tipik kolonilerden 1-5 adet seçilerek biyokimyasal ve diğer testler yapılmak üzere, TSA-YE’ye (Tryptic Soy Agar-Yeast Extract; Oxoid CM 131) aktarıldıktan sonra 30°C’de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen kolonilere sırası ile; Gram boyama, katalaz (%3’lük H₂O₂ ile), oksidaz (Bactident oxidase, Merck 113300) testleri yapıldı. Biyokimyasal doğrulama amacıyla API *Listeria* (bioMerieux), tür ayrımı için ise şeker fermentasyon testleri uygulanmıştır (Hitchins *et al.* 2017).

Şeker fermentasyon testleri için tüplerde 9’ar mL hazırlanan Purple Brot Base’lere (PBB), %5 konsantrasyonda hazırlanan ve 0,20 µm’lik milipor filtrelerden (Sartorius Minisart) süzülen L-Rhamnose (Merck 7361), D-Xylose (Merck 8689), Mannitol (Merck 5980) solüsyonlarından 1’er ml eklenmiştir. TSB-YE’da 30°C’de 24 saatlik inkübasyonla aktive edilmiş *Listeria* spp. şüpheli kolonilerden bir öze dolusu alınarak, şeker eklenen PBB’e inokule edilerek 37°C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, PBB’lerin mor renginin sarıya dönmesi pozitif, renkte bir değişikliğin olmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

İzole edilen kültürlerin hızlı bir şekilde *L. monocytogenes* olup olmadığı Singlepath L'mono (Merck, 104148) immünokromatografik lateral akış test kitiyle tespit edilmiştir. Bu amaçla şüpheli koloniler bir öze yardımıyla alınıp bir tüpte 1-2 mL steril suda çözündürülüp 15 dk kaynar su banyosunda tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulan bu

örnekten 160 µL test kitinin yürütücü kısmına aktarılmış ve 15-20 dakika içerisinde sonuç kit yönergesine göre tespit edilmiştir (Koçan ve Halkman 2010).

3.2.1.h. *Salmonella* spp. izolasyonu

Tamponlanmış peptonlu su ile muamele edilen örneklerin yıkama suları aerobik koşullarda 35-37°C'de 18-24 saat ön zenginleştirme amacıyla inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örneklerden 0,1 mL karışım alınarak tüplerde hazırlanmış steril 10 mL Rappaport Vassiliadis (RVS) Brot'a (Merck 1.07700), tüplerde 9 mL Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Brot'a (MKTTn) 1 mL karışım ilave edilerek sırasıyla 43°C, 35°C'de 18-24 saat selektif zenginleştirme amacıyla inkübe edilmiştir. RVS ve MKTTn besiyerlerinden öze dolusu alınarak Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) Agar (Merck 1.05287), XLT4 Agar Supplement (Merck 1.08981) ilave edilmiş XLT4 Agar (Merck 1.13919) besiyerlerine çizim yöntemiyle ekim gerçekleştirilmiştir. Her iki besiyerinde 35-37°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra *Salmonella* spp. şüpheli kolonileri hidrojen sülfür oluşumuna bağlı olarak siyah renkli görülür. Tipik koloniler Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915), Lysine Iron Agar (Merck 1.11640) yatık besiyerine iğne ile ekilmiş ve 35-37°C'de inkübasyondan sonra tipik biyokimyasal özellikleri gözlemlenen koloniler ayrıca API 20E *Salmonella* test kitiyle doğrulanmıştır (Wallace *et al.* 2016).

3.2.1.i. *Campylobacter* spp. izolasyonu

Campylobacter spp. analizi için seçici zenginleştirme ve katı besiyerine ekim, şüpheli kolonilerin doğrulanması ve tanımlanmasına yönelik yöntemler uygulanmıştır. Numune yıkama sularından 25 mL alınarak, antibiyotik içeren suplement ve %5 oranında Laked Horse Blood (Oxoid, SR0048) ile hazırlanmış 225 mL Bolton Brot (Oxoid, CM0983) zenginleştirme sıvısına aktarılmıştır. Vidalı cam şişeler içerisinde öncelikle 4 saat 35-37°C, ardından 42°C sıcaklıkta 24-48 saat inkübasyon yapılmıştır. Selektif katı besiyerleri olarak *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar (mCCDA, Modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar), *Campylobacter* Selective Agar (Skirrow)

(Oxoid, CM0331+ SR0069) seçilmiş ve zenginleştirme sıvılarından 1 mL alınıp 1:10 oranında seyreltme yapıldıktan sonra çizim yapılmıştır. Çizim yapılan petri plakları mikroaerofilik koşullar altında sırasıyla 35-37°C ve 42°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Hunt *et al.* 2001).

Mikroaerofilik koşullar Oxoid tarafından önerilen yöntemle göre sağlanmıştır. Anaerojar içerisine CampyGen petri kutularıyla birlikte ilave edilip inkübasyon işlemleri yapılmıştır. CampyGen 2,5 L kapasiteli Anaerojar ortamında mikroaerofilik koşullar sağlamaktadır. Selektif besiyerlerinde üreyen tipik koloniler Columbia Blood Agar (Oxoid, CM0331 + SR0051) besiyerine alınıp 42°C’de yeniden çoğaltılmıştır. Çoğalan koloniler Oxidaz aktivitesi yönünden test edilir ve pozitif olan koloniler doğrulanmak amacıyla Columbia Blood Agar’da muhafaza edilmiştir.

3.2.1.j. Antibiyotik duyarlılık testi

Antibiyotik duyarlılıkların ve dirençlerin belirlenmesi için Disk Difüzyon Yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle ilgili uygulanan metod ve kısaltmalar EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) tarafından oluşturulan kaynaklar dikkate alınarak kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotik diskleri Çizelge 3.1’de belirtildiği gibidir.

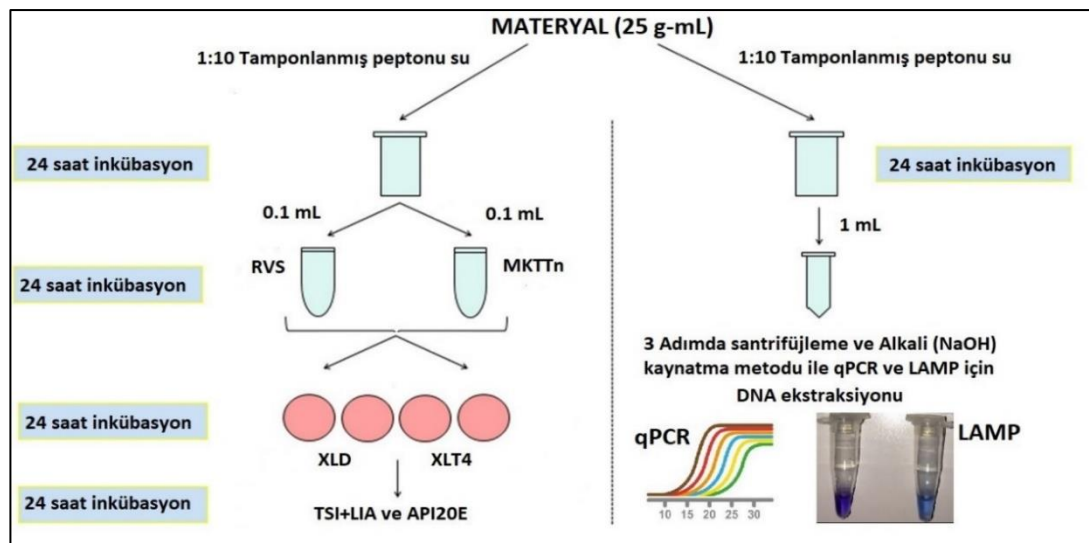
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları (µg/disk)

Antibiyotik	Kısaltma	Disk içeriği (µg)
Ciprofloxacin	CIP	5
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	SXT	5
Chloramphenicol	C	30
Streptomycin	S	10
Ampicillin	AMP	10
Gentamicin	CN	10
Kanamycin	K	30
Nalidixic acid	NA	30
Trimethoprim	W	5
Tetracycline	TE	30
Meropenem	MEM	10
Ertapenem	ETP	10

Campylobacter spp. ve *Listeria* spp. izolatları için Mueller-Hinton (MH) agar'a %5 oranında defibrine edilmiş at kanı ve 20 mg/L seviyesinde β -Nicotinamide adenine dinucleotide ilave edilmiştir. *Salmonella* spp. ve *S. aureus* için ise Mueller-Hinton agar kullanılmıştır. İzolatlar selektif olmayan besiyerlerinde çoğaltılmış ve 18-24 (*Campylobacter* spp. için 24-48) saatlik kolonilerden alınarak McFarland 0.5 referansına göre inokulumlar hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulumlardan steril bir eküvyon yardımıyla alınarak agar yüzeylerine yayılmamış bölge kalmadan dağıtılmıştır. *Campylobacter* spp. için kullanılan plaklar 35-37°C 15 dakika etüvde bekletilmiştir. Böylece inokulumların emdirilmesi kontrollü şekilde sağlanmıştır. İnokulumlar yapıldıktan sonra her plak için en fazla 5 antibiyotik diski aralarında en az 24 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmiştir. *Campylobacter* spp. için mikraerofilik koşullar 3.2.1.h.'de belirtildiği gibi sağlanmış ve 41±1°C 24 saat, diğer izolatlar ise 35±1°C, 18-24 saat inkübasyon yapılmıştır (EUCAST 2017).

3.3. LAMP ve PCR Uygulamaları

Bu tez çalışmasında LAMP ve PCR uygulamaları için ön işlemler ve reaksiyonlar için gerekli koşullar aşağıda izah edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Hedef patojenlerin belirlenmesi için geleneksel kültürel yöntem ve nükleik asit amplifikasyon teknikleri (Domesle *et al.* 2018'den uyarlanmıştır).

3.3.1. DNA ekstraksiyonu

3.2.2.h ve 3.2.1.i. bölümlerinde belirtilen yöntemlerle elde edilen *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. izolatlarını doğrulamak, zenginleştirmeye tabi tutulmuş materyallerden hedef patojeni LAMP ve qPCR ile belirlemek amacıyla DNA ekstraksiyonu 3 kademeli santrifüjleme ve alkali ortamda kaynatma metoduyla gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.a. İzolatlardan DNA ekstraksiyonu

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu *Campylobacter* spp. için Blood Agar, *Salmonella* spp. için ise Nutrient Agar besiyerinde çoğalan taze kültür kolonileri kullanılmıştır. Bu amaçla steril plastik bir öze (1 µL) yardımıyla alınan bir adet koloni 50 µL NaOH (25 mM) içeren 1.5 mL mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır. Bu karışıma bir blok ısıtıcıda 95-100°C'de 10 dakika süreyle kaynatma işlemi uygulanmıştır. Kaynatma sonrasında karışımı nötralize etmek amacıyla 4 µL Tris-HCl buffer (1 M, pH 7.5) ilave edilmiştir. Bu karışım 20.000 x g ve 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant LAMP ve PCR işlemleri için DNA template olarak kullanılmıştır.

3.3.1.b. Materyalden DNA izolasyonu

Ön zenginleştirmeye tabi tutulmuş homojenizatlardan 1 mL alınarak mikrosantrifüj tüplere transfer edilmiş ve sırasıyla; i) 900 x g, 1 dakika santrifüjleme, ii) süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpe alınmış ve 10.000 x g, 5 dakika santrifüjleme, iii) süpernatant elemine edildikten sonra geriye kalan pelet üzerine 50 µL NaOH ilave edilmiş ve karışım 95-100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır. Kaynatma sonrasında karışımı nötralize etmek amacıyla 4 µL Tris-HCl buffer (1 M, pH 7.5) ilave edilmiştir. Bu karışım 20.000 x g ve 4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant LAMP ve PCR işlemleri için DNA template olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Ön zenginleştirme sıvılarından DNA ekstraksiyonu

1. Adım
Ön zenginleştirme karışımı $900 \times g$, 1 dakika santrifüjleme
2. Adım
Süpernatant $10,000 \times g$, 5 dakika santrifüjleme Pellet 50 μL NaOH (25 mmol/L) içerisinde 95°C , 5-10 dakika kaynatma 4 μL Tris-HCl buffer (1 mol/L, pH 7.5) Nötralizasyon
3. Adım
$20,000 \times g$, 5 dakika santrifüjleme 2 μL Süpernatant DNA örneği

3.3.1.c. DNA saflığının belirlenmesi

Alkali kaynatma metoduyla hem izolat hem de materyallerden DNA örnekleri Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, USA) cihazında Take3 Micro-Volume Plate kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaza özgü olan Gen5 DNA Quantification yazılımı kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Öncelikle Take3 plate mikro kuyucuklar moleküler saf su ile kalibre edilmiş ve kalibrasyon değerleri optimize edildikten sonra DNA ekstraksiyon örneklerinden 1 μL alınarak kuyucuklara yerleştirmiş ve yazılım ile ölçümler alınmıştır. A_{260}/A_{280} oranı 1.8 – 2.0 aralığında saflıklar yorumlanmıştır.

3.3.2. LAMP uygulaması**3.3.2.a. Primerler ve primer karışımının hazırlanması**

İzole edilen *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. izolatlarını doğrulamak, tavuk etlerinden bu patojenleri LAMP ile belirlemek için aşağıdaki primerler (Integrated DNA Technologies, IDT, Leuven, Belçika) temin edilmiştir (Çizelge 3.3). Primerler liyofilize halde HPLC saflığında olup üreticinin yönergesine göre ultra saf su ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada LAMP için kullanılan primerler

Hedef/Referans	Primer ^c	Sekans (5'-3')
<i>C. jejuni</i> Yamazaki (2013) ^a	FIP	ACAGCACCGCCACCTATAGT- AGAAGCTTTTTTAACTAGGGC (F1c-F2)
	BIP	AGGCAGCAGAACTTACGCATT- GAGTTTGAAAAACATTCTACCTCT (B1-B2c)
	F3	GCAAGACAATATTATTGATCGC (F3)
	B3	CTTTCACAGGCTGCACTT (B3c)
	LF	CTAGCTGCTACTACAGAACCAC (LFc)
	LB	CATCAAGCTTCACAAGGAAA (LB)
<i>C. coli</i> Yamazaki (2013) ^a	FIP	AAGAGATAAACACCATGATCCCAG- TCATGAATGAGCTTACTTTAGC (F1c-F2)
	BIP	GCGGCAAAGACTTATGATAAAGC- TACCGCCATTCTCTAAAACAAG (B1-B2c)
	F3	TGGGAGCGTTTTTGATCT (F3)
	B3	AATCAAACCTCACCGCCAT (B3c)
	LF	CCACTACAGCAAAGGTGATG (LFc)
	LB	CCACGATAGCCTTTATGGA (LB)
<i>Salmonella</i> spp. Chen et al. (2011) ^b	FIP	GCGCGGCATCCGCATCAATA- TGCCCGGTAAACAGATGAGT (F1c-F2)
	BIP	GCGAACGGCGAAGCGTACTG- TCGCACCGTCAAAGGAAC (B1-B2c)
	F3	CGGCCCGATTTTCTCTGG (F3)
	B3	CGGCAATAGCGTCACCTT (B3c)
	LF	GGCCTTCAAATCGGCATCAAT (LFc)
	LB	GAAAGGGAAAGCCAGCTTTACG (LB)

^a*C. jejuni* için GenBank Erişim Numarası (GEN): AL111168.1 (*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* NCTC 11168); (*C. coli* için GEN: AAFL01000003 (*Campylobacter coli* RM2228)

^b*Samonella* spp. için GEN: M90846.1 (*Salmonella* serovar Typhimurium *invA* gene)

^cF3: forward internal primer; B3: backward inward primer; FIP: forward inner primer; BIP: backward inner primer; LF: loop forward primer; LB: loop backward primer

LAMP uygulamasında kullanılmak üzere her bir reaksiyonda primer karışımı Çizelge 3.4'te belirtilmiştir. Toplam reaksiyon hacminde (25 µL) primer konsantrasyonu optimize edilmiştir. Aynı reaksiyon hacminde *C. coli* ve *C. jejuni* için (1.3 µL+ 1.3 µL) 2.6 µL primer karışımı kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. LAMP reaksiyonu için primer karışım oranları

Primer	Hacim (µL)	Hazırlama
FIP	0.4	(100 µmol/L) konsantrasyondaki her bir primerden belirtilen hacimlerde alınıp LAMP reaksiyon başına toplamda 1.3 µL olacak şekilde optimizasyon yapılmıştır.
BIP	0.4	
LoopF	0.2	
LoopB	0.2	
F3	0.05	
B3	0.05	
Toplam:	1.3 µL	

3.3.2.b. Hydroxynaphthol Blue (HNB) boyasının hazırlanması

Hydroxynaphthol Blue (HNB) (Sigma Aldrich, 33936-10G) toz halinde temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı: 620,47 g/mol olan boyadan 0,02325 g 10 mL saf su içerisinde çözündürülmüş ve karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. 25 µL LAMP reaksiyon hacminde 1 µL ilave edildiğinde konsantrasyonu 150 µM olarak ayarlanmıştır.

3.3.2.c. LAMP reaksiyonu

LAMP reaksiyonu için *Bst* 3.0 DNA Polimeraz ve bu enzimin optimum aktivite gösterdiği ortamı sağlayan Isothermal Amplification Buffer II Pack (New England Biolabs), dNTP (Sigma Aldrich), LAMP Primer karışımı, sonucun gözlenmesi için HNB ve reaksiyon hacmini tamamlamak için moleküler saf su kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve miktar/konsantrasyonları Çizelge 3.5'te gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.5. LAMP protokolü kullanılan bileşen ve miktar/konsantrasyonları

Bileşen	Hacim (25 µL/Reaksiyon)
10X Isothermal Amplification Buffer II	2.5 µL
10 mM dNTPs	3.5 µL (1.4 mM final)
100 mM MgSO ₄	1.5 µL (6 mM+2 mM buffer=8 mM final)
Primerler	1.3 µL (1.6 µM FIP/BIP, 0.2 µM F3/B3, 0.8 µM LoopF/B)
<i>Bst</i> 3.0 (8,000 U/mL)	1 µL (0.32 U/µL)
DNA template	2 µL (50 µg/mL)
HNB	1 µL (150 µM)
H ₂ O	Saf su ile 25 µL'ye tamamlanmıştır.

1. 0.2 mL PCR tüplerinde LAMP reaksiyonu

Çizelge 3.5'te belirtilen reagentler uygun hacimlerde alınarak toplamda 25 µL reaksiyon karışımı 0,2 mL PCR tüplerinde ısıtıcı blokta 63-65°C sıcaklıkta 1 saat süreyle tutulmuştur. Bu süre sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 80-82°C'de 10 dakika daha ısıtma yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda tüpler bir beyaz zeminde konumlandırılmış ve 10 dk içerisinde HNB renk değişimi gözlemlenmiştir.

2. 96-kuyucuklu plate'de (96-well plate) LAMP reaksiyonu

LAMP reaksiyon karışımı 50 µL/reaksiyon olacak şekilde hazırlandıktan sonra her bir kuyucuğa karışım dağıtılmıştır. Mikroplate, polietilen bir film ile kaplandıktan sonra bir inkübatörde 63-65°C ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında plateler oda sıcaklığına soğutulmuş (5 dakika) ve film çıkarıldıktan sonra plate okuyucuda (Epoch Microplate Spectrophotometer) absorbans ölçümü yapılmıştır. Cihaz 750 nm dalga boyunda saf su ile sıfırlandıktan sonra 350-750 nm arasında 1 nm aralıkla ölçümler alınmıştır. HNB etkisiyle gerçekleşen renk değişimi absorbans ölçümleriyle değerlendirilmiş ve amplifikasyonlar belirlenmiştir (Goto *et al.* 2009).

3.3.3. qPCR uygulaması

Real-time PCR uygulamasında *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp.'nin gıdalarda belirlenmesi için özel olarak dizayn edilen *mericon Salmonella* spp Kit (QIAGEN, Cat No./ID: 290015), *mericon Campylobacter* spp Kit (QIAGEN, Cat No./ID: 290035) kullanılmıştır. Kit içeriğinde Internal Control (iç kontrol), Positive Control (pozitif kontrol), Multiplex PCR Master Mix, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer, RNase-free water mevcuttur. Üreticinin reaksiyon hazırlama yönergesine uyularak PCR reaksiyonu PCR cihazında (Rotor-Gene Q, Qiagen, US) Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7 belirtilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonuçları Rotor-Gene Q 2.3.1.49 (QIAGEN) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Örnek ve kontrol reaksiyon hacimleri

Bileşen	Örnek PCR	Pozitif PCR kontrol	Negatif PCR kontrol
Sulandırılmış mericon PCR karışımı	10 µL	10 µL	10 µL
Örnek DNA template	10 µL	-	-
Çözündürülmüş pozitif Kontrol DNA	-	10	-
QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer Veya RNase-free water	-	-	10 µL
Toplam Hacim	20 µL	20 µL	20 µL

Çizelge 3.7. Rotor-Gene Q için PCR protokolü

Adım	Süre	Sıcaklık	Açıklama
Başlangıç PCR aktivasyonu	5 dakika	95°C	HotStarTaq Plus DNA polimeraz aktivasyonu
3 aşamalı Döngü			
Denatürasyon	15 saniye	95°C	40 cycles (Döngü) 60°C'de veri toplama
Bağlanma	15 saniye	60°C	
Uzatma	10 saniye	72°C	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Genel mikrobiyolojik kalitenin yorumlanması amacıyla TAMB, psikrotrofik, koliform grubu bakteriler, fekal koliform (*E. coli*) ve maya-küf sayımı yapılmıştır. Bu sonuçlar tavuk etlerinin hem raf ömrünün hem de hazırlama, dağıtım, muhafaza gibi şartlarının açıklanması açısından önem arz etmektedir (Sharaf and Sabra 2012). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının yüksek seviyede olduğu çiğ tavuk etlerinin hijyenik şartlarda üretilmediği ve muhafaza edilmediği kabul edilmektedir.

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere bütün materyallerde TAMB sayısı 5-6 Log kob/g seviyesinde tespit edilmiştir. Bu seviyenin bütün örneklerde birbirine yakın olması genel olarak tavuk etlerinde sıklıkla rastlanmaktadır. Fakat, hazırlama ve satışa kadar olan muhafaza şartlarının değişkenlik göstermesinden dolayı aynı işletmeden çıkan etlerin raf ömürlerinin farklılık göstermesi beklenen bir sonuçtur. TAMB sayısının 7 Log kob/g seviyelerinde görülmesi genelde tavuk etlerinde hızlı bir bozulmanın göstergesi olarak kabul görmektedir (Rouger *et al.* 2017). Çalışmamızda en yüksek değerin 6 Log kob/g çıkması Türk Gıda Kodeksi’nin vermiş olduğu değerlere uygunluk göstermektedir.

Çetin (2006), tavuk etlerinde yaptıkları çalışmada 6-7 Log kob/g seviyesinde mikrobiyal yük tespit etmiştir. Yine Efe (2005) yaptığı çalışmada tavuk butlarında Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısını; en düşük 2 Log kob/g, en yüksek 7,81 Log kob/g olduğunu bildirmiştir. Yıldırım ve Süngü (2011) tarafından Antalya’da çeşitli satış yerlerinden toplamda 45 adet tavuk eti ile yaptıkları bir çalışmada; toplam mezofilik aerobik bakteri 5-7 Log kob/g, koliform bakteri sayısını ise 1-4 Log kob/g seviyesinde tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.1. Tavut etlerinin mikrobiyolojik özellikleri (Log kob/g)

Örnek	GÖĞÜS ETİ				BAGET				KANAT			
Analiz	TAMB	PS	MK	KL	TAMB	PS	MK	KL	TAMB	PS	MK	KL
1	5,64	5,95	3,84	4,53	5,71	6,21	4,10	3,96	6,12	6,32	3,56	3,96
2	5,55	5,67	3,65	4,48	5,86	5,96	4,42	4,10	6,20	5,67	3,64	3,56
3	5,22	5,12	3,48	3,98	6,10	6,01	4,36	3,82	6,01	6,24	4,10	4,10
4	5,02	5,47	2,86	3,84	6,22	6,38	3,98	4,60	6,30	5,86	4,12	3,28
5	5,14	5,24	3,24	4,45	5,84	5,40	3,72	4,12	6,42	5,88	3,86	2,98
6	6,18	5,98	3,36	3,58	6,32	5,78	3,84	3,63	5,96	5,98	3,98	2,74
7	5,32	5,48	2,98	3,68	5,78	5,63	3,38	3,80	5,98	6,10	3,42	3,22
8	5,36	5,28	3,12	4,12	5,42	5,82	3,45	4,21	6,24	6,28	4,12	3,46
9	5,45	5,32	3,40	4,25	6,24	6,23	3,65	4,24	6,10	5,96	3,82	3,76
10	5,82	5,74	3,48	4,36	6,56	6,58	3,86	4,28	5,96	6,01	4,20	3,42
11	5,69	5,46	3,68	4,38	6,74	6,01	4,01	4,36	5,80	6,20	4,02	3,91
12	6,58	6,12	3,22	4,10	6,12	6,24	4,15	3,32	5,72	6,05	3,45	3,16
13	6,24	6,18	3,42	4,24	6,40	6,30	3,69	3,65	6,32	6,12	3,86	3,44
14	6,70	6,48	3,68	4,36	5,98	5,65	3,74	4,12	6,48	5,93	4,02	4,31
15	6,24	6,32	3,26	4,20	6,62	5,63	4,10	3,90	6,82	6,01	4,16	4,10
16	6,35	6,66	3,52	3,98	6,53	6,24	4,20	3,84	6,10	5,58	3,86	2,86
17	5,69	6,01	3,58	3,86	6,45	5,80	4,52	4,20	6,20	5,98	3,82	3,55
18	5,78	5,98	3,64	3,65	6,20	5,66	4,58	3,84	6,30	6,14	4,45	3,24
19	5,48	5,74	3,42	3,45	6,42	5,99	3,98	4,10	6,24	6,78	3,96	2,32
20	6,32	6,18	3,86	3,42	6,68	5,87	4,65	4,03	6,02	5,96	4,44	3,10
21	6,47	6,48	3,86	3,28	5,96	6,11	4,12	3,55	5,96	5,76	4,12	3,22
22	6,58	5,94	3,28	3,64	5,35	6,23	4,36	3,75	5,80	7,22	3,45	2,96
23	6,05	5,76	3,62	4,12	5,99	6,54	4,01	4,28	6,12	6,36	4,06	2,92
24	5,98	5,72	3,68	4,20	6,05	5,68	4,20	4,16	6,50	6,42	4,15	3,26
25	5,74	5,69	3,36	4,02	5,86	6,01	4,24	3,45	6,30	5,69	3,76	3,65
26	5,68	5,86	3,68	3,36	5,69	6,32	4,32	4,42	6,42	7,14	4,11	2,48
27	5,38	5,86	3,81	3,28	5,75	5,45	3,96	3,75	5,95	6,05	4,02	3,54
28	6,22	6,76	3,98	3,64	6,01	5,89	3,36	4,10	6,38	6,98	3,80	3,69
29	6,28	6,48	3,36	3,84	6,05	5,99	3,78	4,20	6,23	5,89	3,65	3,87
30	6,38	5,98	3,21	4,12	6,12	6,05	3,72	4,32	6,42	6,28	4,28	2,78
31	6,25	5,98	3,24	4,32	6,23	5,67	3,98	3,86	5,90	6,54	3,57	3,15
32	5,96	5,64	3,65	3,54	5,88	6,32	4,12	4,14	6,38	5,78	4,36	3,16
33	5,82	5,58	3,36	3,66	6,02	6,24	4,22	3,72	6,68	6,40	4,20	3,28
34	6,24	6,48	3,69	3,27	6,41	5,87	3,96	4,18	5,74	7,02	3,95	2,67
35	6,32	6,24	3,48	4,16	6,33	6,12	3,86	3,81	5,94	6,14	4,12	2,44
36	6,46	6,14	3,48	4,02	5,96	6,01	3,84	4,01	6,52	5,86	4,36	2,61
37	5,96	5,44	3,24	4,17	6,10	5,98	3,74	3,42	6,11	6,23	3,48	3,41
38	5,48	5,71	3,39	3,21	6,26	6,15	3,80	4,22	6,35	6,78	3,56	2,73
39	6,24	6,12	3,32	3,65	6,01	6,21	4,16	3,88	5,88	5,98	4,14	3,37
40	6,78	6,54	3,24	3,45	6,54	5,68	3,94	4,12	6,24	6,16	4,18	4,10
41	6,24	6,10	3,20	3,94	5,94	6,12	4,02	4,16	6,67	5,74	4,38	3,62
42	5,92	5,74	3,30	3,68	6,15	6,02	3,58	3,94	5,73	6,45	3,94	3,73

TAMB: Toplam Aerobik Mezofilik, PS: Psikrotrofik, MK: Maya-Küf, KL: Koliform

Piyasadan elde ettiğimiz materyaller $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında muhafaza edildiği görülmüştür. Düşük sıcaklıklarda tavuk etlerinde gelişebilen psikrotrof özellikli çoklu bakteri cinsleri gelişme gösterebilmektedir. Bu bakteriler tavuk etlerinde çeşitli uçucu bileşenler ve ekzopolisakkaritler üreterek istenmeyen tat, koku, renk, tekstüre sebep olmaktadır (Hinton *et al.* 2004).

Çalışmamızda incelenen tavuk eti örneklerinde psikrotrof bakteri sayım sonucu değerlendirildiğinde 5-7 Log kob/g seviyesinde bir mikrobiyal yük görülmektedir.

Tespit edilen değerlere bakıldığında 6 Log kob/g seviyesindeki psikrotrof bakteri sayısı ürünün $8-10^{\circ}\text{C}$ 'de muhafazası sırasında mikrobiyal bozulmanın en önemli etkenlerinden biri olduğu görülmüştür. Çetin (2006), yaptığı çalışmada bagetlerde psikrotrof bakteri sayısını en düşük 6,12 Log kob/g, en yüksek 7 Log kob/g bulmuştur. Yine aynı çalışmada depolamanın ilerleyen günlerde sonuçların 10 Log kob/g seviyelerine yükseldiği bildirilmiştir. Çalışmada kullandığımız materyallerden bir kısmı buzdolabında muhafaza edilmiştir. İlerleyen süreç içerisinde etlerin yüzeyinde görülen renk değişimi ve yapışkanlık, istenmeyen koku, bozulmanın belirtisi olarak görülmüştür.

Bu değerlerin genellikle üst sınırlarda olması depolama koşullarının uygun olmadığı veya değişken olduğunu göstermektedir. Üretim aşamasından satışa kadar geçen süreç içerisinde koşulların değişmesiyle birlikte tavuk etleri arasında farklılıklar olabilmektedir. Ayrıca, ilk mikrobiyal yükün yüksek olması ürünlerin mikrobiyal bozulmasını hızlandırmaktadır. Soğuk depolama koşullarında cins bazında çeşitlilik azalsa da, bozulmaya sebep olan bazı türler ön plana çıkmaktadır (Chaillou *et al.* 2015).

Bu çalışmada ortalama koliform sayısı en düşük 2,32 Log kob/g, en yüksek 4,53 Log kob/g olarak bulunmuştur. Standartlara bakıldığında 56 (%44) örnekte limitleri aşan koliform varlığı mevcuttur. Test edilen örneklerde fekal koliform varlığı 48 (%38) örnekte tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Tavuk etlerinde toplam koliform sayıları ve fekal koliform varlığı

	Koliform (Min-Max), Limiti aşan	Fekal Koliform (Var/Yok)
Standart Limit	3,70 Log kob/g	3,70 Log kob/g
Sonuç	2,32-4,53 Log kob/g, 56 (%44)	48 (%38)

Gökalp vd (1987), yaptıkları bir araştırmada tavuk göğüs ve but etlerinde ortalama koliform bakteri sayısını, sırasıyla 4,1 Log kob/g ve 5,23 Log kob/g olarak bulmuşlardır. Anar vd (1992), tavuk butları üzerine yaptıkları bir araştırmada koliform grubu bakteri sayısını en düşük 1,77 Log kob/g, en yüksek 5,47 Log kob/g, ortalama 5,27 Log kob/g bulmuşlar ve örneklerin %82,5'inde koliform grubu bakteriye rastladıklarını bildirmişlerdir. Sağun vd (1996)'nın, inceledikleri 20'şer but ve piliç göğüs numunesinde koliform grubu mikroorganizma sayısını sırasıyla ortalama 2,98 Log kob/g ve 3,14 Log kob/g olarak saptamışlardır. İncelenen but örneklerinin %45'inde ve göğüs örneklerinin %80'inde standartların üzerinde koliform grubu mikroorganizma bulunduğu ortaya konulmuştur. Çalışma sonuçlarımız bu çalışmalarla karşılaştırıldığında benzerlik ve farklılıklar görülmektedir. Bu benzerlik ve farklılıkların sebepleri materyallerin elde edildiği hayvanların yetiştirildiği yerden başlayarak kesim, yıkama, parçalama, paketlenme, depolama, taşıma gibi işlemlerin bütün olarak yer aldığı zincir içerisindeki uygulamalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Koliform grup bakterilere pek çok gıda hammaddeğinde rastlanmaktadır. Tavuk etlerinde koliformların bulunması, kötü sanitasyon koşulların ve hayvana ait intestinal içeriğin etlere bulaştığının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Erol 1999; Tunail 1999; Shar *et al.* 2010). Materyallerde fekal koliform varlığı (48/126, %38); dışkı kaynaklı kontaminasyon varlığının göstergesidir. Bu durum tavuklara ait enterik içeriğin karkasa bulaştığını veya materyalin parçalanması, hazırlanması aşamasında hijyen kurallarına uymayan personelden bulaşma olabileceği ihtimalini göstermektedir.

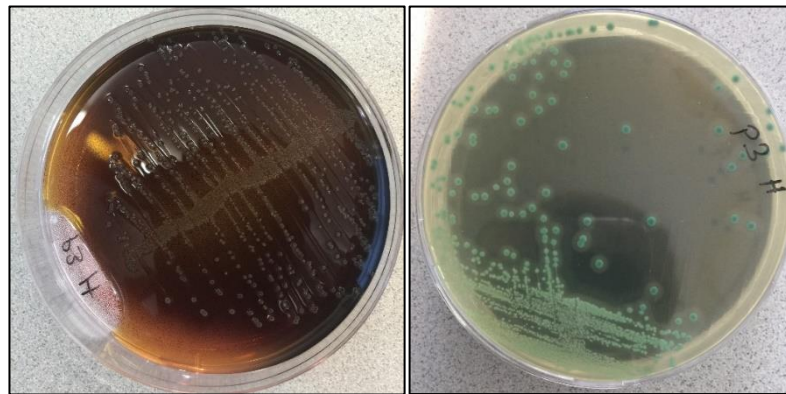
Küfler ve mayalar tavuk etinin bozulmasında etkili olan diğer bir mikroorganizma grubudur. Maya ve küfler, oldukça geniş pH aralığında (pH 2-9), depolama sıcaklığında (10-35°C) ve su aktivitesinde ($0,85 \geq$) üreyebilmektedirler. Ayrıca pektin ve diğer

kompleks karbonhidratları, organik asitleri, proteinleri ve lipitleri kullanabilmektedirler. Sayım sonuçları incelendiğinde maya-küf sayısı çalışmamızda 3-4 Log kob/g arasında belirlenmiştir. Tavuk etlerinde maya-küf varlığı genellikle bakteriyel popülasyona kıyasla düşük seviyede görülmektedir (Saikia and Joshi 2010). Çetin (2006), tavuk etinde yaptığı analizler sonucunda maya-küf sayısını ilk günde 5-6 Log kob/g seviyesinde tespit etmiştir. Aynı çalışmada 10.günde maya-küf sayısı 8-10 Log kob/g seviyesinde olduğu bildirilmiştir. Bu bulgulardan anlaşılabacağı üzere yüksek küf-maya kontaminasyonu görülen tavuk etlerinin raf ömrü depolama boyunca daha kısa olacaktır.

4.2. Tavuk Etlerinden İzole Edilen Patojen Bakterilerin Varlığı ve Bazı Özellikleri

4.2.1. Tavuk etlerinde *Listeria* spp. varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları

Araştırmada analize alınan 126 adet tavuk eti örneğinin 24'ünde (%19) *Listeria* spp. tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Doğrulan bu izolatların 6'sı *L. monocytogenes* (%25), 8'i *L. innocua* (%33,4), 6'sı *L. grayi* (%25), 2'si *L. welshimeri* (%8,3), 2'si *Listeria ivanovii* (%8,3) olarak bulunmuştur. Türlerin birbirinden ayrımı şeker fermantasyon testleri ve API *Listeria* test kiti ile yapılmıştır. Bu analizlerden sonra *L. monocytogenes*'in doğrulanmasında ayrıca lateral akış testi Singlepath L'mono kullanılmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Palcam ve ChromoCult katı besiyerlerinde *L. monocytogenes* kolonileri



Şekil 4.2. API Listeria test kitinin pozitif ve negatif görünümüleri



Şekil 4.3. Singlepath L'MONO lateral akış testiyle *L. monocytogenes* tespiti

Çizelge 4.3. Tavuk etlerinde hedef patojenlere ait var/yok durumu ve *S. aureus* sayısı

Örnek		GÖĞÜS ETİ				BAGET				KANAT			
MO		Sal	Camp	List	Staph ^a	Sal	Camp	List	Staph	Sal	Camp	List	Staph
1	PARTİ 1	-	-	-	3,56	-	-	+	-	-	-	+	-
2		+	-	+	-	-	+	-	2,62	-	-	-	-
3		+	-	-	2,60	-	-	+	-	+	-	-	-
4		-	-	-	3,20	+	-	-	-	-	-	-	2,71
5		-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2,46
6		-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7		+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
8		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,95
9		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
10		-	+	-	-	-	-	+	2,17	-	+	-	-
11		+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
12		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
13		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	PARTİ 2	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
16		-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
17		+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
18		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2,60
19		-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
20		+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
21		-	+	-	-	-	-	-	2,36	-	-	-	-
22		+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
23		-	-	-	3,32	+	-	+	-	-	-	-	-
24		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
25		+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
26		-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
27		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,04
28		+	-	-	2,90	-	-	-	-	-	-	-	2,23
29	PARTİ 3	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
30		+	-	-	2,50	-	-	+	-	-	+	-	-
31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1,47
32		-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
33		+	-	-	-	-	+	-	2,73	-	-	-	-
34		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
35		+	-	-	2,14	-	+	-	-	+	+	-	-
36		-	+	+	-	-	-	-	2,32	-	-	-	-
37		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
38		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41		-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
42		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Sal: *Salmonella* spp., Camp: *Campylobacter* spp., List: *Listeria* spp., Staph: *Staphylococcus aureus*, ^aLog kob/g, +: Var, -: Yok, MO: Mikroorganizma

Kontaminasyon oranının yüksek olması ve *Listeria* spp.'nin buzdolabı sıcaklığında canlı kalma, üreyebilme özelliği düşünüldüğünde bu durumun hassasiyet taşıdığı görülmektedir. Çünkü, tavuk etlerinin raf ömrü boyunca canlı kalabilen bu mikroorganizmalar çapraz kontaminasyona sebep olabilmekte veya yetersiz ısı işlem uygulanmış etlerle insanlara taşınabilmektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmaların izolasyon oranları genellikle farklılık göstermektedir. Bu farklılığa tavuk etlerinin çiftlikten mutfağa gelene kadar geçen süreç içerisindeki koşullar sebep olabilmektedir. Özellikle enterik içerikleri *Listeria* spp. taşıyan tavukların yıkama sularının diğer tavuk karkas ve etlerine bulaşması çevreye yayılımı arttırmaktadır. Ayrıca, kontamine olmuş bir tavuk etinin; etken açısından temiz olan diğer tavuk etlerine çapraz kontaminasyonla geçtiği de düşünülmektedir. Bu bağlamda parçalamada kullanılan kesici aletlerin, yüzeylerin ve personelin de etkisi vardır.

Güven ve Patır (1998) yılında Elazığ ilinde yaptıkları bir çalışmada 100 adet tavuk etini *Listeria* spp. yönünden incelemiş ve 64 materyalde etkeni pozitif olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen izolasyon oranından (%19) yüksek bir oranın belirtildiği çalışmada farklılık göz önüne alındığında hijyenik kurallara ve kontaminasyonu önleme prosedürlerine uyulmadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda *Listeria* spp. izolatlarının %25'i *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Özmen ve Kılıç (2006) yaptıkları çalışmada 100 adet tavuk karkasında (%76) yüksek oranda *Listeria* spp. tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar identifikasyon ve tür ayrımı sonucunda 24 izolatın (%31) *L. monocytogenes* olarak tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer olarak elde ettiğimiz bulguları göz önüne aldığımızda; tavuk eti tüketiminin artması ve fast-food alışkanlığının yaygınlaşması nedeniyle, kanatlı hayvanların yetiştirme aşamasından kesimhanelere ve paketlenme, soğukta muhafaza ünitelerinden tüketiminin yapıldığı yerlere kadar olan zincirde hijyenik koşulların yerine getirilmesinin büyük önem taşıdığını söylemek mümkündür.

Özmen ve Kılıç (2006) yine aynı çalışmada tavuklara ait enterik içerikten 12 (%12) adet

Listeria spp. tespit etmişlerdir. Fakat tavuk etlerinde %76 oranında pozitif bir sonucun çıkması; yetersiz hijyen uygulamaların ve kontaminasyonların yüksek olduğu kanaatini oluşturmuştur. Bu çıkarımları destekleyici olarak başka bir çalışmada Ceylan vd (2008) 116 tavuk eti örneğinde 38 (%33) *L. monocytogenes* bulmuş ve izolatları tanımlamışlardır. Çalışmada, hijyenik kural ve uygulamalarının yetersizliği vurgulanmıştır.

Praakle *et al.* (2006) tavuk ayaklarında yaptıkları çalışmalarda 240 adet örneğin 169'nun (%70) *L. monocytogenes* taşıdığını bulmuşlardır. Bu veri dar bir alanda yetiştirilen tavukların, fekal materyal ile kontamine olmuş ortamda kolaylıkla etkeni taşıyabileceğini göstermektedir. Bu şekilde hayvanın vücuduna bulaşan mikroorganizmanın kesim ve işleme sırasında karkasa bulaşma riski de artmaktadır.

Birçok antimikrobiyal madde tavuk yetiştiriciliğinde yemlerine ve içme sularına tedavi amaçlı, enfeksiyondan koruyucu veya gelişmeyi etkileyici faktör olarak ilave edilmektedir. Kümes hayvanları ve tavuk etlerinden izole edilen *Listeria* spp.'lerin antibiyotiklere çoklu direnç göstermelerinin sebebi farklı konsantrasyonlarda antibiyotik kullanımı olduğu belirtilmektedir.

Kültüre edilen 24 adet *Listeria* spp. izolatın 12 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. Bütün izolatların nalidiksik asid'e (NA) karşı dirençli olduğu görülmüştür. *Listeria* spp. genel olarak bu antibiyotiğe karşı dirençli olarak tespit edilmektedir. Nitekim nalidiksik asit antibiyotiği *Listeria* spp. izolasyonunda kullanılan ön zenginleştirme sıvı besiyerlerine ilave edilmektedir. Antibiyotik *Listeria* spp. dışında diğer mikrobiyotayı bu şekilde inhibe etmektedir. Bunun yanında S antibiyotiğine karşı orta dirençlilik tespit edilmiştir. Karpabenem sınıfı (MEM ve ETP) antibiyotikler, siprofloksasin (CIP), ampisilin (AMP), Trimetoprim-Sulfametoksazol (SXT), kloromfenikol (C), tetrasiklin (TE) *Listeria* spp. inhibisyonunda en etkili olanlardır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Listeria* spp. izolatlarına ait antibiyotik zon çapları (mm)

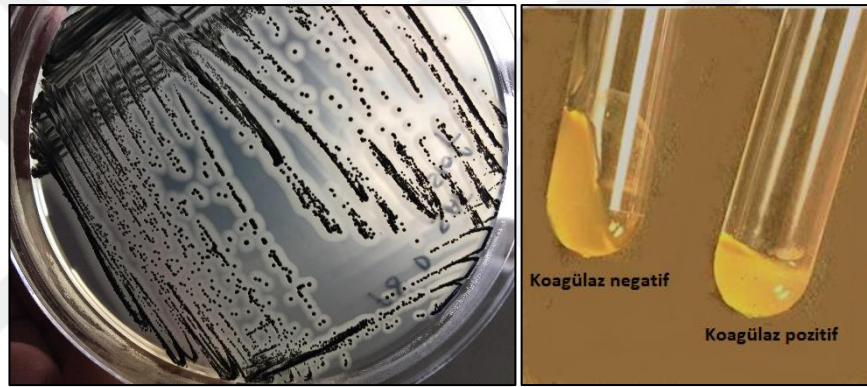
İzolat	Antibiyotik ve zon çapları											
	MEM	ETP	CIP	K	S	W	TE	CN	AMP	NA	C	SXT
1	18	19	16	0	0	0	8	10	24	0	14	0
2	26	25	20	21	12	30	25	19	30	0	26	28
3	21	20	29	0	0	0	0	12	24	0	20	0
4	26	30	24	20	14	30	29	20	30	0	24	30
5	28	28	23	20	15	33	32	21	30	0	32	30
6	32	30	26	21	15	30	24	20	34	0	24	25
7	30	32	30	30	16	36	30	23	30	0	30	31
8	27	26	23	21	13	30	29	17	27	0	25	30
9	28	25	26	28	27	29	25	19	28	0	16	27
10	30	27	24	20	15	32	28	21	29	0	31	28
11	29	29	29	26	20	30	30	12	27	0	24	28
12	27	30	28	24	14	30	28	14	33	0	32	27
13	30	32	29	20	16	30	26	20	29	0	25	0
14	25	27	25	22	15	29	25	19	27	0	30	30
15	30	27	24	25	14	29	27	18	24	0	32	32
16	30	29	25	27	14	31	28	21	30	0	26	26
17	31	28	25	26	13	33	24	22	28	0	25	30
18	28	30	29	24	15	32	25	25	30	0	30	28
19	27	24	26	23	17	30	29	20	32	0	31	24
20	30	28	29	24	15	28	27	21	26	0	28	26
21	25	27	27	24	15	28	30	23	28	0	28	30
22	29	27	27	25	16	29	28	22	28	0	24	27
23	30	29	28	21	17	32	25	24	30	0	32	27
24	26	30	27	22	15	30	27	25	27	0	32	31
Minumum	18	19	16	0	0	0	0	10	24	0	14	0
Maksimum	32	32	30	30	27	36	32	25	34	0	32	32
Ortalama	27	27	25	20	14	27	24	19	28	0	26	24

4.2.2. Tavuk etlerinde *S. aureus* varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları

S. aureus'un gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler arasında örnekleme tekniği, kullanılan besiyerlerinin çeşidi başta gelmektedir. Ayrıca besiyerinde gelişen şüpheli kolonilerin doğrulanması amacıyla yapılan testler de önemlidir. Bu çalışmada, tavuk etlerinin homojenizasyonu ve yıkanmasıyla (rinsing) hazırlanan dilüentlerden *S. aureus* aranmıştır. Analiz edilen 126 materyalden 19 (%15) *S. aureus* tespit edilmiştir. Bu izolatların insanlarda risk oluşturmasını değerlendirmek için tavuk etlerinde kontaminasyon seviyesine (kob/g) bakmak yeterlidir. Yani; *S.*

aureus varlığının yanısıra sayısı göz önüne alınarak değerlendirme yapılmaktadır.

Çalışmamızda *S. aureus* için %15'lik kontaminasyon oranı içerisinde en yüksek sayıda 3,56 Log kob/g, en düşük 1,47 Log kob/g belirlenmiştir. Çiğ kanatlı etleri için mikrobiyolojik kriterler tebliğine baktığımızda numunenin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla *S. aureus* sayısı $5,0 \times 10^3$ kob/g (3,70 Log kob/g) olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tavuk etlerinin hiçbirinde bu limiti aşan sayı tespit edilememiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.4. *S. aureus*'un Baird-Parker Agar besiyerinde görünümü ve koagülaz özelliği

Tavuklarda *S. aureus* genellikle deri ve burun boşluklarında veya sağlıklı tavukların intestinal içeriklerinde kolonize olabilmektedir. Hayvan veya insan kaynaklı biyotiplerin belirlenmesiyle kontaminasyon kaynağına ulaşmak daha da kolaylaşmaktadır. İnsan biyotipi tespit edildiğinde; çiğ tavuk karkaslarının parçalanması, etlerin işlenmesi sırasında çalışan personelden materyallere bulaşma olduğu düşünülmektedir. *S. aureus* ve enterotoksijenik *S. aureus* suşlarının tavuk işletmelerinde çalışanların ellerinden tespit edildiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Saitoh *et al.* 1994; Arai *et al.* 2004).

Enterotoksijenik özelliğe sahip *S. aureus* suşlarının gıdalarda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaştığında bir ekzotoksin olan enterotoksinler gıda zehirlenmesine sebep olabilmektedir. Gıdalarda enterotoksinin çok düşük seviyelerde bile (0.5-0.75 ng/mL)

gıda zehirlenmesine yol açtığı bildirilmektedir (Ünlütürk ve Turantaş 2003). Bu sebeple *S. aureus*'un kendisinin yanı sıra ürettikleri metabolitler de önem arz etmektedir.

Çiğ tavuk etlerinde *S. aureus* varlığı ve kontaminasyon seviyesi ile ilgili ülkemizde birçok çalışma mevcuttur. Çalışmamızda örneklerde *S. aureus* tespit edilmesine rağmen limitleri aşan bir sayı görülmemiştir. Sonuçlarımızdan farklı olarak Koçyiğit (2002) tavuk ve hindi etlerinde *S. aureus* varlığını araştırmış ve 42 materyalin hepsinin kontamine olduğunu tespit etmiştir. Sayım sonuçlarına göre 4 örnekte limit sınırları üstünde (5×10^3 kob/g) kontaminasyon saptanmıştır. Etkenin varlığının yanı sıra sayısının da dikkati alındığı düşünülürse kontaminasyonun önemli olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda en yüksek *S. aureus* sayısı 3,56 Log kob/g olarak tespit edilmiştir. Efe ve Gümüşsoy (2005) 50 adet dondurulmuş tavuk karkasına ait deri, but ve göğüs kısımlarını *S. aureus* açısından incelemiş ve en yüksek kontaminasyon seviyesinin 4,78 Log kob/g olduğunu bildirmişlerdir. Dondurularak muhafaza edilen bu tavuk etlerinin çok yüksek oranda etken ile kontamine oluşu; bu etlerin parçalanması aşamasında çapraz kontaminasyona uğradığı ve yetersiz pişirme durumunda ve toksin ihtimalinden dolayı risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda kullanılan taze ve dondurulmamış tavuk etlerinden farklı olarak dondurulmuş bir üründe izin verilen limitleri aşan bir kontaminasyonun olması gıda güvenliği açısından bir risktir.

Bu çalışmada *S. aureus* izolatları (19/126, %15) ertapenem (ETP), meropenem (MEM), ampicilin (AMP) antibiyotiklerine karşı yüksek duyarlılık sergilemiştir (Çizelge 4.5). Bu antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarda bile etkeni inhibe edeceği görülmektedir. Nalidiksik asit, kanamisin, streptomisin ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı direnç görülmüştür. Ayrıca, bakterilerin çoğalmasını yüksek seviyede engelleyici etki gösteren ETP ve MEM antibiyotikleri benzer zon çapları oluşturarak aynı seviyede inhibisyon sağlamışlardır.

Çizelge 4.5. *S. aureus* izolatlarına ait antibiyotik zon çapları

İzolat		Antibiyotik ve zon çapları (mm)											
		MEM	ETP	CIP	K	S	W	TE	CN	AMP	NA	C	SXT
1	<i>S. aureus</i>	30	36	22	15	13	0	10	20	30	12	23	0
2		29	32	20	16	12	0	8	20	31	0	9	0
3		31	32	20	14	11	21	24	18	34	0	23	21
4		29	30	20	16	11	20	30	18	33	0	26	24
5		30	32	20	16	13	22	25	18	32	0	22	22
6		30	28	25	11	15	20	10	20	35	0	25	20
7		29	34	20	23	17	0	8	24	32	0	8	0
8		27	30	28	19	14	20	28	20	31	12	25	24
9		32	30	24	16	12	20	25	18	32	0	20	20
10		29	33	24	16	12	20	30	20	30	0	28	25
11		30	30	25	16	14	19	28	24	31	0	24	20
12		25	31	25	18	14	20	30	18	32	0	25	21
13		29	30	22	18	12	19	26	19	29	0	24	22
14		36	29	21	16	14	18	28	18	28	0	21	20
15		30	28	24	18	13	20	30	19	30	0	20	23
16		32	30	22	14	16	20	26	20	33	0	23	22
17		27	27	24	16	12	20	28	18	34	0	25	22
18		29	30	22	16	13	22	18	18	30	10	22	23
19		30	34	20	15	14	0	8	18	31	12	24	19
Minimum		25	27	20	11	11	0	8	18	28	0	8	0
Maksimum		36	36	28	23	17	22	30	24	35	12	28	25
Ortalama		29	30	22	16	13	15	21	19	31	2,7	21	17

4.2.3. Tavuk etlerinde *Salmonella* spp. varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları

Salmonella spp. varlığının tespiti için materyallerin ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme işlemleri sonrasında seçici katı besiyerlerinde koloni özelliklerinin gözlemlenmesi gerçekleştirilmiş ve şüpheli koloniler klasik biyokimyasal testlerin yanı sıra API 20E test kiti ile tanımlanmıştır (Çizelge 4.6). İdentifikasyon sonucunda 44 örnekte *Salmonella* spp. (%35) varlığı saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.6. *Salmonella* spp. için biyokimyasal testler ve API 20E sonucu

	TSI Agar	LI Agar	API 20E
44 izolat	+	+	%98,8-99,9 (<i>Salmonella</i> spp.)

Capita *et al.* (2003), İspanya’da kanatlı eti ve ürünlerinde *Salmonella*’nın varlığını araştırmak amacıyla tavuk karkası, tavuk parçaları ve iç organları (kanat, but, karaciğer ve yürek) ve işlenmiş tavuk ürünleri (sosis, hamburger köftesi) üzerine yaptıkları çalışmada örneklerde ortalama %49 oranında *Salmonella* spp. belirlemişlerdir. Erol vd (2004), tavuk karkaslarında *Salmonella* spp. varlığını araştırmak için yapmış oldukları çalışmada (61/68) %88,4 oranında izolasyon sağlamışlardır. Çalışma sonuçlarımızla kıyaslandığında bu sonuçların yüksek olduğu görülmektedir. Belirlenme oranları ülkeden ülkeye değiştiği gibi, ülke içerisinde de farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıklara genel olarak tavuk eti üretim zincirinde hijyen ve sanitasyon uygulamaları sebep olabilmektedir.

Bizim çalışmamızda göğüs etlerinde %42 (18/42), bagetlerde %33 (14/42), kanatlarda %28 (12/42) oranında *Salmonella* spp. tespit edilmiştir. Efe (2005), Ankara Garnizonunda tüketime sunulan tavuk etlerinde yaptığı analizler sonucunda tavuk butlarında %18, tavuk derisinde %26, tavuk göğsünde %16 seviyesinde *Salmonella* spp. izole etmiştir. Tavuk etlerinin farklı oranlarda kontaminasyon göstermesi yıkama veya parçalama işlemleri sırasında *Salmonella* spp.’nin yüzeylere yayılımı ile açıklanabilir.

Çalışma sonucumuzdan farklı olarak Ünlü (2011), Ankara, Bolu ve Balıkesir’deki tavuk işletmelerinden elde edilen 721 tavuk karkas örneğinin 100 adedinin (%13,8) *Salmonella* spp. ile bulaşmış olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamız ile kıyaslandığında düşük bir kontaminasyon seviyesi görülmektedir.

Çalışmamızda *Salmonella* spp. kontaminasyon seviyesinden (%35) fazla görülen çalışmalar da mevcuttur. Türk (2012), 2008 ve 2009 yıllarında Samsun piyasasında satışa sunulan 150 tavuk materyalini (75 karkas ve 75 parça eti) *Salmonella* spp. varlığı

açısından geleneksel yöntem kullanarak analiz etmiştir. Sonuç olarak toplamda 150 örneğin 67'sinin (%45) *Salmonella* spp. ile kontamine olduğunu rapor etmiştir.

Salmonella spp. kontaminasyon sonuçlarının birbirinden farklı olması öncelikle etlerin elde edildiği hayvanların mikrobiyotasıyla alakalıdır. Bu mikrobiyota temelde hayvanın beslenme ve barınma koşulları gibi birçok sebepten etkilenmektedir. Kontamine olmuş yem ve sularla beslenen hayvanların intestinal içeriklerinden çevreye bulaşan etken diğer hayvanları da risk altına koymaktadır. *Salmonella* spp. ile kontamine olmuş bu hayvanların intestinal yapıları çıkarılırken karkasa ve etlere bulaşma olabilmektedir. Bu kontaminasyon oranının yüksek olması; ürünü parçalama ve hazırlama aşamasında çapraz kontaminasyonla veya yetersiz ısıtma işlemi ile doğrudan insan sağlığı için risk oluşturabilmektedir. Her ne kadar mikroorganizmanın belli bir sayıda enfeksiyona sebep olduğu bilinse de; risk gruplarında (immün zayıflığı olan bireyler, yaşlılar ve çocuklar) tehlikeli boyutlarla karşılaşmak mümkündür. Bununla birlikte 1 adet *Salmonella* hücresinin bile rahatsızlıklara sebep olabileceği bildirilmiştir (Çetin 2006).

Bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle, 35-37°C'de 24 saat inkubasyondan sonra oluşan zon çaplarının ölçülmesiyle antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik belirlenen *Salmonella* izolatlarının (44 adet) ertapenem (ETP), meropenem (MEM) antibiyotiklerine %100 (44/44), siprofloksasin antibiyotiğine %81 (36/44) oranında duyarlı; trimetoprim (W), tetrasiklin (TE), nalidiksik asit (NA), trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) antibiyotiklerine %93 oranında dirençli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *Salmonella* spp. izolatlarına ait antibiyotik zon çapları

İzolat		Antibiyotik ve zon çapları											
		MEM	ETP	CIP	K	S	W	TE	CN	AMP	NA	C	SXT
1	Salmonella spp.	29	30	13	15	9	24	0	9	0	0	25	25
2		30	30	17	0	9	0	0	16	18	0	20	0
3		31	26	19	0	9	0	0	13	19	0	24	0
4		28	27	19	15	13	0	0	17	20	0	22	20
5		29	30	19	13	12	23	0	15	21	0	25	20
6		28	30	30	19	9	0	0	16	20	22	21	0
7		27	30	27	0	9	0	0	16	21	0	20	0
8		30	29	19	0	9	0	0	19	20	0	19	0
9		32	28	20	0	8	0	0	19	20	0	20	0
10		30	30	20	18	12	0	20	18	0	0	20	0
11		31	30	20	14	9	0	0	19	0	0	0	0
12		30	29	20	16	10	0	0	19	20	0	0	0
13		30	29	26	16	13	0	0	18	0	0	18	0
14		31	28	12	18	12	0	0	19	0	0	0	0
15		32	27	20	17	9	0	0	18	12	0	0	0
16		27	28	20	16	9	22	21	16	16	0	26	0
17		26	30	22	17	9	28	20	15	20	0	21	0
18		28	27	20	0	8	0	0	17	0	24	25	0
19		27	29	20	0	8	0	0	17	20	0	24	0
20		28	31	19	0	9	0	0	18	20	0	21	0
21		29	31	18	16	10	0	0	19	17	0	20	0
22		29	30	18	16	10	0	0	14	16	0	18	0
23		28	28	19	16	11	0	0	15	20	0	18	0
24		30	28	21	16	12	0	0	17	19	0	18	0
25		31	29	22	15	12	0	0	18	18	0	21	0
26		31	27	20	15	8	0	0	18	17	0	20	0
27		32	27	27	17	7	0	0	18	20	0	24	0
28		30	26	20	17	7	0	0	17	16	0	21	0
29		29	29	19	15	13	0	0	16	12	0	25	0
30		28	30	18	16	9	0	0	19	19	0	12	0
31		27	28	17	18	12	0	0	18	18	0	16	0
32		27	29	20	14	12	0	0	18	20	0	26	0
33		29	27	22	15	9	0	0	16	21	0	19	0
34		29	30	20	19	11	0	0	17	20	0	18	0
35		29	30	22	18	7	0	0	18	19	0	20	0
36		27	31	21	18	8	0	0	14	21	0	20	0
37		31	30	19	15	11	0	0	18	19	0	21	0
38		31	30	18	15	10	0	0	16	20	0	18	0
39		30	27	17	0	10	0	0	16	18	0	17	0
40		30	29	18	0	12	0	0	15	18	0	20	0
41		30	28	19	16	12	0	0	17	19	0	25	0
42		29	29	20	16	8	0	0	18	20	0	26	0
43		27	29	21	17	8	0	0	17	16	0	0	0
44		28	30	19	16	9	0	0	16	12	0	21	0
Minumum		26	26	12	0	7	0	0	9	0	0	0	0
Maksimum		32	32	30	19	13	28	21	19	21	24	26	25
Ortalama		29	28	19	12	10	2,7	1,7	16	15	1,5	18	2

Boynukara ve Aydın (1990), tavuklarda tespit ettikleri ve doğruladıkları 33 adet *Salmonella* spp.'nin farklı antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençliliklerini araştırmış ve izolatların gentamisine %100, ampisiline %42, tetrasikline %39 ve streptomisine %30 oranında duyarlı; penisilin G ve eritromisine %100 dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Benzer sonuçların bizim araştırmamızda da ortaya koyulduğu görülmektedir.

Çalışmamıza benzer olarak birçok çalışmada, kümes hayvanlarından izole edilen *Salmonella* spp.'lerin tetrasiklin, nalidiksik asit ve ampisiline karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir (Chen *et al.* 2004; Yazıcıoğlu vd 2005; Zhao *et al.* 2007).

Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak Antunes *et al.* (2002), kümes hayvanlarından olan tavuk ve hindi karkaslarından izole ettikleri *Salmonella* spp.'lerin nalidiksik asit %50 (18/36), streptomisine %39 (14/36) ve tetrasikline %36 (13/36) dirençlilik; amoksisilin ve gentamisine ise tüm izolatların duyarlılık gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Özgan (2015) yaptığı çalışmada 160 tavuk örneğinden izole ettiği 94 *Salmonella* spp. izolatının antibiyotiklere dirençliliklerini araştırmış ve 79'unun (%84,1) ampisiline, 76'sının (%80,8) nalidiksik asite, 74'ünün (%78,7) tetrasikline, 39'unun (%41,5) streptomisine, 36'sının (%38,3) kloramfenikole, 18'inin (%19,1) kanamisine, 13'ünün (%13,8) siprofloksasine, 12'sinin (%12,7) trimetoprim/sülfometoksazole dirençli olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada tetrasiklin, nalidiksik asit dirençlikleri; streptomisin, siprofloksasin duyarlılığı benzerlik göstermektedir.

Ta *et al.* (2014) çiğ tavuk etlerinden izole ettikleri *Salmonella* spp. izolatlarının antibiyotik dirençliliklerini araştırmışlardır. Kullanılan antibiyotiklere karşı en çok direnç tetrasiklin (%59,1), ampisilin antibiyotiklerinde (%41,6) görülmüştür. Çalışmamızda da tetrasiklin ve ampisiline karşı direnç tespit edilmiştir.

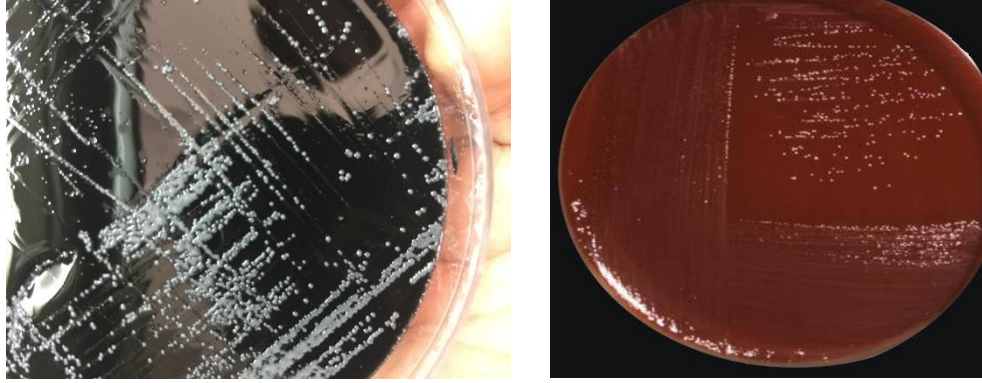
Çalışmada elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak ampisilin, nalidiksik asit ve tetrasiklin

antibiyotiklerine karşı *Salmonella* izolatlarının benzer seviyelerde direnç gösterdiği çalışmalar görülmektedir. Abd-Elghany *et al.* (2015) yaptıkları araştırmada materyal olarak kullandığı 200 tavuk örneğinden *Salmonella* spp. varlığını tespit etmeye çalışmıştır. 50 karkas örneğinden (%16), 50 tavuk budu örneğinden (%28), 50 karaciğer örneğinden (%32) ve 50 taşlık örneğinden %60 izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca izole edilen izolatların antibiyotik dirençlilik profilleri belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilik sonuçlarına bakıldığında eritromisine, penisiline ve amoksisiline %100, nalidiksik asite %98,8, sülfametoksazole %96,4, oksitetrasikline %95,2 ve ampisiline %91,6 dirençlilik tespit edilmiştir. Bu sebeple bu tarz antibiyotiklerin rast gele ve yüksek dozlarda kullanılmasının doğru olmayacağı sonucuna varılabilir.

Salmonella spp.'lerde meydana gelen antibiyotik dirençlilik insan ve hayvan sağlığı için bir problem olarak artış göstermektedir. Tavuk etlerinde tespit edilen *Salmonella* spp. izolatların antibiyotiğe dirençli olmasının ve bu direncin yaygınlaşmasının nedeninin; büyütme faktörü olarak yemlere antibiyotik ilavesi, hastalık tedavilerinde yüksek dozlarda ve rastgele kullanılması olabileceği ve bu nedenle antibiyotik tedavilerinden önce antibiyotik duyarlılık testi yapılarak uygun antibiyotiğin seçilmesinin ve seçilen antibiyotiğin uygun dozlarda kullanılması önerilmektedir (Hur *et al.* 2012).

4.2.4. Tavuk etlerinde *Campylobacter* spp. varlığı ve izolatların antibiyotik duyarlılıkları

Bu çalışmada incelemeye alınan 126 materyalden 32 adet (%25) *Campylobacter* spp. kültüre edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu belirleme termofilik türlere (*C. jejuni* ve *C. coli*) yönelik olduğu için geleneksel izolasyondan sonra kültürler *Campylobacter* spp. RT-PCR metoduyla doğrulanmıştır. Bu izolatlar mCCDA ve Skirrow besi yerlerinde spesifik olarak görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. mCCDA ve Skirrow besiyerlerinde *Campylobacter* spp. kolonileri

Campylobacter spp. insanlarda ishal vakalarının önemli sebeplerindendir ve dünya genelinde izolasyon oranı değişebilmektedir. Kontamine olmuş tavuk etlerinde; patojen bakteriler arasında insanlarda diyareye sebep olan *Campylobacter* spp. diğer etkenlerden daha yüksek sıklıkla tespit edilmektedir. Bu patojenlerin kümes hayvanlarının bağırsaklarına adaptasyonu daha iyi olduğundan izolasyon oranının yüksek olması buna bağlanmaktadır.

Çalışmamızda %25 oranında *Campylobacter* spp. tespiti yapılmıştır. Yıldız ve Diker (1992) tavuk karkaslarına ait göğüs, boyun, kanat ve butlarından *Campylobacter* spp. izolasyonu için yaptıkları çalışmada %90 üzerinde bir izolasyon oranı belirtmişlerdir. Materyallerde izolasyon oranının birbirine yakın olduğu vurgulanmıştır. Dizgah (1995) satışa sunulan 50 adet tüm tavuk etlerinin 48'inde termofilik *Campylobacter* spp. kültüre ettiklerini rapor etmişlerdir. Benzer olarak Akan vd (2000), etlik piliçlerde *C. jejuni* varlığını yüksek seviyede (%90-100) olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarına bakıldığında çok yüksek bir oran görülmektedir. Kontamine olmuş tavuk karkasının parçalanmasıyla etkenin bütün parçalara yayılabildiği sonucu çıkarılmaktadır. Özellikle tavuk karkaslarının parçalanması ve işlenmesi sırasında kontaminasyon artmakta ve çapraz kontaminasyon da olabilmektedir.

Yıldırım (1995) paketlenmek üzere hazırlanan kuru yolum karkaslarda %84, ıslak yolum karkaslarda ise %100 seviyesinde *C. jejuni* tespit etmişlerdir. Bu çalışmada

suyun patojenin yayılmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca; bütün tavuk karkaslarında aynı suyun tekrar tekrar kullanılması kontaminasyonu kaçınılmaz kılmaktadır.

Başka bir çalışmada Özer vd (1999) İstanbul'da perakende olarak satılan çiğ ve ısıtılmış işlem görmüş 250 adet tavuk materyalini *C. jejuni* açısından incelemiş ve 50 adet çiğ tavuk karkasında %96 (48/50), işlenmiş 40 adet çiğ örnekte %65 (26/40) ve 60 adet tavuk dönerde %5 (3/60) oranında izolasyon gerçekleştirmişlerdir. Aydın vd (2007) 300 adet tavuk karkasından %56 (168/300) oranında bir izolasyon yaptıklarını bildirmişlerdir. Günşen (2004) Bursa il merkezi'nde satışa sunulan tavuk eti ve ürünlerinde termotolerant *Campylobacter* türlerinin varlığını araştırdığı çalışmasında toplam 450 adet tavuk eti ve ürününe ait örneğin 188 (%41.78)'i termotolerant *Campylobacter* türleri yönünden pozitif olarak belirlendiğini rapor etmiştir. Sonuç olarak, Bursa piyasasını temsilen çeşitli kasap ve süpermarketlerden alınan tavuk eti ve ürünlerinin termotolerant *Campylobacter* türleri ile önemli derecede kontamine olduklarını ve halk sağlığı açısından risk oluşturdukları kanısına varıldığı vurgulanmıştır. Elde ettiğimiz veriler genel olarak bu tarz çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. *Campylobacter* spp. izolasyon oranlarının farklılığı mevsimsel değişebildiği gibi kesim yöntemi, örnek alma, depolama koşulları ve izolasyon tekniğinin başarımına bağlı olduğu görülmektedir. Bu tür patojenlerin zorlu çevre koşullarında VBNC forma dönüştüğü düşünüldüğünde bu durumun daha önemli olduğu anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada *Campylobacter* spp. izolatlarında %50 (16/32) oranında nalidiksik aside, %40 (13/32) oranında siprofloksasin ve tetrasikline, %25 (8/32) oranında trimetoprim karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). İzolatlar Meropenem ve ertapenem antibiyotiklerine karşı en yüksek seviyede duyarlılık göstermişlerdir.

Çizelge 4.8. *Campylobacter* spp. izolatlarına ait antibiyotik zon çapları

İzolat	Antibiyotik ve zon çapları											
	MEM	ETP	CIP	K	S	W	TE	CN	AMP	NA	C	SXT
1	28	31	24	23	19	18	20	24	24	9	20	24
2	30	25	12	24	22	19	19	24	23	7	21	27
3	24	24	24	24	25	20	21	25	22	8	19	22
4	27	26	25	20	24	15	26	28	22	7	17	28
5	22	30	22	20	20	19	21	24	20	8	20	26
6	28	24	23	21	21	21	20	24	26	10	23	20
7	26	28	27	19	19	21	14	25	27	11	20	23
8	30	27	23	17	23	17	12	23	19	11	23	26
9	24	26	13	20	24	19	19	27	22	10	26	22
10	26	27	12	23	23	20	13	26	21	9	22	25
11	28	30	10	26	22	10	22	25	23	18	25	24
12	23	30	24	22	22	12	11	26	21	9	24	22
13	29	31	22	25	20	21	9	19	19	10	22	20
14	27	24	26	24	23	23	24	20	24	15	20	19
15	31	27	13	22	20	11	11	24	24	18	24	17
16	30	28	24	20	19	19	28	26	20	20	24	20
17	28	27	10	20	20	10	29	27	20	21	25	23
18	26	30	25	21	24	20	22	19	21	15	23	20
19	24	27	23	19	26	22	24	22	19	7	27	20
20	26	29	22	22	27	24	14	21	17	17	22	21
21	29	30	11	24	19	22	26	23	22	7	20	19
22	25	24	10	24	22	20	12	21	21	20	23	22
23	27	22	23	25	21	11	27	19	23	8	26	24
24	27	24	27	28	23	14	23	24	21	21	22	24
25	28	27	14	24	21	13	11	24	19	19	25	25
26	24	29	21	24	19	22	24	21	24	18	24	28
27	26	30	11	25	24	24	25	25	22	9	22	20
28	30	31	23	23	24	24	24	22	24	17	20	20
29	32	25	10	27	21	23	9	24	22	19	24	21
30	31	30	22	26	25	26	26	27	26	18	24	19
31	28	24	12	25	21	22	8	29	23	20	25	22
32	29	27	9	26	19	20	10	22	19	21	23	24
Minumum	22	22	9	17	19	10	8	19	17	7	17	17
Maksimum	32	31	27	28	27	26	29	29	27	21	27	28
Ortalama	27	27	18	23	22	18	19	24	22	14	22	22

Antibiyotik maddeler oldukça yaygın bir şekilde kümes hayvanları işletmelerinde kullanılmaktadır. Dünya genelinde antibiyotikler zootekni alanında tedavi amaçlı olmaktan çok hayvan beslemede büyümeyi artırıcı faktör olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda kullanılan antibiyotik ajanlara

karşı bakteriler dirençlilik kazanmaktadır. Bu sebeple çoğu işletmede kullanıma sınırlandırma getirilmekte veya yasaklanmaktadır. Buna rağmen antibiyotiklerin yemlere eklenmesi devam etmektedir (Taylor and Tracz 2005; Aarestrup *et al.* 2008; Bester and Essack 2008; Iovine 2013).

Bu alanda yapılan bir çalışmada kanatlılardan izole edilen *C. jejuni*'lerin tamamında tetrasiklin direncinin bulunduğu bildirilmiştir. 1980'li yıllardan itibaren bu antibiyotiğin sıklıkla kullanılmasıyla dirençliliğin arttığı gözlemlenmiştir (Lee *et al.* 1995).

Çakmak (2009), hindi karkaslarına ait etlerden (but, göğüs ve kuşbaşı) izole edilen *C. jejuni* izolatlarının 19'unun (%17) siprofloksasine, 10'unun (%9) nalidiksik aside dirençli olduğunu rapor etmiştir. Abay *et al.* (2014), insan ve kanatlılardan izole edilen *C. jejuni* izolatlarının nalidiksik asit, siprofloksasin antibiyotiklerine dirençlerini sırasıyla %84-95, %81-93 ve %85-88 oranlarında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda 126 örneğin 32'sinde tespit edilen izolatlardan %50 (16/32) oranında nalidiksik aside, %40 (13/32) oranında siprofloksasin ve tetrasikline, %25 (8/32) oranında trimetorfime karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Benzer dirençlilik tespitleri Han *et al.* (2009) tarafından da belirtilmiştir. Han *et al.* (2009) Lozan perakende piyasasında satışa sunulan tavuklarda *Campylobacter* spp.'nin prevelansı ve antimikrobiyal direnci üzerine yaptıkları çalışmada 194 örneğin 165'inde *Campylobacter* spp. izole etmişlerdir. *C. jejuni*'nin baskın tür olarak belirlendiği (%66.7) ve izolatların tetrasiklin (%31.5) ve siprofloksasin (%6.1) antibiyotiklerine karşı direncin en yoğun olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda *Campylobacter* spp. izolatlarında çoklu antibiyotik direnç görülmüştür. Ma *et al.* (2017) Çin'in merkez şehirlerinden biri olan Tianjin piyasasında perakende satılan 227 adet tavuk etini (kanat, göğüs, baget) *Campylobacter* spp. kontaminasyonu açısından analize almıştır. Analizler sonucunda 42 örnekte pozitif sonuç elde etmiş ve pozitif örneklerin 31'inde *C. jejuni* olduğu belirlenmiştir. Bütün izolatların siprofloksasin ve nalidiksik asit antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu ve bunu takiben

tetrasiklin, gentamisin, kloromfenikol gibi antibiyotiklere karşı da farklı oranda direnç gösterdiği belirtilmiştir. Dikkate değer bir şekilde izolatların yarısında çoklu antibiyotik direnç olduğu da vurgulanmıştır.

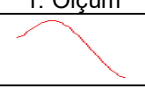
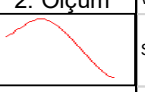
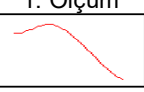
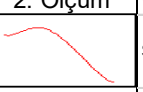
Büyükunal (2017) İstanbul'da satışa sunulan piliç etlerinde termotolerant *Campylobacter* spp. prevalansı ve antibiyotik dirençliliğini araştırdığı çalışmasında toplamda 176 örnek incelemeye alınmıştır. Çalışmada *C. coli*, *C. jejuni* ve *C. lari* prevalansları sırasıyla %15,34, %8,52 ve %1,7 olarak tespit edilmiştir. İzolatların çoğunluğu nalidiksik asit (%78,57), ofloksasin (%14,29), norfloksasin (%10,71) ve ampisiline (%10,71) dirençli bulunmuşlardır. En yüksek direnç oranı ise nalidiksik asite %90,91 karşı gösterildiği vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da izolatların %50'sinin nalidiksik asite karşı dirençlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan genel olarak nalidiksik asitin inhibisyon üzerine etkili olmadığı kanaatine varılmaktadır.

Genel olarak siprofloksasin, trimetorfilm, nalidiksik asit gibi antibiyotiklere karşı direnç görüldüğü birçok çalışmada belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bundan dolayı bu tip antibiyotiklerin kullanımının yasaklanması veya sınırlandırılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

4.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Bulguları

4.3.1. DNA ekstraksiyonu ve saflığın belirlenmesi

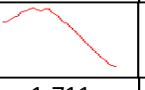
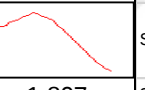
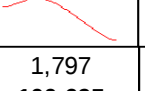
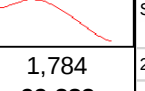
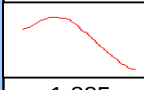
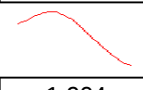
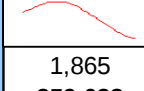
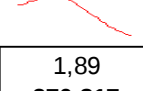
Saf kültürlerden alkali ortamda kaynatma metoduyla DNA ekstraksiyonu yapılmış ve saflık oranları tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Saflık ölçüm spektrum değerlerinin standarda yakın çıkması (Şekil 4.9) bu yöntemin kültürlerden genomik ekstraksiyon saflığında yüksek derecede etkili olabileceğini göstermiştir. Sonuçların yüksek hassasiyette çıkması protein gibi safsızlıkların düşük seviyede olduğunu göstermektedir. Bu safsızlıkların düşük seviyede olması; PCR ve LAMP reaksiyonlarında inhibisyon riskinin elemine edilmesi açısından önemlidir.

A	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
			Spectrum
	1,808 843,647	1,814 862,162	260/280 ng/µL
B	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
			Spectrum
	1,776 158,603	1,744 158,763	260/280 ng/µL

Şekil 4.6. Saf kültürlerden izole edilen DNA'lara ait spektrumlar ve saflık değerleri

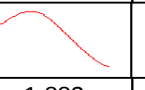
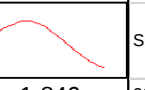
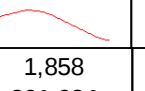
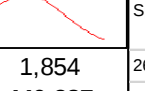
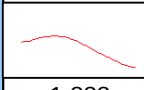
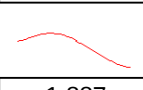
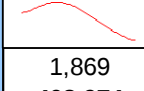
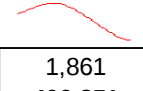
^A *Salmonella* Typhimurium (RSHMB 95091), ^B *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560)

İzole edilen *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. kültürlerinden ve materyallerden 3 aşamalı santrifüj yöntemiyle ekstrakte edilen nükleik asit saflıkları saf kültürlerden elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

S İzolat 1	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL1 	SPL3 	Spectrum
	1,711 138,484	1,807 140,257	260/280 ng/µL
S İzolat 2	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL2 	SPL4 	Spectrum
	1,797 100,695	1,784 99,283	260/280 ng/µL
SM İzolat 1	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL1 	SPL3 	Spectrum
	1,885 361,605	1,904 375,887	260/280 ng/µL
SM İzolat 2	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL2 	SPL4 	Spectrum
	1,865 259,028	1,89 270,817	260/280 ng/µL

Şekil 4.7. Bazı *Salmonella* spp. izolatlarına ve materyalden direkt ekstraksiyona ait DNA saflıkları

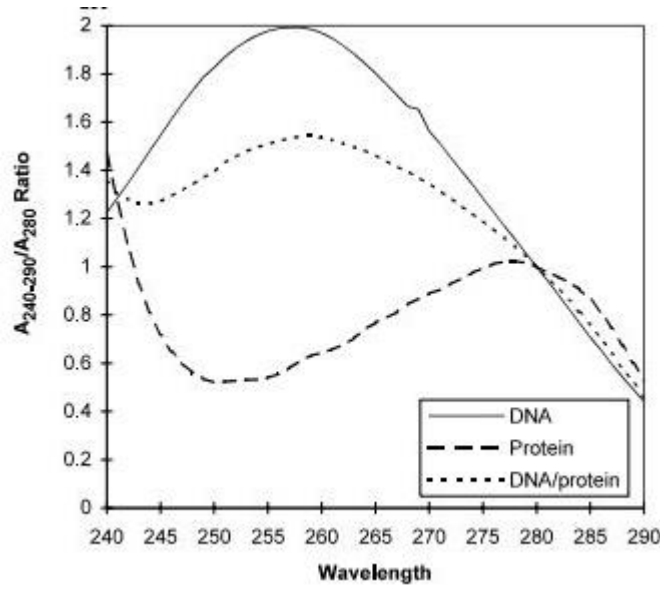
^S*Salmonella* spp. izolatları, SMMateryalden direkt DNA ekstraksiyonu

C İzolat 1	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL1 	SPL6 	Spectrum
	1,883 576,033	1,846 468,255	260/280 ng/µL
C İzolat 2	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL2 	SPL7 	Spectrum
	1,858 301,624	1,854 440,387	260/280 ng/µL
CM İzolat 1	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL3 	SPL8 	Spectrum
	1,888 327,537	1,887 372,647	260/280 ng/µL
CM İzolat 2	1. Ölçüm	2. Ölçüm	Well ID
	SPL4 	SPL9 	Spectrum
	1,869 408,974	1,861 406,851	260/280 ng/µL

Şekil 4.8. Bazı *Campylobacter* spp. izolatlarına ve materyalden direkt ekstraksiyona ait DNA saflıkları

^C*Campylobacter* spp. izolatları, ^{CM}Materyalden direkt DNA ekstraksiyonu

Nükleik asit örneklerinin hızlı bir şekilde saflığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan en temel yöntemlerden birisi örneklerin 260 nm ve 280 nm spektrofotometrik absorbans ölçümlerinin oranıdır.



Şekil 4.9. DNA, protein ve DNA/protein karışımlarına ait standart spektrumlar (BioTek 2017)

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi absorbans oranının 1.8-2.0 seviyelerinde görülmesi DNA saflığının yüksek seviyede olduğunu göstergesidir.

Bakteri hücrelerinden yüksek saflıkta DNA elde etmek; nükleik asit amplifikasyonları için büyük bir öneme sahiptir. Amplifikasyon inhibitörlerinden arındırılmış DNA örnekleri PCR ve LAMP protokollerinin doğru sonuç vermesini sağlamaktadır (Van Tongeren *et al.* 2011; Yamazaki 2013). Çalışmamızda 1,7-1,8 aralığında absorbans ölçüm oranları hem PCR hem de LAMP için yüksek saflıkta DNA elde edildiğini göstermektedir.

LAMP ve qPCR metodlarının başarısında kullanılan DNA ekstraksiyon yöntemi, dolayısı ile DNA saflığı özel öneme sahiptir. Distile saf su kullanarak kaynatma metoduyla DNA izolasyonu sonucunda amplifikasyon işlemlerinde yanlış negatif

sonuçlara rastlanabilmektedir. Bu sebeple NaOH-ısı muamalesi potansiyel olarak hücreleri lize etmekte, birden çok inhibitörü inaktif hale getirebilmektedir. Çalışmada kullandığımız alkali ortamda termal lizasyon yöntemi yüksek verimlilikte sonuçlar vermiştir. Özellikle ön zenginleştirme brotlarında çoğalan hedef bakterilerden DNA izolasyonunda 3 aşamalı santrifüj yöntemi brotdan ve tavuk etlerinden gelen inhibitörlerin elemine edilmesinde etkili olduğu görülmüştür.

4.3.2. LAMP ile *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. identifikasyon ve belirlenme sonuçları

Geleneksel yöntemlerle izole edilen a) 44 adet *Salmonella* spp. ve 32 adet *Campylobacter* spp. izolatu için doğrulama (identification) işlemleri, b) materyallerin ön zenginleştirme brotunda çoğalan hedef patojenlerden DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra belirleme (detection) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Toplamda 126 adet örneğe ait ön zenginleştirme kültürlerinden elde edilen sonuçların hem LAMP yöntemi hem de klasik kültürel yöntemle aynı olduğu görülmüştür. Yani klasik kültürel yöntemin hedefi belirlediği örnekte, LAMP uygulaması da pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.9).

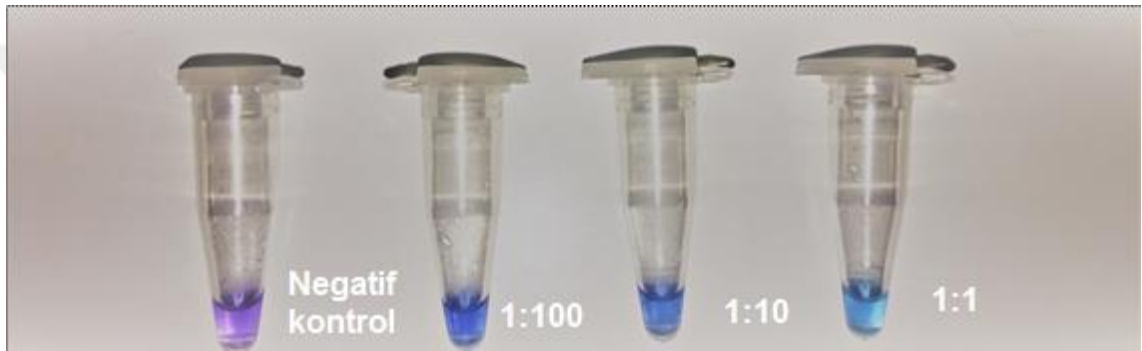
Çizelge 4.9. LAMP, qPCR ve klasik kültürel metot ile örneklerde hedef patojenlerin dağılımı

Örnek		GÖĞÜS ETİ						BAGET						KANAT					
YÖNTEM		KLASİK		qPCR		LAMP		KLASİK		LAMP		qPCR		KLASİK		qPCR		LAMP	
		S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
1	PARTİ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2		+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
4		-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5		-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6		-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
7		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
8		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
10		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
11		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
12		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	PARTİ 2	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
16		-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
17		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
20		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
21		-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22		+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
23		-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
25		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
26		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
27		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	PARTİ 3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
30		+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32		-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
33		+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
34		+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
35		+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36		-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37		-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
38		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
39		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41		-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
42		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

S: *Salmonella* spp., C: *Campylobacter* spp., +: Var (pozitif), -: Yok (negatif)

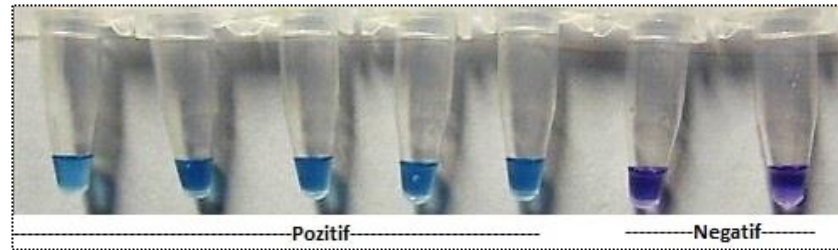
Çizelge 4.9’da görüldüğü üzere araştırmada uygunlukları araştırılan her üç metodunda (klasik, LAMP ve qPCR) birbiri ile mutlak uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.

LAMP sonuçları HNB boyası kullanılarak çıplak gözle yorumlanmıştır. Şekil 4.10’da 1. tüp reaksiyon karışımına DNA örneği ilave edilmemiş ve bu şekilde negatif kontrol elde edilmiştir. Diğer 3 tüpte ise sırasıyla farklı konsantrasyonlarda (1:100; 1:10; 1:1) DNA örneği ilavesiyle amplifikasyon sonuçları görülmektedir.



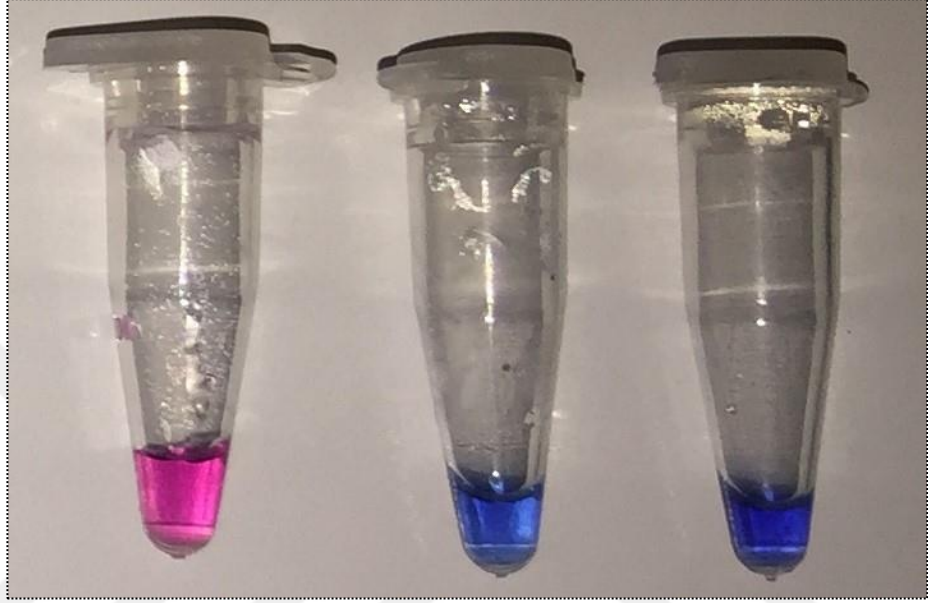
Şekil 4.10. *Salmonella Typhimurium* (RSHMB 95091) kültürünün LAMP ile doğrulanması

LAMP sonuçlarının gözlemlenmesi için HNB boyası indikatör olarak reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. HNB boyası mor-menekşe bir renge sahiptir. LAMP reaksiyon ortamında amplifikasyonun gerçekleşmesiyle birlikte bu renk gök mavisine dönmektedir. Bu şekilde hedef patojene ait DNA sekanslarının çoğaltıldığı anlaşılmakta ve reaksiyon pozitif olarak yorumlanmaktadır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.11. HNB kullanarak LAMP reaksiyon sonucunun belirlenmesinde kullanılan renk skalası (Mohon *et al.* 2014)

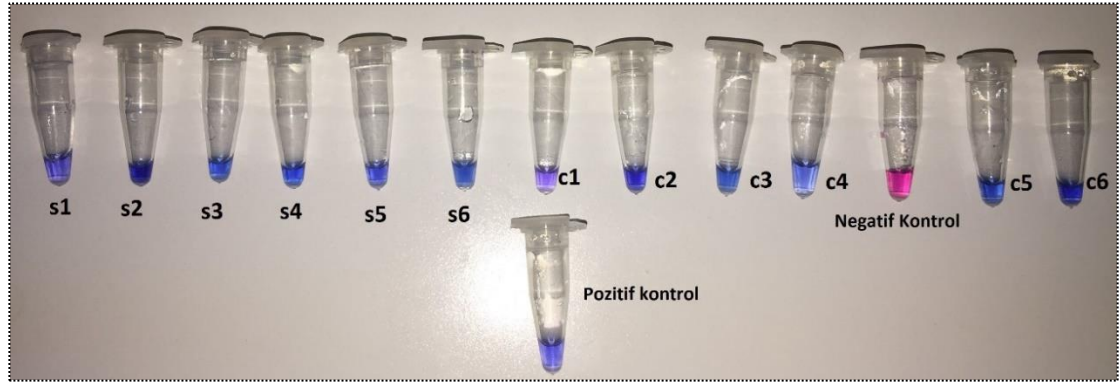
HNB ile LAMP sonuçlarının yorumlanması için öncelikle bilinen kültürler ile deneme çalışmaları yürütülmüştür. Şekil 4.12’de ise *C. jejuni* ve *C. coli* kültürlerine ait LAMP sonuçları görsel olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560) ve *Campylobacter coli* (ATCC 33559) için LAMP amplifikasyon sonuçları

Şekil 4.12’de soldan 1. Tüp negatif kontrol (mor menekşe), 2. tüp *Campylobacter jejuni* (mavi), 3. tüp *Campylobacter coli* (mavi) örneklerine aittir.

Şekil 4.13’de ise izole edilen bazı *Salmonella* ve *Campylobacter* kültürlerine ait amplifikasyon sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.13. Materyallerden izole edilen bazı *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. kültürlerine ait LAMP sonuçları

^s*Salmonella* spp., ^c*Campylobacter* spp.

Yaptığımız çalışmada 65°C sıcaklık 40 dakika süre kombinasyonu uygulanmıştır. LAMP sıcaklık değerleri açısından çalışmamıza benzer olarak Pavan Kumar *et al.* (2014) optimum 64°C’de sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Bu değer, enzimin (*Bst* 3.0 DNA Polymerase; BioLabs) temin edildiği üretici firma tarafından optimum 65°C olarak belirlenmiştir. Hara-Kudo *et al.* (2005), *Salmonella*’nın LAMP ile belirlenmesi için yayınladıkları protokolde 65°C izotermal koşullar oluşturmuşlardır. Çoğu araştırmacı tarafından optimal sıcaklık genel olarak 60-65°C aralığında uygulanmıştır (Varga and James 2006; Li *et al.* 2009; Chen and Ge 2010). Bu optimal değer hem kullanılan enzime hem de hedeflenen sekansa bağlıdır.

LAMP ile yapılan ilk çalışmalarda amplifikasyon süresi 1 saat olarak kabul edilmiştir. Bu süre içerisinde biriken amplikonlar %2-3 agaroz jel ortamında görüntülenebilmektedir. Bizim çalışmamızda agaroz jelde görüntülemeyi farklı olarak LAMP ürünleri veya sonuç dolaylı HNB’nin renk değişimiyle görsel olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada negatif ve pozitif sonuçların ayrımında HNB boyasının reaksiyon hacminde konsantrasyonu 150 µM olarak optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu konsantrasyon çıplak gözle sonucun görülmesi ve absorbans ölçümleri için uygun olarak görülmüştür. Mohon *et al.* (2014) geliştirdikleri LAMP protokolünde 120 µM Hydroxynaphthol Blue (HNB) boyası kullanıldığını bildirmişlerdir. Çalışmamıza benzer

olarak Ghosh *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada 150 µM konsantrasyonun pozitif ve negatif amplifikasyonların ayırımında uygun olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda ve bu çalışmalarda HNB boyası ile hazırlanan LAMP protokolünün amplifikasyonun yorumlanmasında basit ve maliyeti düşük, sağlıklı bir metot olarak kabul edildiği görülmektedir.

LAMP için primer dizaynında temelde ikişer dış ve iç primer seçilmektedir. Fakat; bir çift Loop primerin ilavesiyle ampikonlar daha kısa süre içerisinde üretilmektedir. Yürüttüğümüz çalışmada; *Salmonella*'nın LAMP ile spesifik olarak belirlenmesinde *Salmonella invA* gen sekansı kullanılarak 6 adet primer (F3, B3, FIP, BIP, Loop-F, Loop-B) oluşturulmuştur. *Salmonella* için moleküler yöntemlerde *invA* geninin hedef alınarak primer oluşturulması literatürde sıklıkla görülmüştür. Ayrıca; oluşturulan primerler daha önceki çalışmalarda da araştırmacılar tarafından dizayn edilmiş ve kullanılmıştır (Rahn *et al.* 1992; Cheng 2005; Cheng *et al.* 2008).

Çalışmamızda LAMP yöntemi için kullandığımız primerler spesifiklik yönünden hatalı sonuçlara sebep olmamıştır. *Salmonella invA* genine göre dizayn edilen primerlerin bazı LAMP çalışmalarında yüksek spesifikliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Hara-Kudo *et al.* 2005; Yamazaki *et al.* 2008a; Yamazaki *et al.* 2008b; Okamura *et al.* 2009; Yamazaki *et al.* 2009; Li *et al.* 2009).

Yamazaki *et al.* (2009) tavuk etlerinde LAMP ile *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* tespiti için yaptıkları çalışmada, klasik kültürel yöntem ve LAMP sonuçları açısından istatistiki bir fark göremediklerini, her iki yöntemin hassasiyet ve spesifikliğinin benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamıza materyal ve metot olarak benzerlik gösteren araştırmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar tarafından klasik kültürel yöntemin zaman alıcı olduğu ve LAMP yönteminin bu sebeple hızlı bir yöntem olabileceği vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda klasik kültürel yöntemle teşhis için en az 96 saate (4 gün) ihtiyaç varken, LAMP ile 25-26 saatlik (1 gün) bir süreç ile teşhis sonucu elde edilmiştir. Bu yönüyle LAMP yönteminin en az klasik kültürel yöntem kadar güvenli ve sonucun kısa sürede elde edilmesiyle daha hızlı

olduğu görülmektedir. Benzer sonuç ve çıkarımlar Pavan Kumar *et al.* (2014) tarafından da belirtilmiştir.

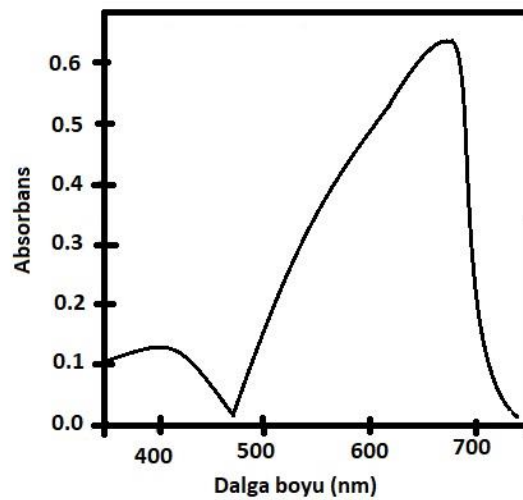
Ülkemizde LAMP yönteminin uygulandığı araştırma sayısı sınırlıdır. Bu alanda 6 adet lisans üstü tez, 1 adet derleme (parazitoloji, 2 araştırma makalesi (parazitoloji), 1 adet kongre bildirisi (klinik alanda) tespit edilebilmiştir. *Salmonella* ve *Campylobacter*'in tavuk etlerinden tespitiyle ilgili bu yöntemin uygulandığı herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Kadiroğlu (2013) Türk beyaz peynirlerinden *S. aureus* tespiti için LAMP yöntemini kullandıkları çalışmada, etkinlik değerinin düşük bulunduğunu ve sonuçlar arasında tutarsızlık gözlemlendiğini bildirmiştir. Farklı bir bakteri ile çalışılmış olsa da yöntemine ait optimizasyon çalışmalarının yapılmaması, uygun primerlerin dizayn ve seçiminde hataların olması etkinliğin düşük olmasına sebep olabilmektedir. Bizim çalışmamızda kullanılan primerlerin daha önceki çalışmalarda yüksek hassasiyette sonuçlar verdiği vurgulanmıştır. Bu sebeple geçerliliği kabul edilmiş primerlerin kullanılması önem arz etmektedir.

Demirel (2014) *Toxoplasma gondii*'nin sulardan tespitinde LAMP ve PCR metodlarını kullandıkları çalışmada, her iki metodun güvenilir ve hassas sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Özellikle çevresel kaynaklı örneklerde çok fazla miktarda PCR işlemini inhibe edecek ajanların bulunduğu vurgulanmıştır. Fakat LAMP metodunun inhibisyon faktörlerinden fazla etkilenmediği bu sebeple PCR yerine kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu çıkarıma benzer olarak bizim çalışmamızda kullandığımız tavuk etlerinden hem PCR hem de LAMP için birçok inhibisyon ajanı olabilmektedir. Sonuçların güvenilir ve daha hassas olmasında inhibisyon faktörlerinin ortadan kaldırılması önem arz etmektedir. Bunun için çalışmamızda NaOH ortamında kaynatma ve 3 adımda santrifüj uygulaması uygun olarak görülmüştür. Böylelikle yüksek maliyetli ticari ekstraksiyon kitlerine gerek olmadan *Salmonella* ve *Campylobacter* için yüksek saflıkta DNA elde edilebileceği çalışmamızda gösterilmiştir.

Bilgiç vd (2017) *Theileria annulata* DNA'sının LAMP ile çoğaltılmasını gerçekleştirdikleri çalışmada hedefe özgü primerlerin dizayn ve seçiminin doğru

yapılması gerektiğine, reaksiyon optimizasyonunun önemli olduğuna değinmişlerdir. LAMP tekniğinin saha şartlarında kullanılabilecek yüksek özgüllükte bir test olduğu bildirilmekle birlikte, geliştirilmeye ve standart hale getirilmeye çalışılan bir metot olduğundan dolayı saha şartlarında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu da vurgulanmıştır. Farklı bir alanda yöntem uygulanmış olsa da ülkemizde zamanla LAMP çalışmalarının sayısı artmaktadır. Günümüzde daha çok parazitoloji alanında çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Çalışmamızda *Salmonella* ve *Campylobacter* tespiti için uyguladığımız LAMP protokolünde kullanılan primerler ve optimizasyon koşulları, ileride yapılacak çalışmalara örnek teşkil edebilecektir.

96'lık platelerde LAMP sonucunun absorbansa bağlı olarak belirlenmesi için yaptığımız ölçümlerde HNB'nin mor menekşe renginden gök mavisi rengine dönüşümünde absorbans değeri 650 nm dalga boyunda pik yapmıştır (Şekil 4.14). Metod kısmında verilen “3.3.2.c. LAMP reaksiyonu” başlığında anlatıldığı üzere Epoch spectrophotometer cihazı 750 nm dalga boyunda saf su ile sıfırlandıktan sonra 350-750 nm arasında 1 nm aralıkla ölçümler gerçekleştirerek maksimum absorbsiyonun olduğu dalga boyunu belirleyebilmektedir. Çalışmada HNB etkisiyle gerçekleşen renk değişimi absorbans ölçümleriyle değerlendirilmiş maksimum absorbsiyonun olduğu dalga boyu Şekil 4.14'te de görüldüğü üzere 650 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. LAMP reaksiyon ortamında HNB varlığının farklı dalga boylarında absorbans değişimi

Plate okuyucuda 630-670 nm dalga boyları arasındaki ölçümlerin sağlıklı olduğu fakat; 650 nm dalga boyunda ölçümün daha tutarlı ve optimum sonuç verdiği görülmüştür. HNB'deki renk değişiminin insan gözüne bağlı olmaksızın enstrümental olarak değerlendirilmesinin daha uygun olacağı düşünüldüğünde bu ölçüm değerinin plate okuyucu cihazlarda kullanılması önerilebilir. HNB konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans değerlerinin değişebileceği göz önüne alınırsa farklı çalışmalarda muhakkak farklı dalga boylarında ölçüm yapılması ve pikin tespit edilmesi önem arz etmektedir. Bununla birlikte Goto *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada 3-3.5 absorbans ve 630-670 nm dalga boylarında uyumlu bir korelasyon elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 650 nm dalga boyunda absorbans ölçümlerinin optimum pik verdiğini vurgulamışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmayla uyum göstermektedir.

LAMP reaksiyon karışımının kuyucuklarda inkübasyon öncesi ve sonrası absorbans değerleri Çizelge 4.10'da görüldüğü gibidir.

Çizelge 4.10. Materyallerden elde edilen bazı *Salmonella* spp. izolatlarının doğrulanmasında LAMP sonuçlarının absorbans değerleri

	İnkübasyon öncesi											
	N	P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
İÖ1	0,346	0,344	0,32	0,321	0,349	0,348	0,352	0,329	0,336	0,309	0,321	0,337
İÖ2	0,396	0,344	0,348	0,315	0,348	0,348	0,352	0,352	0,323	0,324	0,309	0,318
	İnkübasyon Sonrası											
İS1	0,369	1,051	0,854	0,756	0,888	0,898	0,88	0,775	0,637	0,73	0,772	0,841
İS2	0,402	0,976	0,842	0,751	0,882	0,882	0,875	0,774	0,699	0,714	0,764	0,837

N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, İÖ1 ve İÖ2: İnkübasyon öncesi reaksiyon ortam absorbans değerleri (paralel ölçüm), İS1 ve İS2: İnkübasyon sonrası reaksiyon ortam absorbans değerleri (paralel ölçüm), 1-10: *Salmonella* spp. izolatları

Çizelge 4.10'da görüldüğü üzere inkübasyon öncesi negatif kontrol için absorbans değerleri, inkübasyon sonrası absorbans değerlerine göre fazla değişiklik göstermemiştir. Pozitif kontrol ve diğer *Salmonella* spp. izolatlarından elde edilen DNA'lar ile hazırlanan reaksiyon ortamlarında, inkübasyon sonrası pozitif olarak kabul edilen absorbans değerleri ölçülmüştür. Görüldüğü üzere 650 nm'de pozitif ve 1-10 ile

kodlanan diğer *Salmonella* izolatlarının absorbands değerleri inkübasyon sonrası belirgin bir şekilde artış göstermiştir.

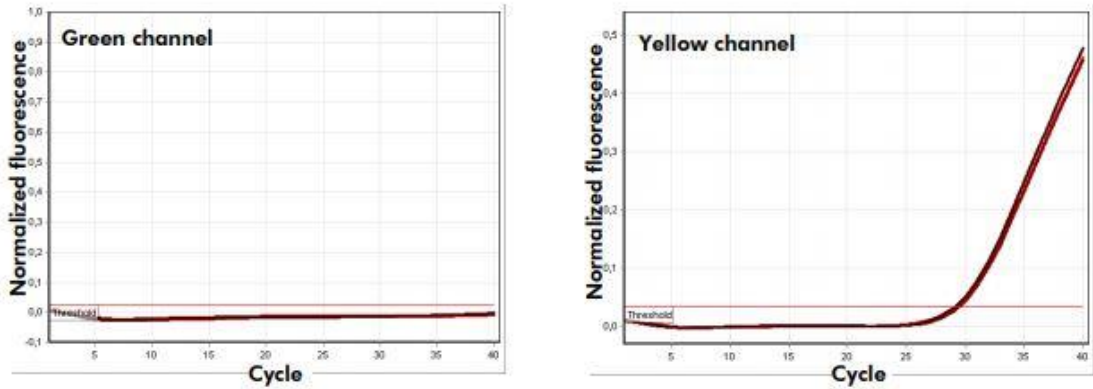
4.3.3. Real-time PCR sonuçları ve yöntemlere göre pozitif örnek dağılımı

Real-time PCR sonuçlarının yorumlanması ve değerlendirilmesi kit üreticisi (Qiagen) firmanın sunmuş olduğu prosedür göz önüne alınarak yapılmıştır. Hedef patojene ait DNA'nın varlığı veya yokluğu; kullanılan real-time PCR cihazına özgü olan yazılım tarafından sağlanan verilerle belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Real-time PCR için muhtemel sonuçlar

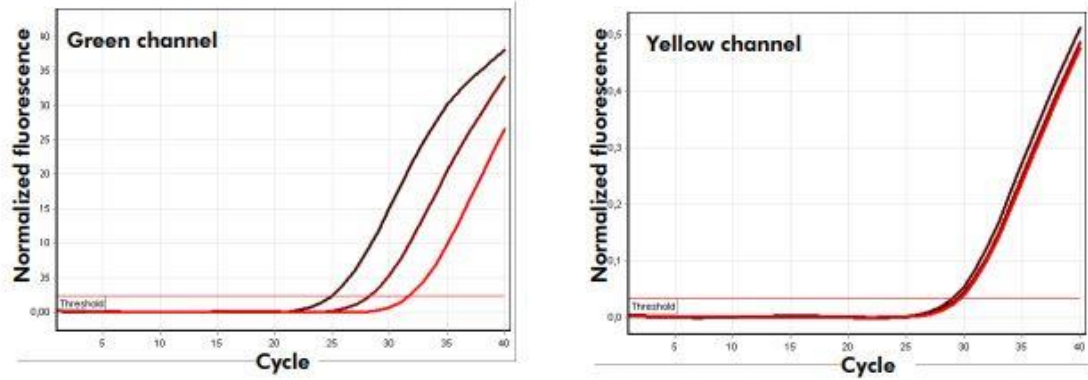
IC (internal control) için amplifikasyon	Örnek için amplifikasyon	Sonuç
+	+	Var (+)
+	-	Yok (-)
-	-	PCR hatası

Yellow channel (internal control) için amplifikasyon eğrilerinin oluşumu PCR protokolümüzün çalıştığının göstergesidir. Green channel için eğrilerin görülmemesinden sonucun negatif olduğu anlaşılmaktadır. Yani; test edilen gıda örneğinde hedef patojenin yokluğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Örnek için negatif qPCR sonucu

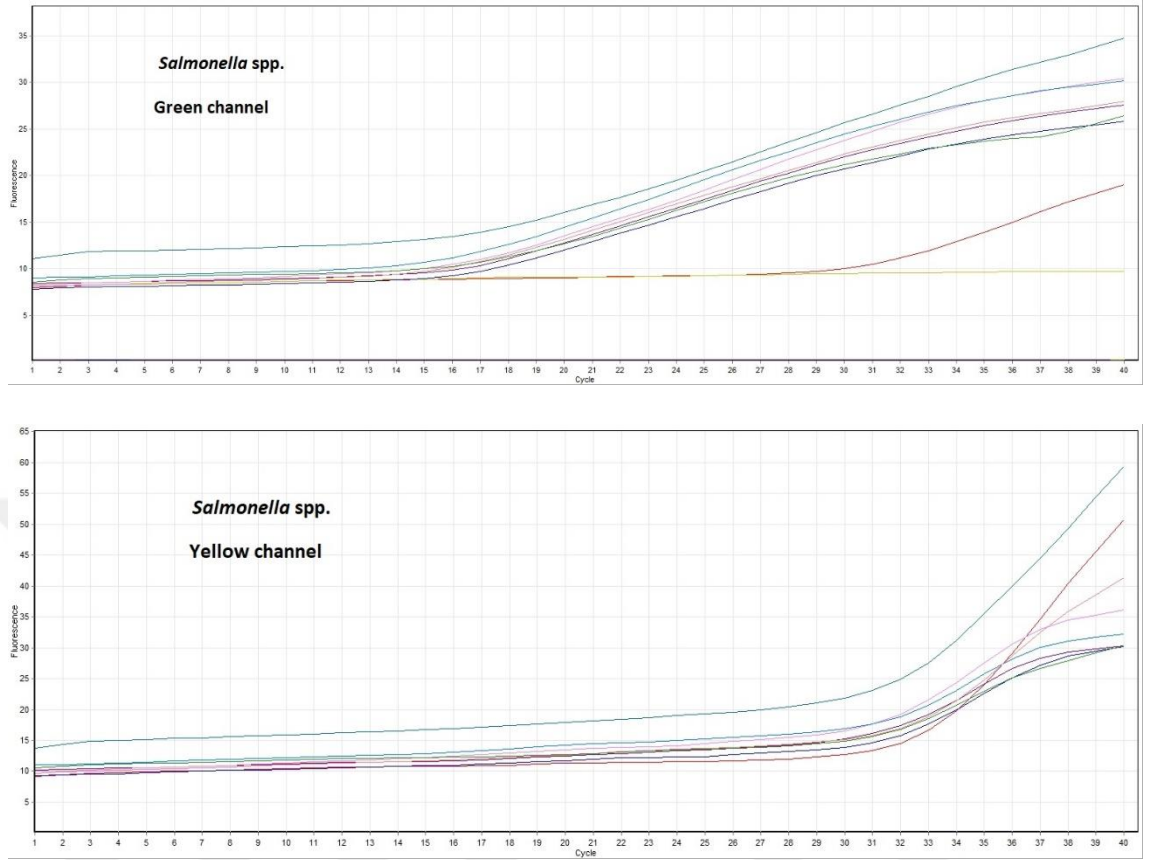
Yellow channel ve Green channel'in birlikte eğri vermesi; hedef patojenin varlığının göstergesidir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Örnek için pozitif qPCR sonucu

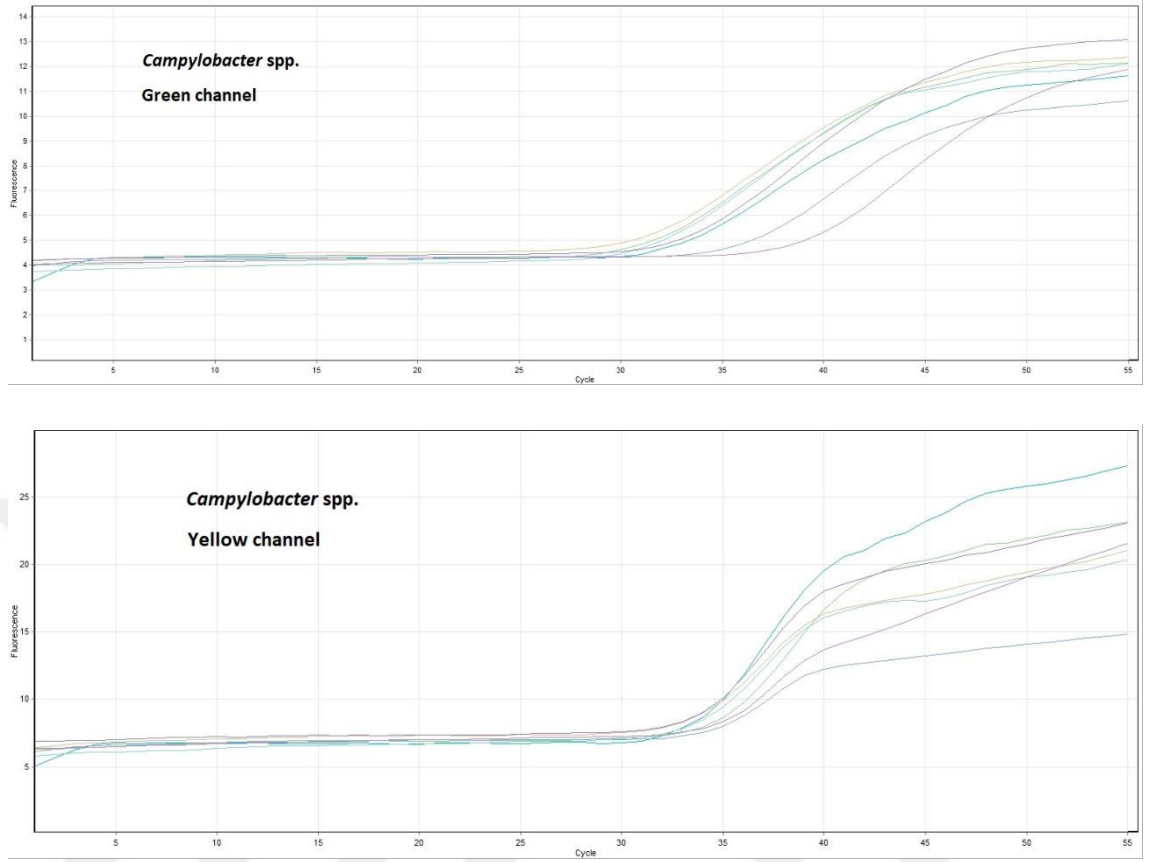
Real-time PCR protokolüyle 44 adet *Salmonella* spp. izolatu ve 32 adet *Campylobacter* spp. (*C. jejuni* ve *C. coli*) doğrudan materyallere ait ön zenginleştirme brotlarından belirlenmiştir. Klasik kültürel yöntemle izole edilen kültürler aynı şekilde qPCR ile doğrulanmıştır. Doğrulama sonuçları klasik kültürel yöntem ve LAMP ile karşılaştırıldığında hatalı pozitif sonuç görülmemiştir. Klasik kültürel yöntem, LAMP ve PCR uygulamaları bu sebeple birbirine alternatif olarak görülebilecek yöntemlerdir. Özellikle kültürel yöntemlerin zaman alıcı olduğu ve şüpheli izolatların identifikasyonunda bazen negatif sonuçların alındığı düşünüldüğünde; nükleik asit temelli amplifikasyon uygulamalarının hız, hassasiyet gibi avantajları ön plana çıkmaktadır.

Real-time PCR amplifikasyon sonucu cihaza ait yazılımla bilgisayar ekranında takip edilmiştir. Bazı *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp.'ye ait PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.17 ve 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Bazı *Salmonella* spp. izolatları için PCR amplifikasyon eğrileri

Molüküler çalışmalarda qPCR genellikle kantitatif analizlerde kullanılmaktadır. Fakat, protokolde kullanılan boya veya proba göre de kalitatif sonuçların alınması da mümkündür. Bu sebeple Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de floresansa bağlı olarak belirli sıkluslarda plato oluşumu DNA çoğalmasının bir göstergesidir. Buna bağlı olarak kültürel metotla elde edilen izolatlardan ve örneklerle ait zenginleştirme brotlarından DNA ekstraksiyonu ile PCR işlemlerinde farklı sıkluslarda floresans değişimi gözlemlenmiştir.



Şekil 4.18. *Campylobacter* spp. için PCR amplifikasyon eğrileri

Şekil 4.18’de çalışmada elde edilen 7 adet *Campylobacter* izolatına ait qPCR amplifikasyon eğrileri görülmektedir. Sonuçlar reaksiyon ortamında kullanılan farklı florasan özellikteki maddeler nedeni ile iki farklı renk kanalı kullanılarak belirlenmiştir. Her iki kanal sonuçlarının uyumu pozitif sonucu göstermektedir.

Belirtildiği üzere çalışmada üç farklı metodla tanı işlemi gerçekleştirilmiştir. Hedef patojenlerin tespitinde kullanılan her üç yöntemle de aynı örneklerde pozitif sonuçlar alınmıştır. Pozitif örneklerin yöntemlere göre dağılımı ve moleküler yöntemlerin DNA konsantrasyonuna göre belirleme limitleri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Pozitif örneklerin yöntemlere göre dağılımı

Yöntem	Kültür		LAMP		qPCR	
Hedef	Camp	Sal	Camp	Sal	Camp	Sal
Oran	32 (%25)	44 (%35)	32 (%25)	44 (%35)	32 (%25)	44 (%35)
Belirleme limitleri	-	-	5≥ kob 2 ng/25 µL	3≥ kob 2 ng/25 µL	5≥ kob 25 ng/20 µL	3≥ kob 25 ng/20 µL

Real-time PCR tekniği kümes hayvanlarında patojenlerin izlenmesinde hızlı, spesifik sonuçlar verdiği için sıklıkla kullanılmaktadır. TaqMan probolar kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda da *Salmonella* spp. yüksek hassasiyetle belirlenmiştir (Malorny *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda TaqMan PCR ve klasik kültürel metot aynı sonuçları vermiştir. Kimura *et al.* (1999) Tokyo piyasasında perakende olarak satılan toplam 100 adet et ve tavuk materyalini kültürel ve TaqMan PCR yöntemiyle *Salmonella* spp. analizleri yaptıkları çalışmada; geleneksel kültürel yöntemle 10 adet materyalde *Salmonella* spp. (%10) belirlenirken, PCR ile 11 (%11) pozitif sonuç tespit edildiğini rapor etmişlerdir.

Kawasaki *et al.* (2001) çeşitli kırmızı et ve tavuk etlerinden oluşan 98 adet işlenmemiş çiğ materyallerden kültürel yöntemle 37 (%38), real-time PCR tekniğiyle ise 42 (%42) oranında *Salmonella* spp. belirlediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak her iki yöntemle aynı izolasyon oranı belirlenmiştir. Bu farklılığın sebebi genel olarak şöyle izah edilmektedir: Karışık bir mikrobiyotaya sahip olan tavuk etlerinin ön zenginleştirilmesi sonrasında üreyen birçok bakteri cinsi selektif zenginleştirme basamağında yük olarak azaltılsa da selektif katı besiyerlerinde çoğalıp ekzopolisakkarit üreterek bazen *Salmonella* spp. izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Bu durum klasik yöntemde izolasyon oranını düşürmektedir. Fakat; ortamda düşük sayıda *Salmonella* hücrelerine ait DNA örneği bile real-time PCR ile tespit edilebilmektedir. Çalışmamızda materyallerin yeterli sürede (18-24 saat) ön zenginleştirmeye tabi tutulması sonucunda zarar gören *Salmonella* hücrelerinin yeniden çoğalma yeteneği kazandığı ve çoğaldığı düşünülmektedir. Gerek canlı gerek cansız hücrelere ait DNA

ekstrakte edilip PCR ile tespit yapılması bazen farklı seviyelerde sonuçlara sebep olabilmektedir.

Materyal olarak kullanılan 99 hindi etinin 49'unda (%50) pozitif sonuç elde edildiği bir çalışmada; *Salmonella* spp. teşhisinde geleneksel yöntemle mukayese edildiğinde kullandığı RapidCheck ve iQ-Check real-time PCR metodlarının daha az pozitif sonuç elde ettiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar ön zenginleştirme işleminin moleküler temelli metodların doğruluğunu artırmak için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Fakhr *et al.* 2006). Bu çalışmaya kıyasla, ön zenginleştirme işlemi yaptığımız bu araştırmamızda geleneksel kültürel ve PCR temelli yöntemler ile yanlış pozitif sonuçlar alınmamıştır. Bu sebeple klasik kültürel metodların hala güvenilirliğini koruduğu ve moleküler metodların ön zenginleştirme ihtiva edecek şekilde performansının değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılabilir.

Malorny *et al.* (2007), bir araştırmalarında tavuk etlerinden geleneksel kültürel yöntemle izole ettikleri *Salmonella* spp.'nin tamamının Real-time PCR ile pozitif olarak belirlendiği ve kültürel teknikte 20 negatif sonucun Real-time PCR ile de negatif sonuçlandığını bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlarımız bu araştırma ile uyumaktadır. Ayrıca, bu tez çalışmasında LAMP ve Kültürel teknik ile alınan sonuçların Real-time PCR ile tam bir uyumluluk gösterdiği görülmüştür.

Nde *et al.* (2008) hindi etlerinde *Salmonella* spp. belirlenmesini kültürel ve Real-time PCR ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada her iki yöntemin duyarlılıklarını karşılaştırmışlardır. Real-time PCR'ın *Salmonella* spp. tespitinde daha verimli bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda ise her iki yöntemin aynı örneklerde hedefi saptayabildikleri belirlenmiştir. Bu sebeple iki yöntemin doğru sonucu bulmada birbirine üstünlükleri görülmezken, PCR yönteminin zamandan kazanç sağlaması bir avantaj olarak görülebilir.

O'Regan *et al.* (2008) tarafından tavuk eti örneklerinde EN ISO 6579:2002 standart metot ile real-time PCR karşılaştırılmıştır. Örneklerde 18 saat ön zenginleştirme (BPW,

37°C), 6 saat selektif zenginleştirme (RVS, 41,5°C) sonrasında DNA ekstraksiyonu ve PCR işlemiyle analiz süresinin kısaltıldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda ön zenginleştirme sonrası selektif zenginleştirme yapılmadan DNA ekstraksiyonu yapılmış ve PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak selektif zenginleştirme aşaması geçilmiş ve sonuç 6 saat daha erken elde edilmiştir.

Oscar *et al.* (2014) tavuk parçalarında *Salmonella* tespiti ve sayımı için ön zenginleştirme (400 mL tamponlanmış peptonlu su, 8 saat, 80 rpm, 37°C) sonrası real-time PCR işlemi uygulamışlardır. Her iki yöntemle aynı oranda belirlenme yapıldığı bildirilmiştir. Benzer olarak çalışmamızda da iki yöntemle aynı seviyede tespit gerçekleştirilmiştir. Birçok çalışmada hem klasik kültürel hem de moleküler yöntemler için örneklerde ön zenginleştirme önerilmektedir. Ön zenginleştirmeye zarar görmüş veya baskılanmış *Salmonella* hücreleri onarılmakta ve tekrardan çoğalma yeteneği kazanmaktadır.

Bizim yaptığımız çalışma toplam analiz süresi açısından değerlendirildiğinde; 24 saatlik zenginleştirme sonrasında DNA ekstraksiyon ve PCR işlemleri için ilave 3-4 saat daha süre gerektirmektedir. Pozitif sonuç için klasik kültürel yöntemde en az 4 gün gerekirken, real-time PCR ile 1 gün kadar süre yeterli olmaktadır. Hyeon *et al.* (2017) çiğ tavuk göğüs etlerinde *Salmonella*'nın hızlı tespiti için immunomanyetik separasyon (IMS) ve real-time PCR kombinasyonunu kullandıkları çalışmada, ~10 kob/g seviyesinde kültürel zenginleştirme işlemi yapılmadan bu yöntemle pozitif sonuç alındığını vurgulamışlardır. Ayrıca; ~0.1 kob/g seviyesinde *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis ile kontamine edilmiş soğuk koşullarda depolanan materyallerde 4 saatlik zenginleştirme sonrasında sonuç alındığı gösterilmiştir. Gün aşırı zenginleştirme ile 4 saatlik zenginleştirme arasında istatistiki olarak hiçbir farkın olmadığı, bu yöntemde kısa süre içerisinde sonuç alındığı vurgulanmıştır.

Çalışmamızda 38 siklusa kadar *C. coli* ve *C. jejuni* için amplifikasyon tespit edilmiştir. Vondrakova *et al.* (2014) *Campylobacter jejuni*, *C. coli* ve *C. lari* türlerinin gıda matrislerinden belirlenmesi ve doğrulanması amacıyla spesifik primer ve hidroliz

probları kullanmışlardır. Bütün türler için PCR reaksiyonunda $\geq 90\%$ etkinlik tespit etmişlerdir. Belirtilen çalışmada da 38 siklusa kadar *Campylobacter jejuni*, *C. coli* ve *C. lari* hedef türlerinin belirlendiği bildirilmiştir.

Kısaca tavuk etlerinde *Campylobacter* spp. tespitinde PCR yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Genel olarak ön zenginleştirme işleminden sonra *C. coli* ve *C. jejuni* için özellikle multiplex PCR uygun bir yöntem olarak görülmektedir. Birçok farklı çalışmada bu yöntem laboratuvarlarda araştırmacılar tarafından uygulanmış ve valide edilmiştir (Linton *et al.* 1997; Cloak and Fratamico 2002; Oyarzabal *et al.* 2005; Persson and Olsen 2005; Oyarzabal *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2011; Oyarzabal *et al.* 2013). Birçok araştırmacı tarafından tavuk etlerinde *Campylobacter* spp. teşhisinde real-time PCR protokollerinin en iyi tercih olduğu vurgulanmaktadır. Fakat; maliyet bakımından klasik PCR'a göre bir dezavantaja sahip olduğu da belirtilmiştir (Rivera *et al.* 2011; Silva *et al.* 2014; Zumbado-Gutiérrez *et al.* 2014).

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada tavuk etlerinden Real-time PCR ile *Campylobacter* spp. teşhisi için öncelikle kültürel bir ön zenginleştirme işlemi yapılmıştır. Blood-free *Campylobacter* enrichment brot gerek antibiyotik içeriği gerekse mikroaerofilik koşulları sağlayan içeriğiyle hedef patojenin gelişimini ve diğer mikrobiyotadan izolasyonunu kolaylaştırmaktadır. Çalışmamıza benzer olarak Sails *et al.* (2003) hem doğal kontamine olmuş hem de yapay kontamine edilmiş tavuk etlerinin de materyal olarak kullanıldığı bir çalışmada ön zenginleştirme işlemi sonrası hızlı bakteriyel DNA izolasyonu PCR'da doğrulama yapmıştır. Çalışmada ön zenginleştirmeden sonra Klasik yöntemde selektif agarlarda izolasyonun 48 saat, DNA izolasyon ve PCR işlemlerinin ise 3 saat sürdüğü düşünülürse zamandan kazanç olduğu vurgulanmıştır. Bunun yanında izole edilen şüpheli kolonilerin fenotipik doğrulanması ayrıca bir süreç gerektirmektedir. Çalışmamızda Real-time PCR ile elde edilen sonuçların diğer gıda patojenlerinin tespitinde toplam sürenin azaltılması açısından model olabileceği açıktır.

Jribi *et al.* (2017) yaptıkları bir çalışmada piyasadan topladıkları 250 adet tavuk ve hindi etlerinde *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* prevalansını belirleme ve

izolatları doğrulamada real-time PCR ve ISO tarafından önerilen (ISO 10272-1, 2006) klasik kültürel yöntem kullanılmıştır. Eş zamanlı olarak her iki yöntemle %25.6 (64/250) oranında izolasyon gerçekleştirildiği ve en yüksek prevelansın (%26.8) tavuk etlerinde olduğu bildirilmiştir. İzole edilen ve tanımlanan 64 termofilik *Campylobacter* spp. içerisinde *C. jejuni* türünün çoğunlukta olduğu (%59.7) vurgulanmıştır. Çalışmamızda PCR ve ISO yöntemlerinin performansı belirtilen çalışma ile uyuşmaktadır. Yani hem kültürel yöntem hem de PCR uygulaması birbirine alternatif görülmüştür. Fakat, PCR uygulamasının kısa sürede sonuç vermesi klasik kültürel yöntemle göre bir avantajdır.

4.3.4. qPCR ve LAMP için maliyet karşılaştırması

LAMP teknolojisinin laboratuvar ortamında kullanılması için komplike cihazlara ihtiyaç yoktur. Yaptığımız çalışmada LAMP reaksiyonu için izotermal koşullar ısıtıcı blok ile sağlanmıştır. Bunun yanında qPCR için termal döngüyü sağlayan ve aynı zamanda floresans değişimi okuyabilen komplike cihaza ihtiyaç duyulmuştur. Bu cihaz maliyet bakımından laboratuvarlar için başlangıçta büyük bir yük gerektirmektedir.

PCR ve LAMP reaksiyonları için kullanmış olduğumuz sarf malzemelere göre maliyetler Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14’de görülmektedir.

Çizelge 4.13. LAMP için sarf bazında maliyet

Bileşen	Tedarikçi	Miktar	Fiyat (TL)
<i>Bst</i> 3.0 DNA Polymerase	NEB	8,000 birim/mL	450
Isothermal Amplification Buffer II Pack	NEB	6 mL	300
Primerler (6 adet)	IDT	100 µM	200
HNB	SigmaAldrich	1 g	100
TOPLAM FİYAT			1050
REAKSİYON BAŞINA			11

Çizelge 4.14. qPCR için sarf bazında maliyet

Bileşen	Tedarikçi	Miktar	Fiyat (TL)
Mericon qPCR kit	Qiagen	96 reaksiyon/1 kit	4500
TOPLAM FİYAT			4500
REAKSİYON BAŞINA			48

LAMP için reaksiyon başına sarf bazında 11 TL, qPCR için 48 TL maliyet gerekmektedir. Tavuk etlerinden *Salmonella* ve *Campylobacter* tespitinde LAMP, qPCR'a kıyasla 4,4 kat daha az maliyet gerektirmektedir. LAMP ve PCR için maliyet kıyaslamasının yapıldığı bir çalışmada LAMP için reaksiyon başına 0,7 dolar, PCR için ise 5 dolar maliyet gerektiği belirtilmiştir (Saharan *et al.* 2014).

5. SONUÇ

Kanatlı hayvanların, özellikle tavuk etlerinin *Salmonella* ve *Campylobacter* gibi önemli patojenlerle kontamine olması; çapraz kontaminasyon ve uygun olmayan gıda hazırlama koşullarından dolayı insanların sağlığını tehdit edecek boyuta gelebilmektedir. Tavuk etlerinin bakteriyolojik kontrolünde bu patojenlerin belirlenme ve tanı süreleri geleneksel kültürel yöntemlerde oldukça uzundur. Bu sebeple standardize edilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiş bir bakteriyolojik kültürel yöntem kadar güvenilir, ancak kısa süre içerisinde hızlı sonuç veren metotların varlığı önem arz etmektedir. Bu amaçla Nükleik asit (DNA, RNA) amplifikasyon yöntemlerinden PCR ve LAMP gıda kaynaklı patojenlerin tespiti ve tanı uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu araştırmada kullanılan PCR ve LAMP analizlerinde temel olarak *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. patojenlerine ait spesifik DNA sekansları aranmış ve bu bakterilerin var/yok durumu yorumlanmıştır.

Çalışmamızda elde edilen bulgular ışığında sonuçlar ve öneriler aşağıda kısaca özetlenmiştir:

1. Bu çalışmanın öncelikli amacı olan LAMP ve Real-time PCR ile tavuk etlerinde *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. varlığının yüksek doğrulukta, hızlı ve hassas bir şekilde belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Klasik kültürel yöntem, qPCR ve LAMP uygulamalarıyla 126 adet örnekten toplam 44 (%35) *Salmonella* spp. ve 32 (%25) *Campylobacter* spp. varlığı tespit edilmiştir. Her üç yöntemle aynı örneklerden pozitif sonuçlar alınmıştır. Bu sebeple üç yöntemin performansı aynıdır. Fakat; klasik kültürel yöntemlerin zaman alıcı olması, izolatların doğrulanması için birçok biyokimyasal doğrulama işlemine ihtiyaç duyulması ve sarf malzeme gereksiniminden dolayı maliyetin artması, LAMP ve qPCR yöntemlerini daha ön plana çıkarmaktadır.

2. LAMP ve PCR uygulamalarında hedef patojenlere ait spesifik sekansların tespiti için gerekli olan DNA örneklerinin elde edilmesinde alkali ortamda (NaOH) kaynatma metodu her iki patojen için uygun bulunmuştur. Böylece gerek klasik kültürel yöntemle tespit edilen izolatlardan, gerekse ön zenginleştirilmeye tabi tutulan materyallere ait kültür ortamından bakteriyel DNA ekstraksiyonu için spesifik metotlara ve ticari kitlere ihtiyaç duyulmadan yüksek saflıkta başarı sağlanmıştır. Özellikle ön zenginleştirme kültürlerinden 3 adımda santrifüj ve alkali ortamda kaynatma metodu PCR ve LAMP uygulaması için inhibitör etki yapabilecek kontaminantların elemine edilmesinde etkili olmuştur.
3. Araştırma bulguları dikkate alındığında; LAMP ve PCR yöntemlerinin birbirine alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. LAMP uygulaması için yüksek maliyetli termal siklus cihazına ihtiyaç duyulmaması, amplifikasyon ürünlerinin tespitinde HNB boyasının indikatör olarak kullanılması ve sonucun çıplak gözle bile görülerek yorumlanması ve uygun olması gibi avantajlar LAMP'ın PCR yöntemine alternatif olabileceğini kanıtlar niteliktedir.
4. Bu çalışmada LAMP uygulamasının tavuk etlerinden *Salmonella* ve *Campylobacter* tespiti için uygulanabileceği gösterilmiştir. Hedefe özgü primerler ile yüksek saflıkta ekstrakte edilen DNA ile amplifikasyonun gerçekleştirildiği görülmüştür. Bu sebeple uygun primer seçimi ve etkili bir DNA ekstraksiyon ile diğer patojen bakterilerin tespitinde de uygun olabileceği söylenebilir.
5. LAMP sonucunun yorumlanmasında HNB boyasında meydana gelen renk değişiminin görülmesi dikkate alınsa da, absorbansa dayalı ölçümün daha nicel olacağı görülmüştür. Uygun sıcaklık ve sürede LAMP reaksiyonunun gerçekleşmesinden sonra kuyucuklarda absorbans ölçümlerinin 650 nm dalga boyunda yapılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.
6. Materyallere ait genel mikrobiyolojik analizlerin bulgularına bakıldığında; limitleri aşan koliform 56 (%44) ve fekal koliform varlığı 48 (%38) örnekte tespit edilmiştir.

Yine *S. aureus* (19/126) %15 oranında tespit edilmesine rağmen limitleri aşan bir sayıma rastlanmamıştır. 126 adet materyal'in 24'ünde (%19) *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Bu izolatlardan 6 (%25) tanesinin *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir. Tavuk etlerinin soğukta saklanması ve bu patojenin soğuk koşullara dayanıklı olduğu göz önüne alındığında kontaminasyonun önemli olduğu görülmektedir.

7. *S. aureus*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. izolatlarının 12 adet antibiyotiğe karşı direnç test sonuçları değerlendirildiğinde izolatlarda çoklu direnç tespit edilmiştir. Bütün izolatlar üzerinde meropenem, ertapenem antibiyotikleri yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Bunun yanında nalidiksik asit, kanamisin ve trimetorfim antibiyotiklerine karşı genel olarak bir direnç söz konusudur. Bu sebeple rastgele yüksek dozlarda antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi için önlemlerin alınması önerilmektedir.

Sonuç olarak; bu araştırmanın temelde amacı olan LAMP yönteminin tavuk etlerinde *Salmonella* ve *Campylobacter* aranmasında hızlı, spesifik bir metot olduğu görülmüştür. Çalışmamızda LAMP yönteminin Real-time PCR'a alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca sunulan literatür taramasıyla LAMP için önemli teorik ve pratik bilgiler de literatüre kazandırılmaya çalışılmıştır. Böylece elde edilen bilgi ve bulguların bu alanda yapılacak benzer çalışmalara ışık tutması mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M., McDermott, P.F. and Wegener, H.C., 2008. Transmission of antibiotic resistance from food animals to humans. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ (eds), *Campylobacter*. 3rd ed. Washington DC, ASM Press, p 645-665.
- Abay, S., Kayman, T., Otlu, B., Hizlisoy, H., Aydin, F. and Ertas, N., 2014. Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 29-38.
- Abd-Elghany, S. M., Sallam, K.I., Abd-Elkhalek, A., and Tamura, T., 2015. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiology and Infection*, 143(5), 997-1003.
- Abeyta, C., Trost, P.A., Bark, D.H., Hunt, J.M., Kaysner, C.A., Tenge, B.J. and Wekell, M.M., 1997. The use of bacterial membrane fractions for the detection of *Campylobacter* species in shellfish. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 5 (3), 223-247.
- Abirami, N., Nidaullah, H., Chuah, L.O., Shamila-Syuhada, A.K., Chandraprasad, S.R., Huda, N. and Rusul, G., 2016. Evaluation of commercial loop-mediated isothermal amplification based kit and ready-to-use plating system for detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry and their processing environment. *Food control*, 70, 74-78.
- Akan, M., Diker, K.S. ve Yıldırım, M., 2000. Kanatlı *Campylobacter* infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi. IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül, Ankara, Kongre Özet Kitabı. S. 78.
- Alakomi, H.L. and Saarela, M. 2009. *Salmonella* importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1, 142-152.
- Anar, Ş., Çarlı, T., Şen, A. ve Eyigör, A., 1992. Bursa'da tüketime sunulan piliç butlarından *S. aureus* ve *E. coli* Tip 1 izolasyonu üzerine bir çalışma. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2 (11), 135-141.
- Andrews, W.H., Wang, H., Jacobson, A. and Hammack, T., 2016. BAM: *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual.
- Anonymous, 2018a. The agar diffusion test (Kirby–Bauer antibiotic testing, KB testing, or disc diffusion antibiotic testing. https://en.wikipedia.org/wiki/Agar_diffusion_test. (16.01.2018).
- Anonymous, 2018b. HiberGene Diagnostic LAMP technology slideshow. <http://www.hibergene.com/products/lamp-technology/lamp-technology-slideshow/>. (30.01.2018).
- Anonymous, 2018c. LAMP: Isothermal amplification application overview. <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification>. (30.01.2018).

- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L. and Pestana, N., 2002. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2): 97-103.
- Arai, T., Okada, S. and Shimizu, A., 2004. *Staphylococcus aureus* contamination in a poultry-processing plant and biological properties of isolates. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association (Japan)*, 57, 460-464.
- Baylis, C.L., MacPhee, S., Martin, K.W., Humphrey, T.J. and Betts, R.P., 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology*, 89 (5), 884-891.
- Bell, C. and Kyriakides, A., 2002. *Salmonella*. In: *Foodborne Pathogens*. Ed.. Blackburn, Clive De W. and McClure, P.J. Woodhead Publishing, p. 307-331, Boca Raton.
- Bennett, R.W. and Lancette, G.A., 2016. *Staphylococcus aureus*. *Bacteriological Analytical Manual Online*, chapter 12: January 2001; 1-5. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>. (30.01.2018).
- Bester, L.A. and Essack, S.Y., 2008. Prevalence of antibiotic resistance in *Campylobacter* isolates from commercial poultry suppliers in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6), 1298-1300.
- Bhaisare, D. B., Thyagarajan, D., Richard Churchil, R. and Punniamurthy, N., 2014. Bacterial pathogens in chicken meat: Review. *International Journal of Life Sciences Research*, 2 (3), 1-7.
- Bhatia, A. and Zahoor, S., 2007. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3 (1), 188-197.
- Bilgiç, H.B., Karagenç, T., Bakirci, S., Eren, H. and Weir, W., 2017. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of *Theileria annulata* DNA. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64, 211-221.
- Bonev, B., Hooper, J. and Parisot, J., 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61 (6), 1295-1301.
- Boynukara, B. ve Aydın, F., 1990. Tavuklardan izole edilen *Salmonella* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine bir araştırma. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 90 (6), 21-23.
- Büyükcinal, S.K., 2017. İstanbul'da satışa sunulan piliç etlerinde termotolerant *Campylobacter* spp. prevalansı ve antibiyotik dirençliliği. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43 (2), 98-109.
- Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. and Del Camino GarciaFernandez, M., 2003. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 81 (2), 169-173.
- Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., Bregano, L.C., Silva-Frade, C., Rosa, A.C.G. and Andrade, A.L., 2010. Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. *Molecular and cellular probes*, 24 (6), 415-417.
- Ceylan, Z.G., Demirkaya, A.K. and Adigüzel, G., 2008. Incidence of *Listeria monocytogenes* in retail chicken meat and establishing relationship with some bacteria by logistic regression. *Journal of food quality*, 31 (1), 121-130.

- Chaibenjawong, P. and Foster, S.J., 2011. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. Archives of Microbiology, 193 (2), 125-135.
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C. and Joffraud, J.J., 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. The ISME Journal, 9(5), 1105-1118.
- Chan, K.F., Le Tran, H., Kanenaka, R.Y. and Kathariou, S., 2001. Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4°C). Applied and Environmental Microbiology, 67 (9), 4186-4191.
- Chand, P. and Sadana, J.R., 1999. Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. Veterinary record, 145 (3), 83-84.
- Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M.J., Klingele, A.J., Liles, M.R. and Schoenfeld, T.W., 2014. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Frontiers in Microbiology, 5, 395.
- Chen, H.W. and Ching, W.M., 2014. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid and easy detection of *Coxiella Burnetii*. Journal of Microbiological Methods, 107, 176-181.
- Chen, J., Zhang, L., Paoli, G.C., Shi, C., Tu, S.I. and Shi, X., 2010. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. Int. J. Food Microbiol. 137, 168-174.
- Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., Mcdermott, P.F., Ayers, S. and Meng, J., 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. Applied and Environmental Microbiology, 70 (1), 1-7.
- Chen, S. and Ge, B., 2010. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiology, 10 (1), 41.
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R.E. and Ge, B., 2011. Rapid detection of viable *Salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. Applied and Environmental Microbiology, 77 (12), 4008-4016.
- Chen, Z., Zhang, K., Yin, H., Li, Q., Wang, L. and Liu, Z., 2015. Detection of *Salmonella* and several common *Salmonella* serotypes in food by loop-mediated isothermal amplification method. Food Science and Human Wellness, 4 (2), 75-79.
- Cheng, C.M., Van, K.T., Lin, W., Lin, J., and Farmer, D., 2005. A novel PCR assay for rapid detection of *Salmonella* spp. in foods. Laboratory Information Bulletin, 21 (1), 4337.
- Cheng, C.M., Lin, W., Van, K.T., Phan, L., Tran, N.N. and Farmer, D., 2008. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. Journal of food protection, 71(12), 2436-2441.
- Chodorowska, M. and Kuklinska, D., 2002. Czynniki wirulencji *Listeria monocytogenes* oraz patogenez, obraz kliniczny i antybiotykoterapia listeriozy. Postępy Mikrobiologii, 41(1), 37-49.

- Cloak, O.M. and Fratamico, P.M., 2002. A multiplex PCR for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by PFGE and antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Protection*, 65 (11), 266-273.
- Çakmak, Ö., 2009. Hindi Etlerinde *Campylobacter jejuni*'nin kültür tekniği ve PCR ile saptanması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Daştan, K., 2006. Mitokondriyal DNA genomu tek nükleotid polimorfizminin Real Time PCR cihazı ile idantifikasyonu ve standardizasyonu. Yüksek lisans tezi. İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Wit, B., Huijsdens, X.W., De Neeling, A.J., Bosch, T. and Heuvelink, A.E., 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134 (1-2), 52-56.
- Debretson, A., Habtemariam, T., Wilson, S., Nganwa, D. and Yehualaeshet, T., 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Molecular and Cellular Probes*, 21 (3), 177-181.
- Debruyne, L., Gevers, D. and Vandamme, P. 2008. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter*, Third Edition (pp. 3-25). American Society of Microbiology.
- Delibato, E., Rodriguez-Lazaro, D., Gianfranceschi, M., De Cesare, A., Comin, D., Gattuso, A. and Saiz-Abajo, M.J., 2014. European validation of real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 134-138.
- Demirel, E., 2014. Ordu ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *Toxoplasma gondii*'nin moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A. and Thomas, P., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 17(2), 151-166.
- Dizgah, D.G., 1995. İstanbul piyasasında satısa sunulan kanatlı eti ve ürünlerinde *Campylobacter jejuni*'nin varlığı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
- Dragan, A.I., Pavlovic, R., McGivney, J.B., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R. J. and Geddes, C.D., 2012. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22 (4), 1189-1199.
- Dugan, L., Bearinger, J., Hinckley, A., Strout, C. and Souza, B., 2012. Detection of *Bacillus anthracis* from spores and cells by loop-mediated isothermal amplification without sample preparation. *Journal of Microbiological Methods*, 90 (3), 280-284.
- Efe, M., 2005. Ankara gornizonunda tüketime sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye.

- Efe, M., ve Gümüşsoy, K.S., 2005. Ankara garnizonunda tüketime sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik analizi. Sağlık Bilimleri Dergisi, 14: 151-157.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Scientific opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: part 1 (evaluation of methods and applications). EFSA Journal, 11 (12), 3502.
- EFSA, E., 2011. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal, 9 (4), 2105-2145.
- Ellerbroek, L.I., 2004. Research update on major pathogens associated with the processing of poultry and poultry products. Food Safety Assurance and Veterinary Public Health, 2, 81-98.
- Erdem, B., 1999. *Campylobacter* ve *Helicobacter*. Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 531-540.
- Erol, İ., 1999. Kanatlı eti hijyeni ders notları. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 1-76 s., Ankara.
- Erol, İ., Yurtyeri, A., Hildebrandt, G., Kleer, J., Bilir Ormancı, F.S. ve Koluman, A., 2004. *Salmonella*'ların piliç karkaslarından kültür tekniği ve immunomanyetik PCR ile karşılaştırmalı olarak saptanması. 1.Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 29 Eylül-1 Ekim 2004, 29-38s.
- Euzéby, J.P., 2010. List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus *Campylobacter*. <https://www.bacterio.net/campylobacter.html>. (20.12.2016).
- Euzéby, J.P., 2014. List of prokaryotic names with standing in nomenclature: genus *Campylobacter*. <https://www.bacterio.net/campylobacter.html>. (23.12.2016).
- Fakhr, M.K., McEvoy, J.M., Sherwood, J.S. and Logue, C.M., 2006. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check™ realtime-PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. Letters in Applied Microbiology, 43 (1), 78-83.
- Feng, P., Weagant, S.D., Grant, M.A., Burkhardt, W., Shellfish, M. and Water, B., 2002. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Bacteriological Analytical Manual, 13-19.
- Ferrara, M., Perrone, G., Gallo, A., Epifani, F., Visconti, A. and Susca, A., 2015. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Penicillium nordicum* in dry-cured meat products. International Journal of Food Microbiology, 202, 42-47.
- Fischbach, J., Xander, N.C., Frohme, M. and Glökler, J.F., 2015. Shining a light on LAMP assays- A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. BioTechniques., 58 (4), 189-194.
- Frasao, B.D.S., Marin, V.A. and Conte-Junior, C.A., 2017. Molecular detection, typing, and quantification of *Campylobacter* spp. in foods of animal origin. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16 (4), 721-734.
- Garénaux, A., Jugiau, F., Rama, F., De Jonge, R., Denis, M., Federighi, M. and Ritz, M., 2008. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. Current Microbiology, 56 (4), 293-297.

- Garrido-Maestu, A., Fuciños, P., Azinheiro, S., Carvalho, J. and Prado, M., 2017. Systematic loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection and characterization of *Salmonella* spp., Enteritidis and Typhimurium in food samples. *Food Control*, 80, 297-306.
- Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P.M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (5), 851-875.
- Gilbert, C. and Slavik, M., 2004. Determination of toxicity of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and from poultry carcasses acquired at various stages of production. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (2), 347-353.
- Ghosh, R., Nagavardhini, A., Sengupta, A. and Sharma, M., 2015. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris-wilt pathogen of chickpea. *BMC Research Notes*, 8 (1), 40.
- Gökalp, H.Y., Yetim, H. ve Kaya, M., 1987. Ticari kuruluşlarda dondurularak muhafaza edilen tavuk etlerinin kokuşma düzeyleri ve bakteriyolojik durumları üzerine bir araştırma. *Et ve Balık Endüstrisi Dergisi*, 51 (8), 13-22.
- Gökhan, A.L., 2015. Sığır kıyma ve köftelerinde *Salmonella* spp. varlığı ve antibiyotik dirençlilik profilleri. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 86 Sayfa.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P.I., Bockemühl, J., Grimont, P. A. and Weill, F.X., 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. *Research in Microbiology*, 161 (1), 26-29.
- Günşen, U., 2004. Bursa il merkezi'nde satışa sunulan tavuk eti ve ürünlerinde termotolerant *Campylobacter* türlerinin varlığı. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 6, 8-15
- Güven, A. ve Patır B., 1998. Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde *Listeria* türlerinin araştırılması. *Turkish Journal Animal of Veterinary Sciences*, 22, 205-212.
- Haas, K., Overesch, G. and Kuhnert, P., 2017. A quantitative Real-Time PCR approach for assessing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonization in broiler herds. *Journal of Food Protection*, 80 (4), 604-608.
- Han, F., Lestari, S.I., Pu, S. and Ge, B., 2009. Prevalence and antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. in Louisiana retail chickens after the enrofloxacin ban. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (2), 163-171.
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T. and Ikeda, M., 2005. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*, 253, 155-161.
- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M. and 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. *Journal of Microbiological Methods*, 66 (3), 538-547.
- Hill, J., Beriwal, S., Chandra, I., Paul, V. K., Kapil, A., Singh, T. and Johnson, J.R., 2008. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (8), 2800-2804.

- Hinton, A., Jr., Cason, J.A., Ingram, K.D., 2004. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 155-165.
- Hitchins, A.D., Jinneman, K. and Chen, Y., 2017. BAM: Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Bacteriological Analytical Manual*.
- Hong, J., 2017. Development and application of the loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food. *Journal of Food Safety*, 37, e12362.
- Huang, W., Zhang, H., Xu, J., Wang, S., Kong, X., Ding, W. and Feng, J., 2017. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Ralstonia solanacearum* phylotype I mulberry strains in China. *Frontiers in Plant Science*, 8, 76.
- Hunt, J.M., Abeyta, C. and Tran, T., 2001. *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 7 *Campylobacter*. US Food and Drug Administration.
- Hur, J., Jawale, C. and Lee, J.H., 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45 (2), 819-830.
- Huss, H.H., Reilly, A. and Embarek, P.K.B., 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, 11 (2), 149-156.
- Hyeon, J.Y. and Deng, X., 2017. Rapid detection of *Salmonella* in raw chicken breast using real-time PCR combined with immunomagnetic separation and whole genome amplification. *Food Microbiology*, 63, 111-116.
- Inglis, G.D., Kalischuk, L.D. and Busz, H.W., 2004. Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (2), 410-420.
- Iovine, N.M., 2013. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4 (3), 230-240.
- ISO (International Organization for Standardization)., 2017. Microbiology of the food chain-horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*-part 1: detection of *Salmonella* spp. ISO 6579-1:2017. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization)., 2006. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection Method. Geneva: International Organization for Standardization; [ISO 10272-1:2006]
- Jacxsens, L., Luning, P.A., Marcelis, W.J., van Boekel, T., Rovira, J., Oses, S. and Uyttendaele, M., 2011. Tools for the performance assessment and improvement of food safety management systems. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 80-89.
- Jorgensen, J.H., and Turnidge, J.D., 2007. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, p. 1152–1172. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Jribi, H., Sellami, H., Mariam, S., Smaoui, S., Ghorbel, A., Hachicha, S. and Gdoura, R., 2017. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. from poultry and poultry by-products in Tunisia by conventional culture method and Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Food Protection*, 80 (10), 1623-1627.

- Kadariya, J., Smith, T.C. and Thapaliya, D., 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. BioMed Research International, 2014, Article ID 827965.
- Kadiroğlu, P., 2013. *Staphylococcus aureus*'un Türk beyaz peynirinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemleri ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kaittanis, C., Santra, S., Perez, J.M., 2010. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. Advanced Drug Delivery Reviews, 62 (4-5), 408-423.
- Kawasaki, S., Kimura, B. and Fujii, T., 2001. Comparison of TaqMan *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of *Salmonella* in meat samples. Shokuhin Eiseigaku Zasshi., 42 (1), 33-9.
- Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Kusunoki, J., Itoh, T. and Flood, S.J., 1999. Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. Journal of Food Protection, 62 (4), 329-335.
- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H. and Inamoto, T., 2005. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. The Journal of Veterinary Medical Science, 67 (3), 269-274.
- Koçan, D. ve Halkman, A.K., 2010. Gıdalarda lateral akış testi ile *Listeria* Analizi. Gıda Dergisi, 35 (2), 121-126.
- Koçyiğit, A., 2002. İzmir'de çeşitli marketlerde satışa sunulan tavuk ve hindi etlerinde *Staphylococcus aureus* aranması, sayımı ve tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kong, X., Lu, Z., Zhai, L., Yao, S., Zhang, C., Lv, F. and Bie, X., 2013. Mining and evaluation of new specific molecular targets for the PCR detection of *Salmonella* spp. genome. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29 (12), 2219-2226.
- Krascenicsová, K., Piknová, L., Kacliková, E. and Kuchta, T., 2008. Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and Real-time polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 46, 483-487.
- Kumar, S. and Mondal, K.K., 2015. Visual detection of *Escherichia coli* contamination in milk and fruit juice using loop-mediated isothermal amplification. Journal of Food Science and Technology, 52 (11), 7417-7424.
- Kumar, Y., Bansal, S. and Jaiswal, P., 2017. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16 (6), 1359-1378.
- Kwon, N.H., Park, K.T., Jung, W.K., Youn, H.Y., Lee, Y., Kim, S.H. and Kim, J.M., 2006. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. Veterinary Microbiology, 117 (2), 304-312.
- Lau, Y.L., Lai, M.Y., Teoh, B.T., Abd-Jamil, J., Johari, J., Sam, S.S. and AbuBakar, S., 2015. Colorimetric detection of dengue by single tube reverse-transcription-loop-mediated isothermal amplification. PloS One, 10 (9), e0138694.
- Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2 (1), 63-76.

- Lee, C.Y., Tai, C.L., Lin, S.C. and Chen, Y.T., 1994 Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 161-170
- Lee, K.M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R. and Hsieh, J., 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276.
- Levin, R.E., 2007. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*, 21 (4), 271-347.
- Li, J., Zhai, L., Bie, X., Lu, Z., Kong, X., Yu, Q. and Zhao, H. 2016. A novel visual loop-mediated isothermal amplification assay targeting *gene62181533* for the detection of *Salmonella* spp. in foods. *Food Control*, 60, 230-236.
- Li, X., Zhang, S., Zhang, H., Zhang, L., Tao, H., Yu, J. and Liu, Y., 2009. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 133 (3), 252-258.
- Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J. and Stanley, J., 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2568-2572.
- Liu, Z., Zhu, J., Xia, X., Wang, L., Yang, C. and Li, X., 2015. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *lmo0460* sequence for detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 35(3), 362-369.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4 (6), 357-362.
- Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339 (8), 520-532.
- Löfström, C., Hansen, F. and Hoorfar, J., 2010. Validation of a 20-h real-time PCR method for screening of *Salmonella* in poultry faecal samples. *Veterinary Microbiology*, 144 (3-4), 511-514.
- Löfström, C., Knutsson, R., Axelsson, C.E. and Rådström, P., 2004. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 69-75.
- Ma, H., Su, Y., Ma, L., Ma, L., Li, P., Du, X. and Lu, X., 2017. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from retail chicken in Tianjin, China. *Journal of Food Protection*, 80 (6), 1032-1040.
- Malorny, B., Bunge, C. and Helmuth, R., 2007. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, 70 (2), 245-251.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A. and Helmuth, R., 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12), 7046-7052.
- Mao, Z., Qiu, Y., Zheng, L., Chen, J. and Yang, J., 2012. Development of a visual loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the bacterial

- pathogen *Pseudomonas putida* of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Journal of Microbiological Methods, 89 (3), 179-184.
- Mashooq, M., Kumar, D., Niranjana, A.K., Agarwal, R.K. and Rathore, R., 2016. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: a new tool for DNA quantification. Journal of Microbiological Methods, 126, 24-29.
- Mason, M.J., Humphrey, T.J. and Martin, K.W., 1999. Isolation of sublethally injured *Campylobacters* from poultry and water sources. British Journal of Biomedical Science, 56 (1), 2.
- Maturin, L. and Peeler, J.T., 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 3. Aerobic Plate Count.
- McGuinness, S., McCabe, E., O'Regan, E., Dolan, A., Duffy, G., Burgess, C., Fanning, S., Barry, T. and 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 Science, 83, 555-562.
- Mead, G. C. (1995). Hygiene problems and control of process contamination. In Processing of poultry (pp. 183-220). Springer, Boston, MA.
- Mead, G., 2004a. *Campylobacter* update-the challenge. International Poultry Production, 12 (4), 26-29.
- Mead, G.C., 2004b. Microbiological quality of poultry meat: a review. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 6 (3), 135-142.
- Meng, J. and Doyle, M.P., 1998. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. Bulletin de l'Institut Pasteur, 96 (3), 151-164.
- Mohon, A. N., Elahi, R., Khan, W. A., Haque, R., Sullivan Jr, D. J., & Alam, M. S. (2014). A new visually improved and sensitive loop mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of symptomatic falciparum malaria. Acta Tropica, 134, 52-57.
- Moore, M.M. and Feist, M.D., 2007. Real-time PCR method for *Salmonella* spp. targeting the *stn* gene. Journal of Applied Microbiology, 102 (2), 516-530.
- Mori, Y. and Notomi, T., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Journal of Infection and Chemotherapy, 15 (2), 62-69.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. and Notomi, T., 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 289 (1), 150-154.
- Moura, G.F., de Oliveira Sgarini, C. and de Souza Figueiredo, E.E., 2016. *Listeria monocytogenes* in chicken meat. Journal of Food and Nutrition Research, 4 (7), 436-441.
- Mouttoutu, N., Ahmad, S., Kamran, Z. and Koutoulis, K.C., 2017. Prevalence, risks and antibiotic resistance of *Salmonella* in poultry production chain. In current topics in *Salmonella* and salmonellosis. InTech.
- Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T., 2002a. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and cellular probes, 16 (3), 223-229.

- Nagamine, K., Kuzuhara, Y. and Notomi, T., 2002b. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290 (4), 1195-1198.
- Nde, C.W., Fakhr, M.K., Doetkott, C. and Logue, C.M., 2008. An evaluation of conventional culture, *invA* PCR, and the real-time PCR iQ-Check kit as detection tools for *Salmonella* in naturally contaminated premarket and retail turkey. *Journal of Food Protection*, 71 (2), 386-391.
- Ngom, B., Guo, Y., Wang, X. and Bi, D., 2010. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (3), 1113-1135.
- Nie, K., Qi, S. X., Zhang, Y., Luo, L., Xie, Y., Yang, M.J. and Ma, X.J., 2012. Evaluation of a direct reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method without RNA extraction for the detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 in nasopharyngeal swab specimens. *PloS One*, 7 (12), e52486.
- Niessen, L., Luo, J., Denschlag, C. and Vogel, R.F., 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology*, 36 (2), 191-206.
- Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Parisi, A., Celano, G.V., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117 (2), 219-222.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28 (12), e63.
- Okamura, M., Ohba, Y., Kikuchi, S., Suzuki, A., Tachizaki, H., Takehara, K. and Nakamura, M., 2008. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of *Salmonella* in chickens. *Veterinary Microbiology*, 132 (1-2), 197-204.
- Okamura, M., Ohba, Y., Kikuchi, S., Takehara, K., Ikedo, M., Kojima, T. and Nakamura, M., 2009. Rapid, sensitive, and specific detection of the O4 group of *Salmonella enterica* by loop-mediated isothermal amplification. *Avian Diseases*, 53, 216-221.
- Olah, P.A., Doetkott, C., Fakhr, M.K. and Logue, C.M., 2006. Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. isolated from freshly processed turkeys. *Food Microbiology*, 23 (5), 453-460.
- O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., Duffy, G. and Fanning, S., 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, 8 (1), 156.
- Orsi, R.H. and Wiedmann, M., 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (12), 5273-5287.
- Oscar, T.P., 2014. Use of enrichment real-time PCR to enumerate *Salmonella* on chicken parts. *Journal of Food Protection*, 77 (7), 1086-1092.

- Oyarzabal, O.A., Backert, S., Nagaraj, M., Miller, R.S., Hussain, S.K., Oyarzabal, E.A., 2007. Efficacy of supplemented buffered peptone water for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from broiler retail products. *The Journal of Microbiology Methods*, 69, 129-136.
- Oyarzabal, O.A., Macklin, K.S., Barbaree, J.M. And Miller, R.S., 2005. Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6), 3351-3354.
- Oyarzabal, O.A., Williams, A., Zhou, P. and Samadpour, M., 2013. Improved protocol for isolation of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat and use of pulsed field gel electrophoresis for the typing of isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 95 (1), 76-83.
- Özer, D. ve Ergün, Ö., 1999. İstanbul piyasasında satışa sunulan çeşitli kanatlı eti ve ürünlerinde *Campylobacter jejuni*'nin varlığı üzerine araştırmalar. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25 (1): 81-88.
- Özgan, E., 2015. Satışa sunulan gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* suşlarının çoklu antibiyotik dirençliliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Özmen, G. ve Kılıç, H., 2006. Gemlik Garnizonu'nda tüketime sunulan tavuk etlerinden *Listeria* spp. izolasyonu. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15 (3), 194-197.
- Pagotto, F., Daley, E., Farber, J. and Warburton, D., 2001. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. *HPB Method MFHPB-30*.
- Papić, B., Pate, M., Henigman, U., Zajc, U., Gruntar, I., Biasizzo, M. and Kušar, D., 2017. New approaches on quantification of *Campylobacter jejuni* in poultry samples: the use of digital PCR and real-time PCR against the ISO standard plate count method. *Frontiers in Microbiology*, 8, 331.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V.L. and Morita, K., 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18 (6), 407-421.
- Parolo, C., Escosura-Muniz, A. and Merkoci, A., 2013. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 412-416.
- Pavan Kumar, P., Agarwal, R. K., Thomas, P., Sailo, B., Prasannavadhana, A., Kumar, A. and Singh, D.K., 2014. Rapid detection of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium by loop mediated isothermal amplification (LAMP) test from field chicken meat samples. *Food Biotechnology*, 28 (1), 50-62.
- Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J. and Fach, P., 2004. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 409-420.
- Persson, S. and Olsen, K.E., 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 54 (11), 1043-1047.
- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N. and Nostro, A.L., 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for

- methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control, 18 (3), 196-200.
- Piknová, L., Kacálková, E., Pangallo, D., Polek, B. and Kuchta, T., 2005. Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. Current Microbiology, 50 (1), 38-42.
- Portner, D.C., Leuschner, R.G. and Murray, B.S., 2007. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. Cryobiology, 54 (3), 265-270.
- Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., Amerongen, A., 2009. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 393 (2), 569-582.
- Praakle-Amin, K., Hänninen, M.L. and Korkeala, H., 2006. Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. Journal of Food Protection, 69 (2), 436-440.
- Rahn, K., De Grandis, S.A., Clarke, R.C., McEwen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, C., and Gyles, C.L., 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Molecular and Cellular Probes, 6 (4), 271-279.
- Ravan, H. and Yazdanparast, R., 2012. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D. Analytica Chimica Acta, 733, 64-70.
- Ray, B. and Bhunia, A. (Eds.) (2008). Foodborne infections. In: Fundamental food microbiology (4th edition) (pp. 283-313). Boca Raton: CRC.
- Rivera, F.N., Bustos, B.R., Montenegro, H.S., Sandoval, M.M., Castillo, N.J., Fernández, J.H. and Quevedo, L.I., 2011. Genotyping and antibacterial resistance of *Campylobacter* spp. strains isolated in children and in free range poultry. Revista Chilena De Infectologia, 28, 555-562.
- Roberts, D. and Greenwood, M., 2008. Practical food microbiology. John Wiley and Sons.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Esteve, T., Hoorfar, J. and Pla, M., 2003. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. Journal of Microbiological Methods, 54 (3), 381-390.
- Rodríguez-Lázaro, D. and Hernández, M., 2013. Introduction to the Real-time PCR. In Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications. D. Rodriguez-Lazaro, ed. (Norfolk, UK: Caister Academic Press). ISBN: 978-1-908230-15-7.
- Rodríguez-Lázaro, D., Lombard, B., Smith, H., Rzezutka, A., D'Agostino, M., Helmuth, R. And Davison, J., 2007. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. Trends in Food Science and Technology, 18 (6), 306-319.
- Rouger, A., Tresse, O. and Zagorec, M., 2017. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. Microorganisms, 5 (3), 50.
- Roy, S. and Pericas, M.A., 2009. Functionalized nanoparticles as catalysts for enantioselective processes. Organic and Biomolecular Chemistry, 7 (13), 2669-2677.

- Ryan, M.P., O'Dwyer, J. and Adley, C.C., 2017. Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. BioMed Research International, 2017. Article ID 3782182.
- Sabike, I.I., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, S., Farid, A.S. and Yamazaki, W., 2017. Assessment of the *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler chicken ceca by conventional culture and loop-mediated isothermal amplification method. Food Control, 74, 107-111.
- Sağun, E., Sancak, Y.C., Ekici, K. ve Durmaz, H., 1996. Van'da tüketime sunulan piliç, but ve göğüs etlerinin hijyenik kalitesi üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 7 (2), 62-66.
- Saharan, P., Dhingolia, S., Khatri, P., Duhan, J.S. and Gahlawat, S.K., 2014. Loop-mediated isothermal amplification LAMP based detection of bacteria: A Review. African Journal of Biotechnology, 13 (19), 1920-1928.
- Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J.C., Harr, B.S., Morishita, T.Y. and Mohan, R., 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. Applied and Environmental Microbiology, 67 (9), 3951-3957.
- Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J.C., Harr, B.S., Morishita, T.Y. and Mohan, R., 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. Applied and Environmental Microbiology, 67 (9), 3951-3957.
- Saikia, P. and Joshi, S.R., 2010. Retail market poultry meats of North-East India—a microbiological survey for pathogenic contaminants. Research Journal of Microbiology, 5 (1), 36-43.
- Sails, A.D., Fox, A.J., Bolton, F.J., Wareing, D.R. and Greenway, D.L., 2003. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology, 69 (3), 1383-1390.
- Satin, M., 2002. Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situation and perspectives. Meat Science, 62 (3), 277-283.
- Schlech III, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A. J. and Broome, C.V., 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. New England Journal of Medicine, 308 (4), 203-206.
- Schuurman, T., De Boer, R.F., Van Zanten, E., Van Slochteren, K.R., Scheper, H.R., Dijk-Alberts, B.G. and Kooistra-Smid, A.M.D., 2007. Feasibility of a molecular screening method for detection of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in a routine community-based clinical microbiology laboratory. Journal of Clinical Microbiology, 45 (11), 3692-3700.
- Scott, E. and Bloomfield, S.F., 1990. The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. Journal of Applied Microbiology, 68 (3), 271-278.
- Shao, Y., Zhu, S., Jin, C. and Chen, F., 2011. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. International Journal of Food Microbiology, 148 (2), 75-79.

- Shar, A.H., Kazi, Y.F., Kanhar, N.A., Soomro, I.H., Zia, S.M. and Ghumro, P.B., 2010. Drinking water quality in Rohri City, Sindh, Pakistan. *African Journal of Biotechnology*, 9 (42): 7102-7107.
- Sharaf, E.M. and Sabra, M.S., 2012. Microbiological loads for some types of cooked chicken meat products at Al-Taif Governorate, KSA. *World Applied Sciences Journal*, 17 (5), 593-597.
- Silva, D.T., Tejada, T.S., Cunha, C.C., Lopes, N.A., Agostinotto, A., Collares, T. and Timm, C.D., 2014. Occurrence of *Campylobacter* in poultry, meat chicken and human feces, and *cdt* genes research. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66 (1), 297-304.
- Sofos, J.N., 2008. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science*, 78 (1-2), 3-13.
- Soli, K.W., Kas, M., Maure, T., Umezaki, M., Morita, A., Siba, P M. and Horwood, P.F., 2013. Evaluation of colorimetric detection methods for *Shigella*, *Salmonella*, and *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77 (4), 321-323.
- Sørensen, L.L., Alban, L., Nielsen, B. and Dahl, J., 2004. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 101 (2), 131-141.
- Ta, Y.T., Nguyen, T.T., To, P.B., Pham, D.X., Le, H.T.H., Thi, G.N. and Doyle, M.P., 2014. Quantification, serovars, and antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. *Journal of Food Protection*, 77 (1), 57-66.
- Tanner, N.A. and Evans, T.C., 2014. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Current protocols in molecular biology*, 15-14.
- Taylor, D.E., Tracz, D.M., 2005. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter*. Ketley JM, Konkel ME. eds. In: *Campylobacter Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, pp.193-204.
- Techathuvanan, C., Draughon, F.A. and D'Souza, D.H., 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium from pork. *Journal of Food Science*, 75 (3), 165-172.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M. and Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (1), 521-524.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. and Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3 (5), 877-882.
- Tomlinson, J. And Boonham, N., 2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources*, 3 (66), 1-7.
- Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A. and Bandler, R., 2001. Yeasts, molds and mycotoxins (Chapter 18), *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Food and Drug Administration, Gaithersburg, MD, USA, 227-234.
- Tran, T.T., 1998. A blood-free enrichment medium for growing *Campylobacter* spp. under aerobic conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (2), 145-148.

- Tunail, N., 1999. Mikrobiyel enfeksiyonlar ve intoksikasyonlar. In: Akçelik M, Aydar LY, Ayhan K, Çakır İ, Doğan HB ve ark., Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Armoni Matbaacılık Ltd Şti, 59-90, Ankara.
- Türk, H., 2012. Tavuk karkas ve parça etlerinde *Salmonella* spp. varlığının IMS tekniği ile saptanması. Doktora Tezi, Ondokuz mayıs Üniversitesi, Samsun, Türkiye.
- Ünlü, A.T., 2011. Tavuklarda *Salmonella* tanısında kültür ve real time PCR'in kullanımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., 2003. Gıda mikrobiyolojisi. 3. baskı, Meta Basım, İzmir, 47-51.
- Van Tongeren, S.P., Degener, J.E. and Harmsen, H.J.M., 2011. Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 30 (9), 1053-1061.
- Vandamme, P., Dewhirst, F.E., Paster, B. J. and On, S.L., 2000. *Campylobacteraceae*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.
- Varga, A. and James, D., 2006. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. Journal of Virological Methods, 138 (1-2), 184-190.
- Venkatesan, G., Bhanuprakash, V. and Balamurugan, V., 2015. Development and comparative evaluation of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for simple visual detection of *orf virus* in sheep and goats. Molecular and Cellular Probes, 29 (3), 193-195.
- Vondrakova, L., Pazlarova, J. and Demnerova, K., 2014. Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. Gut Pathogens, 6 (1), 12.
- Wabeck, C.J., 2002. Microbiology of poultry meat products. In Commercial Chicken Meat and Egg Production (pp. 889-898). Springer, Boston, MA.
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. and Malinowski, D.P., 1992. Strand displacement amplification-an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique. Nucleic Acids Research, 20 (7), 1691-1696.
- Waller, D.F. and Ogata, S.A., 2000. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. Applied and Environmental Microbiology, 66 (9), 4115-4118.
- Wang, L., Shi, L., Alam, M.J., Geng, Y. and Li, L., 2008. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. Food Research International, 41 (1), 69-74.
- Wang, T., Kim, S. and An, J.H., 2017. A novel CMOS image sensor system for quantitative loop-mediated isothermal amplification assays to detect food-borne pathogens. Journal of Microbiological Methods, 133, 1-7.
- Ward, L.I. and Harper, S.J., 2012. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of plant pathogens. Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols, 161-170.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques, 22 (1), 130-139.

- Wu, G.P., Chen, S.H. and Levin, R.E. 2015. Rapid real-time loop-mediated isothermal amplification combined with coated activated carbon for detection of low numbers of *Salmonella enterica* from lettuce without enrichment. *Food Control*, 56, 47-52.
- Wu, G.P., Chen, S.H. and Levin, R.E., 2015. Application of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead cells of *Salmonella enterica* by real-time loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 117, 41-48.
- Xi, C.U.I., Xiong, Q.R., Xiong, Y.H., Shan, S.H.A.N. and Wei-Hua, L.A.I., 2013. Establishing of a method combined immunomagnetic separation with colloidal gold lateral flow assay and its application in rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 41 (12), 1812-1816.
- Yamazaki, W., 2013. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using loop-mediated isothermal amplification. In *PCR Detection of Microbial Pathogens* (pp. 267-277). Humana Press, Totowa, NJ.
- Yamazaki, W., Ishibashi, M., Kawahara, R. and Inoue, K., 2008a. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology*, 8, 163.
- Yamazaki, W., Seto, K., Taguchi, M., Ishibashi, M. and Inoue, K., 2008b. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiology*, 8, 94.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Ishibashi, M., Nukina, M., Misawa, N. and Inoue, K., 2009. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Campylobacter fetus*. *Veterinary Microbiology*, 136, 393-396.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K. and Misawa, N., 2009. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (6), 1597-1603.
- Yan, M., Li, W., Zhou, Z., Peng, H., Luo, Z. and Xu, L., 2017. Direct detection of various pathogens by loop-mediated isothermal amplification assays on bacterial culture and bacterial colony. *Microbial Pathogenesis*, 102, 1-7.
- Yan, S. S., Pendrak, M. L., Foley, S. L. and Powers, J.H., 2005. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 5 (5), 285-305.
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C. and Yin, Y., 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38 (3), 265-271.
- Yazıcıoğlu, N., Kaya, K., Ayaz, K., Şen, S., Özkök, S., Aksoy, M. ve Evgin, N., 2005. Kanatlı kesimhanelerinin parçalama ünitelerinden alınan boyun ve kanat örneklerinden *Salmonella* izolasyonu, serotiplerme ve antibiyotik dirençliliğinin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 16, 23-36.

- Ye, Y., Wang, B., Huang, F., Song, Y., Yan, H., Alam, M. J. and Shi, L., 2011. Application of *in situ* loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* in foods. *Food Control*, 22 (3-4), 438-444.
- Yıldız, A. and Diker, K.S., 1992. *Campylobacter* contamination in chicken carcasses. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 16, 433-439.
- Yoshida, A., Nagashima, S., Ansai, T., Tachibana, M., Kato, H., Watari, H. and Takehara, T., 2005. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (5), 2418-2424.
- Yu, F., Ding, Y., Gao, Y., Zheng, S. and Chen, F., 2008. Fluorescence enhancement effect for the determination of DNA with calcein-cetyl trimethyl ammonium bromide system. *Analytica Chimica Acta*, 625 (2), 195-200.
- Yüksel M., Çetin B., Sert S. 2013. Erzurum'da satışa sunulan tavuk ciğer ve etlerinin mikrobiyolojik kalitesi. *Akademik Gıda/Academic Food Journal*. 11 (3-4), 58-62.
- Zanetti, F., Varoli, O., Stampi, S. and De Luca, G., 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 33 (2-3), 315-321.
- Zang, X., Tang, H., Jiao, X. and Huang, J., 2017. Can a visual loop-mediated isothermal amplification assay stand out in different detection methods when monitoring *Campylobacter jejuni* from diverse sources of samples?. *Food Control*, 75, 220-227.
- Zhang, X., Li, M., Cui, Y., Zhao, J., Cui, Z., Li, Q. and Qu, K., 2012. Electrochemical behavior of calcein and the interaction between calcein and DNA. *Electroanalysis*, 24 (9), 1878-1886.
- Zhang, X., Liao, M., Jiao, P., Luo, K., Zhang, H., Ren, T. and Cao, W., 2010. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of subgroup J *avian leukosis virus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6), 2116-2121.
- Zhang, X., Lowe, S.B. and Gooding, J.J., 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491-499.
- Zhang, Y., Shan, X., Shi, L., Lu, X., Tang, S., Wang, Y. and Yan, H., 2012. Development of a *fimY*-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Salmonella* in food. *Food Research International*, 45 (2), 1011-1015.
- Zhao, S., Mcdermott, P.F., White, D.G., Qaiyumi, S., Friedman, S.L., Abbott, J.W., Glenn, A., Ayers, S.L., Post, K.W., Fales, W.H., Wilson, R.B., Reggiard, C. and Walker, R.D., 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Veterinary Microbiology*, 123, 122-132.
- Zhong, Q., Tian, J., Wang, B. and Wang, L. 2016. PMA based real-time fluorescent LAMP for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *Food Control*, 63, 230-238.
- Zhou, P., Hussain, S.K., Liles, M.R., Arias, C.R., Backert, S., Kieninger, J. and Oyarzabal, O.A., 2011. A simplified and cost-effective enrichment protocol for the isolation of *Campylobacter* spp. from retail broiler meat without microaerobic incubation. *BMC Microbiology*, 11 (1), 175.

Zumbado-Gutiérrez, L., Arévalo-Madrigal, A., Donado-Godoy, M.D.P. and Romero-Zúñiga, J.J., 2014. Molecular diagnosis of *Campylobacter* in poultry chain intended for human consumption in Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25 (2), 357-363.



ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Peygamberler memleketi olarak bilinen, taşıyla toprağıyla mübarek, Güneydoğu Anadolu'nun mistik ve gizemli şehri Şanlıurfa'da doğdu. İlköğrenimini Gaziantep'te Mehmet Akif Ersoy İlköğretim okulunda ve Lise öğrenimini aynı ilde Arif Nihat Asya Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini 2013 yılında tamamladı.

Atatürk Üniversitesi Hınıs Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nde, 2013 yılından beri Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.