

Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda Real Time PCR Teknolojisi

Esen TUTAR¹, Elif KÖKSALAN², İsmail AKYOL^{3*}

¹KSÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Bilimleri ABD, Kahramanmaraş

²KSÜ, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Kahramanmaraş

³KSÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kahramanmaraş

Geliş (Received): 30.06.2015

Kabul (Accepted): 20.09.2015

ÖZET: Gıda kaynaklı mikrobiyal patojenler tüm dünyada hastalık, ölüm ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan önemli bir sorundur. Olumsuz etkilere yol açan gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçilebilmesi potansiyellerinin belirlenebilmesi için hastalığa neden olan mikrobiyal etkenin ve miktarının tanımlanması ve belirlenmesi gerekmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan gıda patojen mikroorganizmaların spesifik ve tekrarlanabilir bir metot ile tanımlanmaları önem arz etmektedir. Enfeksiyon dozu yaklaşık 10 bakteri hücrelerine kadar düşebilen mikrobiyal gıda patojenlerinin tespitine hassas, türe spesifik ve güvenilir bir metot gerektirmektedir. Kültürel, immünolojik ve konvansiyonel PCR metotları patojenlerin tanısında yaygın olarak kullanılmakta ancak uzun zaman alması ve miktar ile ilgili yeterli bilgi vermemesi gibi sınırlamaları bulunmaktadır. Real Time PCR teknolojisi hassasiyeti, düşük miktardaki mikroorganizmaları belirleyebilme limiti, spesifikliği ve hızı gibi özelliklerinden dolayı mikrobiyal tanımlamada güncel ve güvenilir bir yöntemdir. Bu derleme çalışmasında, Real Time PCR tekniği yaklaşımları ve gıda patojenlerinde ve diğer mikrobiyal çalışmalara uygulanma potansiyelleri detaylandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gıda kaynaklı hastalıklar, Gıda patojenleri, Real time PCR

Real time PCR Technology in Characterization of Foodborne Microbial Pathogens

ABSTRACT: Foodborne microbial pathogens are major issue that gives rise to illness, death and serious economic losses all over the world. It is necessary that microbial factors and its amount cause to disease should be well defined to prevent foodborne diseases causing negative impact and determine its potential causes. Foodborne microbial pathogens that cause the foodborne diseases must be identified by a specific and reproducible method. Identification method of foodborne microbial pathogens that have infection doses as low as about 10 bacterial cells should be sensitive, specific species and reliable. Although cultural, immunologic and conventional PCR methods widely used in identification of microbial pathogens, they have some limitations including insufficient quantitative information of the tested micro-organisms and longtime requirement. Real time PCR technology is an up-to-date and reliable method in microbial identification due to its accuracy, specificity, low detection limit and rapidity. In this review, real time PCR approaches and application potentials in foodborne microbial pathogens and other microbial researches are emphasized.

Key Words: Foodborne diseases, Foodborne microbial pathogens, Real Time PCR

GİRİŞ

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar patojen mikroorganizmalar tarafından kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu ortaya çıkan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hastalık, ölüm ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan gıda kaynaklı patojenler gıdaların üretimden tüketime kadar uygulanan işlemlerin herhangi bir aşamasında gıdalara bulaşarak insanlarda hastalığa sebep olmaktadır. Kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu, patojen veya toksinleri sindirim sisteminde bir bariyer görevi gören bağırsaklardaki epitel hücrelerinden geçerek, genellikle gıdanın tüketilmesinden 6-7 saat sonra ishal, bulantı, kusma gibi klinik belirtiler göstermektedir. Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar genellikle bitki veya hayvan orjinli olup en çok bebekler, çocuklar, yaşlılar ve hastalar gibi bağışıklık sistemi zayıf bireylerde görülmekle beraber az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde daha sık rastlanmaktadır. Gıda kaynaklı

hastalıkların son dönemlerde bir ivme kazandığı ve buna neden olarak ise gıda endüstrisinin globalleşmesi, insanların yaşam ve yeme alışkanlıklarının değişmesi, çevresel kirlilik, uluslararası seyahat, iklim değişiklikleri ve mikroorganizma popülasyonlarındaki değişimler gibi faktörlerin etken olduğu düşünülmektedir (Velusamy ve ark., 2012).

Hastalık etmeni olan mikroorganizmalarda gıdalara enfeksiyon, toksikasyon ve toksienfeksiyon olarak bilinen üç farklı yolla bulaşmaktadır. Bu bulaşma yollarında hastalık ajanı ya patojen mikroorganizmanın kendisi ya da ürettiği toksinlerdir (Bhunja, 2008; Aytac ve ark., 2014). *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 gibi patojen bakteriler gıdalara bulaşarak gıdanın tüketilmesi ile canlı vücuduna girmekte ve canlı vücudunda varlığı veya ürettiği metabolizma ürünleri ile enfeksiyon oluşturmaktadır. *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* ve *Staphylococcus aureus* gibi

*Sorumlu Yazar: Akyol, İ., ismailakyol@ksu.edu.tr

bakteriler ise ürettikleri toksinleri içeren gıdaların canlı vücuduna alınması sonucu hastalığa neden olmaktadır (Velusamy ve ark., 2012). Toksik enfeksiyonda ise gıdalar aracılığı ile vücuda alınan *Clostridium perfringens* gibi canlı patojen mikroorganizmaların tüketilmesi ve daha sonra bu mikroorganizmaların vücutta sporlanma, kolonizasyon ve toksin üretmesi ile oluşmaktadır (Aytac ve ark., 2014). Patojen mikroorganizmaların hastalık oluşturabilmesi için gıdalara bulaşması ile birlikte belirli bir sayıda olması gerekmektedir. Enfeksiyon dozu olarak bilinen bu değer patojenden patojene farklılık gösterdiği gibi bireyden bireye de farklılık gösterebilmektedir. *Salmonella* gibi bazı patojenler yüksek enfeksiyon dozunda hastalık oluşturabilirken *E. coli* O157:H7 patojeni gibi bazı patojenler ise düşük bir enfeksiyon dozundabile hastalık oluşturabilmektedir (Bhunja, 2008).

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklarının sınırlamada en önemli adım hastalık etkeni olan gıda kaynaklı mikroorganizmaların tür olarak doğru tanımlanması ve mikrobiyal popülasyonlardaki, düşük miktarlarının bile doğru belirlenmesidir. Enfeksiyon dozu yaklaşık 10 bakteri hücresine kadar düşebilen bu mikroorganizmaların doğru, güncel ve tekrarlanabilir metotlar ile tanımlanmalıdır. Patojen mikroorganizmaları tanımlamada kullanılan metotları kültür ve koloni bazlı metotlar, immünolojik metotlar ve moleküler metotlar olarak listelemek mümkündür. Kültür ve koloni bazlı metotlarımızın zaman alması, bakterilerin her zaman aynı fenotipik özellikleri göstermemesi, fenotipik özelliklere bakılarak tanımlamada ve sınıflandırmada ortaya çıkan zorluklar gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Malorny ve ark., 2003). İmmünolojik metotlar ise kontaminasyon riskinin fazla olması, düşük miktarlardaki patojenleri tespit edememesi ve antijen-antikor ilişkisinde ortaya çıkabilecek zorluklar nedeniyle tanımlamada dezavantajları vardır (Velusamy ve ark., 2010; Jasson ve ark., 2010). Moleküler metotlar, bu metotlara alternatif olarak geliştirilmiş DNA esaslı metotlar olup diğer metotlara göre hızlı, güvenilir, hassas, özgül ve tekrarlanabilir metotlar olarak gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların teşhisinde kullanılmaktadır. Bu metotlar bakteriyel sınıflandırmada özellikle de fenotipik açıdan atipik bakteri suşlarının tanımlanmasında son derece güvenilirdir.

MİKROBİYAL TEŞHİSTE YAYGIN KULLANILAN MOLEKÜLER TEKNİKLER

Moleküler teknikler gıdalarda hastalık etkeni olan mikroorganizmaların taksonomik seviyede teşhis etmek ve mikrobiyal yüklerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin hibridasyonuna dayalı olan bu metotlar içinde en çok uygulanan teknik ise yüksek duyarlılığı ve çok yönlülüğü ile PCR tekniğidir. PCR temel olarak DNA üzerinde belirlenen hedef bölgenin o bölgeye özgü primerler ile çok sayıda kopyasının oluşturulduğu bir

reaksiyondur. PCR sonrası ürünlerin varlığı elektroforez tekniği ve genellikle floresans bir boya olan etidyum bromür ile boyanmış DNA'nın görüntülenmesi sonucu tespit edilebilmektedir. Elektroforez tekniğinde kullanılan DNA belirteçleri ile de yarı kantitatif sonuç alınabilmektedir. Ayrıca bir sonraki adım olarak nükleotid dizileme teknolojinin uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Böylelikle genom ile ilgili daha çok ve daha güvenilir bilgi elde edilebilmektedir.

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklara neden olan patojenlerin PCR ile tanımlanmasında saf kültürler veya ön zenginleştirme ya da seçici besiyerinde geliştirilen gıda örnekleri kullanılmaktadır. PCR tekniğinde saf kültürler kullanıldığında kontaminasyon riski düşükken ön zenginleştirme besiyerinden alınan örneklerin analizinde kontaminasyon riski daha yüksek olmaktadır. Santrifüjleme, filtrasyon ve yıkama aşamaları gibi basit bir örnek hazırlama yöntemi kontaminasyonları elemine etmek için yararlı olabilmektedir. Bununla birlikte gıda örneklerinden saf bir DNA elde etmek için örneklerin seyreltilmesi ve daha sonra mikroorganizmanın uygun koşullarda büyütülmesi gibi önlemler uygulanabilmektedir. Böylece sadece canlı hücreler kopyalanmakta, düşük sayıdaki mikroorganizmaların seviyesi artmakta ve gıda matriksinden kaynaklı inhibitörler elemine edilebilmektedir (Hill ve ark., 1996). Örneklerde bulunan ölü ve canlı hücreler örnek hazırlama aşamasında etidyum monoazit ve propidyum monoazit gibi bileşikler kullanılarak da elemine edilebilmekte ve yanlış pozitif sonuçlar engellenebilmektedir (He ve ark., 2010). PCR kültürel bazlı metotların son aşaması veya doğrulanması olarak kabul edilebilir ve zaman olarak da daha kısa sürede sonuç elde edilebilmektedir. Gıda kaynaklı patojenlerin PCR bazlı metotlar ile tanımlanabilmesi için hedef gen bölgesinin seçimi önem taşımaktadır. Genellikle 16S rRNA geni mikroorganizmaların tanımlanmasında hedef gen bölgesi olarak kullanılmaktadır. Yüksek derecede korunmuş olması, bütün bakterilerde çok sayıda kopyasının bulunması ve farklı bakteriler arasında önemli ölçüde dizi çeşitliliği ile 9 hiper değişken bölge içermesi (V1-V9) gibi özellikleri hedef gen bölgesi olmasının nedenlerindedir (Beneduce ve ark., 2007). 16S rRNA gen bölgesi cins ve tür seviyesinde ayırım yapabilmek için hedef gen bölgesi olarak kullanılabilen ama değişken gen bölgelerinin yüksek derecede benzerlik göstermesi nedeniyle bazı bakterilerin suş ve serotiplerini ayırmak için yeterli olmamaktadır. Tür altı seviyede ayırım yapabilmek için kullanılan hedef gen bölgesi ise intergenik RNA boşluk bölgeleri olarak seçilmiştir. Bu protein kodlamayan bölgeler evrim sürecinde daha az baskıya maruz kaldıklarından dolayı değişkenlik göstermekte ve tür altı seviyede sınıflandırma yapabileme imkanı sunmaktadır (Rijpens ve ark., 2002).

PCR tekniğinin gelişmesi ile Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcriptase PCR; RT-PCR), PCR Ürününün Endonükleaz ile Kesilmesi (PCR-RFLP), Çoğaltılan

PCR Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) ve Çoklu PCR (Multipleks PCR) gibi farklı PCR temelliteknicler geliştirilmiştir. Tüm PCR bazlı teknikler PCR'ın modifiye edilmesi ile oluşturulmuş, PCR'ın dezavantajlarını ortadan kaldırmak, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında hassasiyeti ve özgüllüğü artırmak amacıyla oluşturulmuş metotlardır. Birçok araştırmacı bu teknikleri kullanarak gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklara etken mikroorganizmaları tanımlamışlardır (Wiedmann ve ark., 1992; Lindqvist, 1999; Ripabelli ve ark., 2000; Yaron ve Matthews, 2002; Bottero ve ark., 2004; Pinto ve ark., 2005; Rodriguez-Palacios ve ark., 2006; Beneduce ve ark., 2007; Cawthorn ve ark., 2008). PCR teknolojisi gıda kaynaklı mikrobiyal patojenleri tanımlamada önemli bir araç olmasına rağmen bazı sınırlamalara sahiptir. PCR' da kullanılan primerlerin kendi içlerinde ya da birbirleri arasında yanlış eşleşmeler oluşturması yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca PCR ürünleri görüntülemek için etidyum bromür ile boya işlemi hem kontaminasyonsebebi hem de emek isteyen bir uygulamadır (Fratamico ve ark., 2008). Ama bunlarla beraber PCR tekniği miktar ile ilgili tam anlamıyla bilgi vermemekte ve istenilen bilgiyi sağlamamaktadır.

REAL TIME PCR

Real Time PCR teknolojisi ilk olarak Higuchi ve arkadaşlarının her bir amplifikasyon ürününü etidyum bromür ile görüntülemek için oluşturdukları sistem ile ortaya çıkmıştır (Higuchi ve ark.,1992). Bu teknoloji floresan işaretli ya da boyalı PCR ürünlerinin, ışık kaynağının oluşturduğu ışınlar ile uyarılması sonucu ışımaya yayması ve yaydığı ışınların algılanarak izlenebilir hale getirilmesi ile oluşan bir sistemdir. PCR'ın kinetik kazanması ile oluşan bu teknolojinin PCR'dan en önemli farkı hedef bölgenin lineer olarak logaritmik artışının eş zamanlı olarak gözlenebilmesi ve buna bağlı olarak kantitatif analiz yapabilme imkanı sunmasıdır.

Real time PCR cihazı temel olarak ısı döngü cihazı, eksitasyon ışık kaynağı, bir floresan algılama sistemi ve yazılımdan oluşmaktadır. Eksitasyon ışık kaynağı argon-iyon lazerler, ışık yayan diyot lazerler (LED), halojen lambalar ve ksenon lambalar olarak dört farklı çeşit olmakla birlikte en çok kullanılan ışık kaynağı lazerlerden ziyade halojen ve ksenon lambalardır (Valasek ve ark., 2005; Shipley, 2007). Lambalar LED ve lazerlere göre daha geniş spektrumlu olarak tanımlanmıştır (Valasek ve ark., 2005). Floresan algılama sistemi işaretlenmiş PCR ürünlerinin oluşturduğu floresan ışınları algılamakta ve bilgisayardaki yazılım ise bu verileri kaydetmektedir. Yüklenme-iliştirilmiş araç (CCD kamera), fotomultiplikator tüpleri veya fotodedektörlerin diğer türlerini içeren bu sistem belirli sayılarda kanal içererek dalga boylarını sınırlayıp sadece tercih edilen dalga

boylarının ölçülmesine izin vermektedir (Valasek ve ark., 2005). Yazılım verileri grafik olarak eş zamanlı görüntülemekte hem kantitatif hem de kantitatif analiz için floresan şiddetini sayısal değerlere dönüştürmektedir (Hanna ve ark., 2005).

Bu teknolojiye floresan moleküllerin ışık kaynağından aynalar aracılığı ile üzerine gelen belirli dalga boyundaki ışınları absorbe ederek enerji kazanıp, buldukları temel düzeyden uyarılmış düzeye geçmektedirler. Uyarılmış bu moleküller kararsız haldeki bu durumdan temel düzeye geçme eğiliminde oldukları için fazla enerjilerini farklı dalga boylarındaışınmalar halinde yaymaktadır. Böylelikle floresan moleküllerin hem uyarıldıkları hem de yayıldıkları iki farklı dalga boyu aralıklarındaki ışınlar floresan algılama sistemi tarafından belirlenmektedir (Shipley, 2007; Navarro ve ark.,2015). Real time PCR teknolojisinde kullanılan bu moleküllerin her birine özgü tanımlanmış farklı uyarılma ve yayılma dalga boyu aralıklarına sahiptir (Shipley, 2007).

Günümüzdeki Real time PCR cihazlarında floresan sinyaller farklı kanallar aracılığıyla floresan algılama sistemine iletilmektedir. Kanal sayısı özellikle çoklu PCR çalışmalarında farklı bölgeleri tanımlamak için önem taşımaktadır (Navarro ve ark.,2015). Real Time PCR teknolojisinde kalıp DNA'nın amplifikasyonu doğrusal zemin faz, erken üssel faz, üssel faz ve düz faz olarak 4 farklı fazda oluşmakta ve eş zamanlı izlenebilmektedir. Doğrusal zemin fazda PCR henüz başlamış ve floresan yayılmada artış gözlenmemektedir. Temel çizgi (baseline) hesaplaması bu aşamada yapılmaktadır. Erken üssel fazda floresan miktarı eşik değerine (treshold) ulaşmıştır. Eşik değerine denk gelen döngü sayısı eşik değeri döngüsü (Ct) olarak bilinmektedir. Bu döngü değeri ABI literatürlerinde Ct olarak, LightCycler literatürlerinde ise geçiş noktası (Cp) olarak tanımlanmakta ve hedef bölgenin kopyalanmaya başladığını gösteren bir ifade olup analiz sonuçlarını hesaplamada kriter olarak kullanılmaktadır (Wong ve ark., 2005). Eşik değeri döngüsü hedef kopya sayısı ile ters orantılıdır ve kopya sayısı ne kadar fazla ise Ct değeri o kadar küçük olmaktadır (Schmittgen ve ark., 2008). Ct değeri bu nedenle kantitatif analizde önemli bir parametre özelliği taşımaktadır. Üssel faz aşamasında her döngü sonunda PCR ürünü ikiye katlanarak optimal amplifikasyon periyoduna ulaşmaktadır. Son olarak ise düz faz aşamasında reaksiyon bileşenleri sınırlı hale gelmiştir ve floresan yoğunluğu analiz verilerini hesaplamak için yeterli olmamaktadır (Wong ve ark., 2005).

Real Time PCR'da Kullanılan Belirleme Teknolojileri

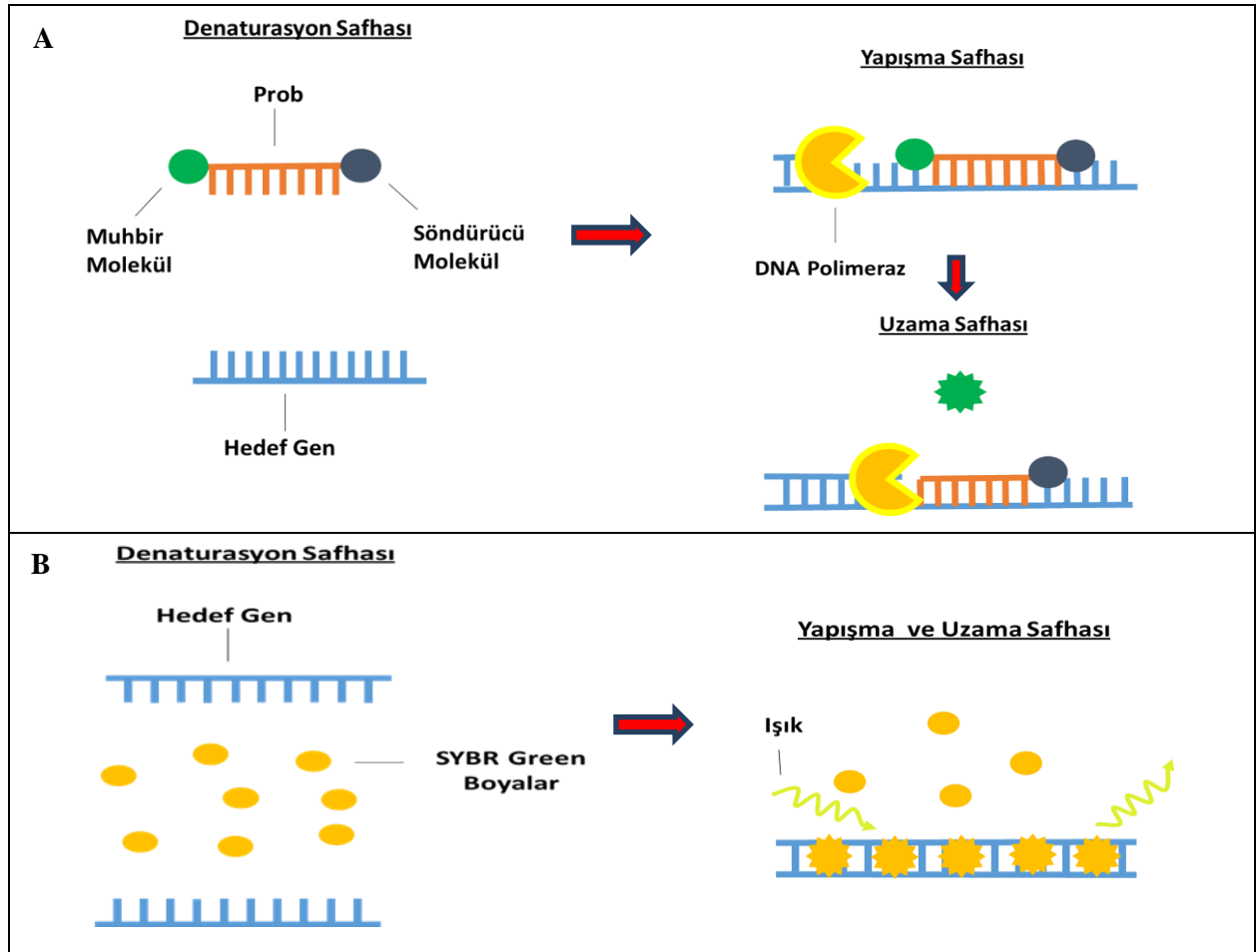
Real Time PCR teknolojisinde esas olarak floresan sinyali oluşturan floresan işaretli moleküller kullanılmaktadır. Bu moleküller hedef diziyeye özgü işaretli oligonükleotitler ve hedef diziyeye özgü olmayan boyalar olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Floresan

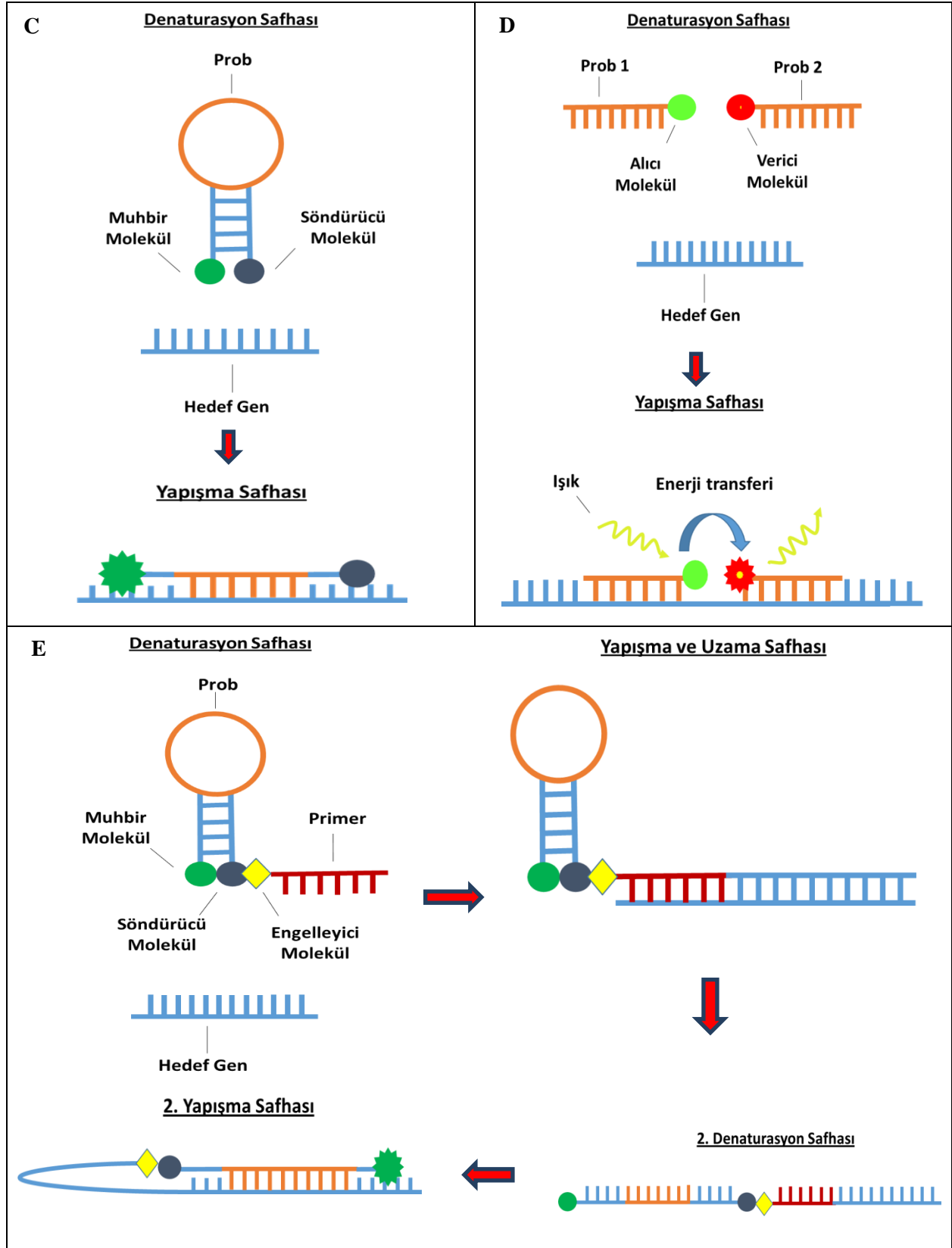
sinyali oluşturan nükleik asit boyaları, taqman propları, moleküler boncuk, akrep primerleri gibi farklı teknolojiler bulunmaktadır (Şekil 1). SYBR Green ve Taqman teknolojisi diğerlerine kıyasla birçok alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

SYBR Green Teknolojisi

Nükleik asit boyaları, analiz sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan sinyal oluşturmaktadır. DNA'ya bağlanan bu boyalar arasında SYTO boyalar, EvaGreen ve SYBR Green yer almakla birlikte SYBR Green yaygın kullanılmaktadır. SYBR Green (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-

phenylquinolinium) bir asimetrik siyanin boya olup çift zincirli DNA'nın küçük oluşuna bağlanmaktadır. Ayrıca analiz sırasında, her döngünün uzama safhasında eş zamanlı olarak ölçülebilmektedir. Bu boya bazlı algılama teknolojisi hedef diziye özgü olmadığından dolayı primer dimer oluşturabilmekte veya yanlış eşleşmiş PCR ürünlerine bağlanabilmektedir ve böylece yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Erime Eğrisi (Melting curve) analizi bu yanlış pozitif sonuçları belirlemek için geliştirilmiş bir uygulamadır. Bu uygulamada PCR sonrası oluşan tüm çift zincirli DNA'lara sıcaklık uygulanarak erime noktaları belirlenmektedir.





Şekil 1. Real Time PCR’da kullanılan belirleme teknolojilerinin çalışma mekanizmalarının şematik sunumu.
(A) Taqman Teknolojisi; Muhbir ve söndürücü molekülleri içeren prob hedef diziye bağlandıktan sonra DNA polimeraz enziminin aktivitesi ile muhbir molekül serbest kalarak floresan ışığa yaymaktadır.
(B) SYBR Green Teknolojisi; SYBR Green boyalar çift zincirli DNA’ya bağlanarak floresan ışığa yaymaktadır.

(C) Moleküler Boncuk Teknolojisi; Moleküler boncuk eşleniği olan diziye bağlandığında muhbir molekül floresan ışımaya yaymaktadır.

(D) FRET Teknolojisi; Alıcı ve verici prob hedef diziye bağlandıktan sonra ışığı absorbe eden alıcı prob ikinci probu uyarmakta ve üçüncü bir dalga boyunda floresan ışımaya yayılmaktadır.

(E) Akrep Primerleri Teknolojisi; Primer bağlandıktan sonra uzama safhasında prob hedef diziye bağlanmaktadır. Böylelikle muhbir ve baskılayıcı molekül birbirinden ayrılarak floresan ışımaya oluşmaktadır.

Daha uzun ve G/C oranı daha fazla olan DNA'ların erime noktaları daha yüksek olmasından dolayı primer dimer ve yanlış eşleşmiş DNA'lar belirlenebilmektedir (Buh Gašparič ve ark., 2010, Eischeid, 2011). SYBR Green teknolojisinin daha az maliyetli olması, daha güçlü floresan sinyal oluşturması avantajları arasında yer alırken dar dinamik aralığa sahip olması, PCR reaksiyonlarında yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etkisi ve daha düşük tekrarüretilebilirlik göstermesi gibi sınırlamaları da bulunmaktadır. Bununla birlikte erime eğrisi analizlerinin yorumlanması da her zaman kolay olmamaktadır (Giglio ve ark., 2003, Eischeid, 2011). Son zamanlarda SYBR Green boyalara alternatif olarak Eva Green boyalar geliştirilmiştir. Üçüncü nesil boya olarak tanımlanan bu boyalar SYBR Green boyalardan daha stabil, daha hassas, daha az inhibitör etkisi sunmakta ve erime eğrisi analizlerine daha uygun olması ile daha çok tercih edilmektedir (Wang ve ark., 2006).

Taqman Teknolojisi

1991 yılında tanımlanan Taqman prob teknolojisi (Holland ve ark., 1991) hedef diziye özgü belirleme teknolojilerinden biri olup primere yakın bir dizinin komplementerine 20-30 nükleotit (nt) uzunluğunda floresan özellik tanımlanmış oligonükleotitlerdir. DNA polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesinden dolayı hidroliz prob olarak da bilinmektedir. Bu teknolojiye floresan işaretli moleküller belirlenen oligonükleotitlere bağlanmakta ve tepkime sırasında oluşturdukları ışımalar ile algılanmaktadır.

Probların 5' ucunda muhbir olarak adlandırılan floresan boyalı bir molekül, 3' ucunda ise 5' ucundaki molekülün floresan ışımaya yaymasını baskılayan, söndürücü olarak adlandırılan floresan özellikli bir molekül bulunmaktadır. PCR'da probun kendi komplement bölgesine bağlanması ile DNA polimeraz 5' ekzonükleaz aktivitesini göstererek probu kırmaktadır. Dolayısı ile 3' ucundaki baskılayıcı molekülden uzaklaşan floresan işaretli 5' floresan molekülü ışımaya yaparak sinyal oluşturmaktadır (McKillop ve Drake, 2004; Espy ve ark., 2006). Bununla beraber söndürücü olarak kullanılan moleküller her zaman belirlenebilir aralıkta floresan özellik taşımayabilir.

DABSYL (4-(dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonil chloride) veya BHQs (black hole quenchers) gibi söndürücü moleküller muhbir floroforları baskılayıp floroforun yaydığı ışımaya absorblamakta ama kendisi floresan ışımaya yayma özelliği göstermemektedir. İdeal bir söndürücü moleküle aranan özellik söndürücünün absorpsiyon

spektrumunun floroforun yayılma spektrumu ile örtüşmesidir. Bununla beraber söndürücü molekül en iyi absorpsiyon özelliğini maksimum absorpsiyona en yakın olduğu durumlarda göstermektedir. SYBR Green teknoloji ile karşılaştırıldığında Taqman prob teknolojisi daha pahalı ve hedef bölgeye özgü olduğundan daha hassas bir metottür (Espy ve ark., 2006).

Moleküler Boncuk Teknolojisi

Bu moleküler teknolojiye kullanılan problemler 25-30 nt uzunluğunda, tek zincirli oligonükleotitlerdir ve nt dizisinin 5' ve 3' ucu yaklaşık 5-8 nt birbirinin prob üzerinde eşleniği olmakla birlikte probun orta kısmındaki dizi ise hedef DNA dizinin eşleniğidir. Saç tokası şeklindeki bu yapı Taqman prob gibi 5' ucunda floresan ışımaya yapan bir muhbir molekül 3' ucunda ise bu ışımaya baskılayan söndürücü bir molekül bulundurmaktadır. 5' ve 3' uçların birbirinin eşleniği olması 5' ucundaki molekülün ışımalarını engellemektedir. Moleküler boncuk probu kendine özgü DNA dizisine yapıştığında saç tokası şekli açılarak tek zincirli hale gelmekte ve 5' ucundaki muhbir floresan ışımaya yayılmaktadır. Sonuçta yayılan floresan ışımaya kalitatif ve kantitatif analiz yapılabilmektedir. DNA amplifikasyonu sırasında moleküler boncukların yapısı bozulmadığından dolayı aynı prob her döngüde tekrar hedef diziye bağlanabilmektedir (Arya ve ark., 2005; Tyagi ve ark., 2012). Bu teknolojiye moleküler boncuklar tek bir nükleotid farklılığında bile hedef DNA dizisine bağlanmayabilir. Hem avantaj hem de dezavantaj olarak kabul edilebilen bu özelliği ile SYBR Green ve Taqman prob teknolojilerinden daha hassas bir teknolojidir ve özellikle nokta mutasyonu çalışmalarında tercih edilmektedir (Abravaya ve ark., 2003).

FRET Teknolojisi

Light Cycler olarak da bilinen Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) problemleri da diziye özgü prob teknolojileri arasında yer almaktadır. Light Cycler cihazlarında kullanılan bu teknolojiye problemler hibridisasyon problemleri olarak da adlandırılmaktadır. FRET teknolojisinde hedef diziye özgü ve birbirlerine yakın olan iki prob tasarlanmış ve bir probun (verici prob) 3' ucunda floresan boya (genellikle FAM) diğer probun (alıcı prob) 5' ucunda ise başka bir floresan boya (genellikle siyanin boyalar, Cy3 ve Cy5 gibi) bulunmaktadır (Wilhelm ve ark., 2003). Problemler hedef dizilere bağlandıklarında 3' boyanın floresan ışımaya yayılması 5' ucundaki boya tarafından baskılanmaktadır. İkinci probun uyarılması ile üçüncü bir dalga boyunda ışımaya

yayılmakta ve bu ışımaya ile floresan algılamaya gerçekleşmektedir. Bu teknoloji iki prob kullanıldığından hassas bir teknoloji olmakla birlikte özellikle mutasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Moleküler boncuk problemlerinde olduğu gibi FRET problemlerinde kararlı bir yapıya sahip olup, PCR döngülerinde tekrar tekrar hedef diziyeye bağlanabilmektedirler (Espy ve ark., 2006).

Akrep (Scorpien) Primer Teknolojisi

Akrep (Scorpien) primer teknolojisine; tek bir molekülde hem primer hem de probdan oluşan boncuk teknolojisine benzersaç tokası şeklinde geliştirilmiştir (Whitcombe ve ark., 1999). Yapısal olarak sırasıyla 5' ucunda muhbir bir florofor, probun 5' sap kısmı, ilmek bölgesi, 3' sap kısmı, 3' ucunda söndürücü bir florofor, engelleyici molekül (genellikle heksilen glikol) ve primer bulunmaktadır. 5' ve 3' ucu birbirinin tamamlayıcı olup ilmek bölgesi ise hedef diziyi tamamlayıcı özeliği taşımaktadır (Arya ve ark., 2005). Akrep primer teknolojisinde primer bağlandıktan sonra uzama safhasında prob hedef diziyeye bağlanmaktadır. Böylelikle muhbir ve baskılayıcı molekül birbirinden ayrılarak floresan ışımaya oluşmaktadır. Akrep primerlerde önemli noktalardan biri primer ve saç tokası yapısı arasında bulunan PCR engelleyici bir heksilen glikol grup içermesidir. Bu engelleyici molekülün görevi akrep primerlerin saç tokası dizisinin uzamasını engellemektir (Kaltenboeck ve ark., 2005). Akrep primerleri hem primer hem saç tokası şeklinde prob içermelerinden dolayı daha hassas ve daha etkili analiz imkanı sunmaktadırlar. Genellikle de mutasyon çalışmalarında kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005).

Real Time PCR'da Kantitatif Analiz

Real time PCR'da kantitatif analizlerde genellikle mutlak (absolute) kantitasyon ve bağıl (relative) kantitasyon olmak üzere iki metot kullanılmaktadır (Arya ve ark., 2005). Mutlak kantitasyonda bir kalibrasyon eğrisi oluşturularak miktar tayini yapılabilmektedir. Kalibrasyon eğrisini oluşturan standartlar miktarı bilinen ve seyreltilerek farklı konsantrasyonlar oluşturulan PCR ürünleri, DNA molekülleri, RNA molekülleri, rekombinant plazmid DNA'sı veya ticari olarak sentezlenmiş oligonükleotitler olabilir (Pfaffl ve ark., 2001; Rasmussen 2001; Muska ve ark., 2007). Farklı konsantrasyondaki standartlar Real Time PCR cihazında analiz edilerek yazılım yardımı ile kalibrasyon eğrisi çizilmektedir. Kalibrasyon eğrisinin doğruluğu ve hassasiyeti standart olarak kullanılan referanslara bağlı olmaktadır. Bilinmeyen numunenin miktarı ise kalibrasyon eğrisine göre yazılım tarafından hesaplanmaktadır. Kalibrasyon eğrisini oluşturan referans moleküller dış standart olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte analizlerin doğruluğunu test etmek ve yanlış pozitif sonuçları engellemek amaçlı iç standartlarda (internal kontrol)

kullanılmaktadır. Aynı reaksiyonda, aynı primerler ile kopyalanabilen iç standartlar korunmuş genler gibi canlıda doğal olarak bulunan dizilimlerdir (Selvey ve ark., 2001).

Bağıl kantitasyon (relative) veya karşılaştırmalı (comparative) kantitasyon ise genellikle gen ifade analizlerinde kullanılmaktadır. Bu metotta mutlak kantitasyonda olduğu gibi kalibrasyon eğrisi ve miktarı bilenen referans bir moleküle ihtiyaç duyulmamaktadır (Arya ve ark., 2005; Pfaffl, 2007). Bağıl kantitasyon analizlerinde referans kontrol veya kalibratörlerin ifade seviyeleri hedef genin ifade seviyesi ile karşılaştırılarak kantitatif analiz yapılmaktadır. Kalibratörler olarak tedavi görmemiş örnek, zaman noktası olarak başlangıç veya normal dokudan elde edilen RNA kullanılabilmekte ve dizisi bilinen herhangi bir transkript ise referans kontrol olabilmektedir (Pfaffl, 2007). Genellikle referans kontrol olarak korunmuş genler kullanılmaktadır. Bunlar hedef gen ile aynı tüpün içinde veya ayrı bir tüpte analiz edilebilmektedir. Korunmuş genler beta aktin, gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz, glikolitik enzim veya ribozomal RNA gibi genler olabilir. (Huggett ve ark., 2006).

GIDA KAYNAKLI MİKROBİYAL PATOJENLERİN TANIMLANMASINDA REAL TIME PCR UYGULAMALARI

Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklara neden olan ajanların doğru, erken ve hızlı tanımlanması, enfeksiyona yakalanmış hastaların tedavi sürecinde en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Kültürel, immünojenik ve PCR bazlı konvansiyonel metotlar Real Time PCR teknolojisine kıyasla istenilen hassasiyeti ve hızı sağlamamakla birlikte en önemlisi miktar ile ilgili yeterli bilgi sunmamaktadır. Real time PCR hassasiyeti, geniş bir dinamik aralığa sahip olması, özgüllüğü, hızı, kapalı bir sistem olması, PCR sonra uygulamalara gerek duyulmaması, kantitatif analiz imkanı sunması gibi avantajlarından dolayı konvansiyonel metotların birçok sınırlamalarını ortadan kaldırmıştır. Real time PCR teknolojisi sahip olduğu avantajlar ile birçok alanda kendine önemli bir yer edinmiş ve birçok gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında ve kantitatif analizinde kullanılmıştır (Bhagwat, 2003; Hadjinicolaou ve ark., 2009; Oliveira ve ark., 2010; Fukushima ve ark., 2010; Chen ve ark., 2010; Cheng ve ark., 2012; Jin ve ark., 2012; Elizaquível ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Barbau-Piednoir ve ark., 2012). Farklı gıdalarda, bazı mikrobiyal patojenlerin tanımlanmasında kullanılan gen bölgeleri, Real Time PCR teknolojileri ve belirleme limitleri Tablo 1'de verilmiştir.

Real Time PCR teknolojisinde mikrobiyal gıda patojenlerini tanımlamada örnek hazırlama yöntemleri bir önem taşımaktadır. Gıda örneklerinin çok fazla homojen olmaması ve hedef organizmaların sayısının az olması gibi zorluklar analiz öncesi zenginleştirme işlemi uygulanarak veya hedef

organizmanın yoğunluğunu artırarak elemine edilebilmektedir (Hanna ve ark., 2005; Fratamico, 2008). Bu teknolojiye kısa bir zenginleştirme uygulanarak bir kob/gr' a kadar belirleme limiti düşebilmekte ve özellikle gıdalarda bulunan *E. coli*

O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* gibi sıfır toleransa sahip bakterileri belirlemede bile yüksek bir hassasiyet sunabilmektedir (Hanna ve ark., 2005).

Tablo 1. Farklı gıdalarda, bazı mikrobiyal patojenlerin tanımlanmasında kullanılan gen bölgeleri, Real Time PCR teknolojileri ve belirleme limitleri

Mikroorganizma	Gıda Örneği	Enfeksiyon Dozu	Hedef Gen	Real Time PCR Teknolojisi	Belirleme Limiti	Kaynaklar
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Balık, Su	10 ¹⁰ kob/gr	<i>16S rRNA aerolysin ast</i>	Taqman SYBR Green	1 kob /10 mL	Griffin ve ark., 2013 Trakhna ve ark., 2008 Trakhna ve ark., 2013
<i>Bacillus cereus</i>	Sebze, Yumurta Hamburger, Çiğ Süt, Krema	10 ⁵ -10 ⁹ kob/gr	<i>16S rRNA gyrB ces</i>	SYBR Green Taqman	10 ⁴ -10 ⁵ kob/ gr 1.91x10 ³ kob/mL	Dzieciol ve ark., 2013 Ueda ve ark., 2013
<i>Campylobacter jejuni</i>	Tavuk	10 ² -10 ⁴ kob/gr	<i>16S rRNA hipO ccoN</i>	Taqman Hibridizasyon	10 ¹ -10 ⁴ kob/ mL 3x10 ³ kob/mL >10 kob/mL	Hong ve ark., 2007 Toplak ve ark., 2011 Wolffs ve ark., 2007
<i>Clostridium perfringens</i>	Su, Et, Sebze	10 ⁷ -10 ⁹ kob/gr	<i>plc cpa</i>	Taqman	10 ² kob/mL	Shannon ve ark., 2007 Chon ve ark., 2012
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Bebek Maması	10 ³ kob/gr	<i>mms operon G operon IA operon</i>	Taqman SYBR Green	1.2x10 ³ kob/mL 10 ³ kob/mL 1.8x10 ¹ kob/mL	Hyeon ve ark., 2010 Li ve ark., 2006 Wang ve ark., 2012
<i>E coli</i> O157:H7	Peynir, Et, Yoğurt, Süt ve Süt Ürünleri	10 ¹ -10 ² kob/gr	<i>stx1 stx2 eae rfbE</i>	Multiplex RT-PCR Taqman LNA prob Akrep primerleri	0.2 kob/gr 2.5 x10 ³ kob / mL 1 kob/ 25 mL 10 ³ kob/mL	Köppel ve ark., 2013 Omiccioli ve ark., 2009 Sharma ve ark., 2000 Singh ve ark., 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bebek Maması	10 ⁸ kob/gr	<i>phoE</i>	Taqman SYBR Green	1 kob/25 gr	Shannon ve ark., 2007 Sun ve ark., 2010

Tablo 1. Devamı

Mikroorganizma	Gıda Örneği	Enfeksiyon Dozu	Hedef Gen	Real Time PCR Teknolojisi	Belirleme Limiti	Kaynaklar
<i>Listeria monocytogenes</i>	İşlenmiş Gıda Örnekleri, Peynir, Yoğurt, Et, Süt	10 ² -10 ³ kob/gr	<i>hlyA</i> <i>hlyQ</i> <i>ssrA</i>	Multiplex RT-PCR Taqman FRET LNA prob	<10 kob/mL 1 kob/gr 1-5 kob/25 gr 1 kob/ 25 mL	Garrido ve ark., 2012 Köppel ve ark., 2013 O'Grady ve ark., 2008 Omiccioli ve ark., 2009
<i>Salmonella enterica</i>	İşlenmiş Gıda Örnekleri, Peynir, Yoğurt, Et, Kümes Hayvanları, Yumurta	10 ⁰ -10 ⁹ kob /gr	<i>invA</i> <i>ttr</i>	Multiplex RT-PCR Taqman SYBR Green	<10 kob/mL 0,05 kob/gr 10 ⁰ -10 ¹ kob/25 gr 10 ³ kob/mL	Cheng ve ark., 2012 Delibato ve ark., 2011 Garrido ve ark., 2012 Hyeon ve ark., 2010 Köppel ve ark., 2013 Malorny ve ark., 2004
<i>Staphylococcus aureus</i>	Süt Et, Peynir, Krema, Sebze	10 ⁵ -10 ⁸ kob/gr	<i>nuc</i> <i>htrA</i> <i>oriC</i>	Taqman SYBR Green	10 kob/mL 5x10 ² kob/gr 10 ³ kob/ gr 10 ³ kob/ gr	Alarcon ve ark., 2006 Chiang ve ark., 2007 Elizaquível ve ark., 2008 Hein ve ark., 2005
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Süt, Balık, Et, Sucuk	10 ⁸ kob/gr	<i>ail</i>	Taqman	10 ¹ kob/ gr	Lambertz ve ark., 2008

Yapılan bir çalışmada gıda örneklerinde *E. coli*'nin varlığı zenginleştirme yapılmadan 10³-10⁹ hücre/gr aralığında bulunurken zenginleştirme uygulaması ile belirleme limitinin 10³ hücre/gr'ına düştüğü tespit edilmiştir (Takahashi ve ark., 2009). Bu uygulama ile süt örneğinde *Salmonella enterica*'nın belirleme limiti 2-6 saatlik inkubasyonda belirlenemezken 8-12 saatlik inkubasyonda 2.3- 2.3x10² kob/10 ml arasında değişiklik göstermiş ve en düşük belirleme limiti 12 saatlik inkubasyon süresi sonunda elde edilmiştir (Liu ve ark., 2012). Bunlarla beraber Real Time PCR teknolojisinde canlı ve ölü hücreleri ayırma işlemindeki sınırlamalar örneklerin hazırlık aşamasında Etidyum monoazit ve propidyum monoazit gibi bileşikler kullanılması ile ortadan kalkmaktadır (Shi ve ark., 2012; Elizaquível ve ark., 2012; Minami ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014). Ayrıca örneklerde veya örneklerin hazırlık aşamasında oluşabilecek inhibisyonların etkisini belirlemek amaçlı iç kontrol standartlar kullanılmakta ve böylelikle tepkime sırasında oluşabilecek yanlış negatif sonuçlar engellenmektedir (Selvey ve ark., 2001).

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaları tanımlamada Real Time PCR'da kullanılan belirleme teknolojileri arasında en yaygın olarak SYBR Green ve Taqman teknolojileri kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* suşlarını tanımlamak amacıyla SYBR Green I teknolojisi kullanılmıştır. En düşük belirleme limiti *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* türleri için 1 hücre/ml olarak tespit edilirken *Listeria monocytogenes* için ise bu limit 10¹ hücre/ml olarak belirtilmiştir (Bhagwat, 2003). Bununla beraber *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., ve *Campylobacter jejuni* gibi bir çok gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar SYBR Green tekniği ile belirlenmiştir (De Medici ve ark., 2003; Nam ve ark., 2005; Fukushima ve ark., 2010; Delibato ve ark., 2011; Barbau-Piednoir ve ark., 2012).

Taqman teknolojisi Real Time PCR uygulamalarında en çok tercih edilen belirleme teknolojisi özelliği taşımaktadır. Fırsatçı bir gıda patojeni olan *Cronobacter sakazakii* Real Time PCR çalışmalarında hedef organizmalar arasında yer almaktadır. Bu fırsatçı patojenin tanımlanması ve

gıdalarda bulunma miktarının tespit edilmesi için geliştirilen bir Real Time PCR metodunda Taqman PCR teknolojisi kullanılmıştır. Geliştirilen bu metotta analizin hassasiyetini ve özgüllüğünü artırmak amacıyla Taqman problemleri kullanılmıştır. Zenginleştirme yapılmadan saf kültür ve bebek mamasında tespit limiti $1.2 \cdot 10^3$ kob/ml ($1.2 \cdot 10^1$ kob/test) olduğu ve yapay olarak kontamine olmuş gıdalarda 24 saat zenginleştirme sonrası ise 10^1 kob/ml veya g *Cronobacter* varlığının tespit edilebildiği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2012). Taqman teknoloji kullanılarak birçok gıda kaynaklı hastalık etmeni mikroorganizmalar tanımlanmış ve gıdalarda varlığı tespit edilmiştir (Seo ve ark., 2005; Kagkli ve ark., 2011; Leblanc-Maridor ve ark., 2011).

Et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, sebzeler gibi gıda örnekleri birden fazla patojen içerebilmektedir. Bu gibi durumlarda çoklu patojen tanımlaması çoklu Real Time PCR teknoloji ile çok daha hızlı, daha duyarlı ve daha ekonomik bir alternatif yöntem olarak sunulmaktadır (Garrido ve ark., 2013). Ancak tek bir reaksiyonda kullanılan primer çiftleri, kalıp DNA'lar ve problemler analiz sırasında inhibitör etki gösterebilir ve yanlış ya da çıkmayan sonuçlara neden olabilmektedir (Arya ve ark., 2005). Bu yüzden çoklu Real Time PCR analizlerinde optimizasyon ayrıca bir önem taşımaktadır. Huang ve ark., (2007) yaptığı bir çalışmada *Shigella* spp., *E. coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Streptococcus pyogenes* patojen mikroorganizmalarında içinde yer aldığı toplam 8 patojen için moleküler boncuk teknolojisi kullanılarak yeni bir Multiplex Real Time PCR metodu geliştirilmiş ve toplamda 118 gıda izolatları ve klinik izolatları analiz edilerek metod valide edilmiştir. Tek bir reaksiyonda 8 çift primer, 8 çift moleküler boncuk ve 1 çiftte üniversal primer kullanılmış hedef genleri için hiçbir yanlış pozitif veya negatif sonuç elde edilmediği belirtilmiştir.

Sonuç olarak gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar küresel boyutta bir tehdit oluşturmakta, ciddi sağlık problemleri ile beraber ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle hastalıkların önüne geçebilmek ve hastalık etkenlerini tanımlamak büyük önem taşımaktadır. Real Time PCR teknolojisi patojen mikroorganizmaları belirlemek ve karakterize etmek amacıyla uygulanmakta ve diğer teknolojilere göre oldukça duyarlı, özgül, hızlı, dedeksiyon limiti düşük ve kontaminasyon riski az bir teknolojidir. Önemli bir halk sağlığı sorunu olan gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıkların etkenlerini tespit etmek ve önlemek için umut verici bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abravaya, K., Huff, J., Marshall, R., Merchant, B., Mullen, C., Schneider, G., Robinson, J. 2003. Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. Clin. Chem. Lab. Med., 41(4): 468-474.

- Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. J. Appl. Microbiol., 100: 352-364.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5(2): 209-219.
- Aytac, S.A., Taban, B.M. 2014. Food-Borne Microbial Diseases and Control: Food-Borne Infections and Intoxications. (Food Processing: Strategies for Quality Assessment, Springer Publishers, New York: Ed. Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S., Erten, H.) 191-224.
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., Roosens, N. H. 2012. Development and validation of qualitative SYBR® Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeriamonocytogenes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(9): 4021-4058.
- Beneduce, L., Fiocco, D., Spano, G. 2007. Development of PCR-based molecular tools for the detection of emerging food-ad water-borne pathogenic bacteria. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology,
- Bhagwat, A.A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeriamonocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. International Journal of Food Microbiology, 84(2): 217-224.
- Bhunja, A.K. 2008. Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis. Springer Publishers, New York, 276s.
- Botteroa, M.T., Dalmasoa, A., Sogliab, D., Rosatib, S., Decastellc, L., Civera, T. 2004. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. Molecular and Cellular Probes, 18: 283-288.
- Buh Gasparic, M., Tengs, T., La Paz, J.L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Zel, J., Gruden, K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. Anal Bioanal Chem., 396(6): 2023-2029.
- Cawthorn, D. M., Botha, S., Witthuhn, R. C. 2008. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. International Journal of Food Microbiology, 127(1): 129-138.
- Chen, Y., Song, K. Y., Brown, E. W., Lampel, K. A. 2010. Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. Journal of Food Protection, 73(6): 1016-1022.

- Cheng, C. Y., Huang, M. J., Chiu, H. C., Liou, S. M., Chou, C. C., Huang, C. C. 2012. Simultaneous Detection of Food Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* and *Vibriopara haemolyticus* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1): 66-73.
- Cheng, C. Y., Huang, M. J., Chiu, H. C., Liou, S. M., Chou, C. C., Huang, C. C. 2012. Simultaneous Detection of Food Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* and *Vibrio parahaemolyticus* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(1): 66-73.
- Chiang, Y.C., Fan, C.M., Liao, W.W., Lin, C.K., Tsen, H.Y., 2007. Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene *htrA* sequence. *J. Food Prot.*, 70: 2855-2859.
- Chon, J.W., Park, J.S., Hyeon, J.Y., Park, C., Song, K.Y., Hong, K.W., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Seo, K.H. 2012. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. *J Microbiol Biotechnol.*, 22(4): 530-534.
- De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L. 2003. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype *enteritidis* in Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3456-3461.
- Delibato, E., Fiore, A., Anniballi, F., Auricchio, B., Filetici, E., Orefice, L., Losio, M.N., De Medici, D. 2011. Comparison between two standardized cultural methods and 24 hour Duplex SYBR Green Real-Time PCR assay for *Salmonella* detection in meat samples. *New microbiologica*, 34(3): 299-306.
- Dzieciol, M., Frickerb, M., Wagner M., Heina, I., Ehling-Schulzb, M. 2013. A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. *Food Control*, 32(1): 176-185.
- Eischeid, A. C. 2011. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes*, 4: 263.
- Elizaquivel, P., Aznar, R., 2008. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol.*, 25: 705-713.
- Elizaquivel, P., Sanchez, G., Aznaret, R. 2012. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25(2): 704-708.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., Smith, T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1):165-256.
- Fratamico, P. M., Kawasaki, S. 2008. Applications of the polymerase chain reaction for detection, identification, and typing of foodborne microorganisms. (*Microbial Food Contamination*, CRC Press Publishers, New York: Ed. Wilson, C. L.) 213-254.
- Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Lida, N., Yamaguchi, K. 2010. Simultaneous screening of 24 target genes of foodborne pathogens in 35 foodborne outbreaks using multiplex Real-Time SYBR Green PCR analysis. *International Journal of Microbiology*, 2010(2010): 18s.
- Garrido, A., Chapela, M., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G. 2013. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, 30: 76-85.
- Garrido, A., Chapela, M.J., Román, B., Ferreira, M., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G. 2012. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Shigella xexneri* and *Listeria monocytogenes* in processed food samples. *Eur. Food Res. Technol.*, 234:571-580.
- Giglio, S., Monis, P.T., Saint, C.P. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.*, 31(22): e136.
- Griffin, M.J., Goodwin, A.E., Merry, G.E., Liles, M.R., Williams, M.A., Ware, C., Waldbieser, G.C. 2013. Rapid quantitative detection of *Aeromonas hydrophila* strains associated with disease outbreaks in catfish aquaculture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(4): 473-481.
- Hadjinicolaou, A.V., Demetriou, V.L., Emmanuel, M.A., Kakoyiannis, C.K., Kostrikis, L.G. 2009. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* in environmental and clinical samples. *BMC Microbiology*, 9(1): 97.
- Hanna, S.E., Connor, C.J., Wang, H.H. 2005. Real time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations. *Journal of Food Science*, 70(3): 49-53.
- He, Y., Chen, C. 2010. Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Food Microbiology*, 27(4): 439-446.

- Hein, I., Jørgensen, H.J., Loncarevic, S., Wagner, M. 2005. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Research in Microbiology*, 156: 554-563.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4): 413-417.
- Hill, W.E., Wachsmuth, K. 1996. The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(1-2): 123-173.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci.*, 88:7276-80.
- Hong, J., Jung, W.K., Kim, J.M., Kim, S.H., Koo, H.C., Ser, J., Park, Y.H. 2007. Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. *J. Food Prot.*, 70: 2015-2022.
- Huang, Q., Hu, Q., Li, Q. 2007. Identification of 8 Foodborne Pathogens by Multicolor Combinational Probe Coding Technology in a Single Real-Time PCR. *Clin Chem.*, 53(10):1741-1748.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S.A. 2007. Normalization in Real-time PCR. (Real-time PCR) Taylor and Francis Group Publishers, New York: Ed. Dorak, M.T.) 83-91.
- Hyeon, J., Park, C., Choi, I., Holt, P.S., Seo, K. 2010. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2010): 177-181.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. 2010. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27(6): 710-730.
- Jin, D., Luo, Y., Zhang, Z., Fang, W., Ye, J., Wu, F., Ding, G. 2012. Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 330(1): 72-80.
- Kagkli, D., Weber, T.P., Bulcke, M., Folloni, S., Tozzoli, R., Morabito, S., Ermolli, M., Gribaldo, L., Van den Eede, G. 2011. Application of the Modular Approach to an In-House Validation Study of Real-Time PCR Methods for the Detection and Serogroup Determination of Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, 77(19): 6954-6963.
- Kaltenboeck, B., Wang, C. 2005. Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*, 40: 219-259.
- Köppel, R., Kuslyte, A.R., Tolido, I., Schmid, J., Marti, G. 2013. Nonaplex real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella* and enteropathogene *E. coli* after universal enrichment in food samples. *Eur Food Res Technol.*, 237:315-322.
- Lambertz, S.T., Nilsson, C., Hallanvuori, S., Lindblad, M. 2008. Real-Time PCR Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 6060-6067.
- Leblanc-Maridor, M., Garénaux, A., Beaudeau, F., Chidaine, B., Seegers, H., Denis, M., Belloc, C. 2011. Quantification of *Campylobacter* spp. in pig feces by direct real-time PCR with an internal control of extraction and amplification. *J Microbiol Methods*, 85(1): 53-61.
- Lindqvist, R. 1999. Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method—sensitivity and performance compared with a conventional culture method. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 971-978.
- Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., Shi, X. 2012. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control*, 27: 87-93.
- Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., Huang, X. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Microbiological Methods*, 65: 21-31.
- Liu, Y., Mustapha, A. 2014. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. *Int J Food Microbiol.*, 170: 48-54.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7046-7052.
- Malorny, B., Tassios, P. T., Radström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1): 39-48.
- Mckillip, J. L., Drake, M. 2004. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *Journal of Food Protection*, 67(4): 823-832.
- Minami, J., Soejima, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. 2012. Direct Real-Time PCR with Ethidium Monoazide: A Method for the Rapid Detection of Viable *Cronobacter sakazakii* in Powdered Infant Formula. *J. Food Prot.*, 75(9): 1572-1579.

- Muska, A., Peck, E., Palmer, S. 2007. Standards and Controls: Concepts for Preparation and Use in Real-time PCR Applications. (Real-Time PCR in Microbiology From Diagnosis to Characterization, Caister Academic Press Norfolk, UK: Ed. Mackay, I.M.) 101-132.
- Nam, H.M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., Oliver, S.P. 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. International Journal of Food Microbiology, 102(2):161-171.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J., Solera, J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. Clinica Chimica Acta, 439: 231-250.
- O' Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T. 2008. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. Food Microbiol., 25(1):75-84.
- Oliveira, M.A., Ribeiro, E.G.A., Bergamini, A.M.M., Martinis, E.C.P. 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. Food Microbiology, 27(1): 19-23.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Magnani, M. 2009. A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. Food Microbiol., 26(6):615-622.
- Pfaffl, M.W. 2007. Relative quantification. (Real-time PCR, Taylor and Francis Group Publishers, New York: Ed. Dorak, M.T.) 63-82.
- Pfaffl, M.W., Hageleit, M. 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. Biotechnology Letters, 23: 275-282.
- Pinto, B., Chenoll, E., Aznar, R. 2005. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. Systematic and Applied Microbiology, 28(4): 340-352.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the lightCycler. (Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications, Springer Publishers, Berlin: Ed. Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K.) 21-34.
- Rijpens, N.P., Herman, L.M.F. 2002. Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens. Journal Of AOAC International, 85(4): 984-995.
- Ripabelli, G., McLauchlin, J., Mithani, V., Threlfall, E.J. 2000. Epidemiological typing of *Bacillus cereus* by amplified fragment length polymorphism. Letters in Applied Microbiology, 30(5): 358-363.
- Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H.R., Duffield, T., Peregrine, A. S., Trotz-Williams, A., Arroyo, L.G., Brazier, J.S., Weese, J.S. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. Emerging Infectious Diseases, 12(11): 1730-1736.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3(6): 1101-1108.
- Selvey, S., Thompson, E.W., Matthaei, K., Lea, R.A., Irving, M.G., Griffiths, L.R. 2001. β -Actin—an unsuitable internal control for RT-PCR. Molecular and Cellular Probes, 15: 307-311.
- Seo, K.H., Brackett, R.E. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. Journal of Food Protection, 68(1): 59-63.
- Shannon, K., Lee, D.Y., Trevors, J., Beaudette, L. 2007. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. Science of The Total Environment, 382(1): 121-129.
- Sharma, V.K., Carlson, S.A. 2000. Simultaneous Detection of *Salmonella* Strains and *Escherichia coli* O157:H7 with Fluorogenic PCR and Single-Enrichment-Broth Culture. Applied and Environmental Microbiology, 5472-5476.
- Shi, H., Xu, W., Trinha, Q., Luo, Y., Liang, Z., Li, Y., Huang, K. 2012. Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR. Food Control, 27(1): 81-86.
- Shipley, G.L. 2007. An introduction to real-time PCR. (Real-time PCR, Taylor and Francis Group Publishers, New York: Ed. Dorak, M.T.) 1-37.
- Singh, J., Batish, V.K., Grover, S., 2009. A scorpion probe-based real-time PCR assay for detection of *E. coli* O157:H7 in dairy products. Foodborne Pathog. Dis., 6: 395-400.
- Sun, F., Wu, D., Qiu, Z., Jin, M., Wang, X., Li, J. 2010. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green for the specific detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula. Food Control, 21: 487-491.
- Takahashi, H., Kimura, B., Tanaka, Y., Shinozaki, J., Suda, T., Fujii, T. 2009. Real-time PCR and enrichment culture for sensitive detection and enumeration of *Escherichia coli*. J. Microbiol Methods, 79(1):124-127.
- Toplak, N., Kovac, M., Piskernik, S., Mozina, S.S., Jersek B. 2011. Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology, 112: 752-764.
- Trakhna, F., Harf-Monteil, C., AbdelNour, A., Maaroufi, A., Gadonna-Widehem, P. 2008. Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method. Letters in Applied Microbiology, 49: 186-190.

- Trakhna, F., Maaroufi, A., Gadonna-Widehem, P. 2013. Using a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method for reliable enumeration of *Aeromonas hydrophila* in water samples. African Journal of Microbiology Research, 7(19): 2119-2126.
- Tyagi, S., Kramer, F. R. 2012. Molecular Beacons in Diagnostics. F1000 Medicine Reports, 4(10): 1-6.
- Ueda, S., Yamaguchi, M., Iwase, M., Kuwabara, Y. 2013. Detection of Emetic *Bacillus cereus* by Real-Time PCR in Foods. Biocontrol Science, 18(4): 227-232.
- Valasek, M.A., Repa, J.J. 2005. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ., 29(3): 151-9.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynka, O., Vaseashta, A., Adley, C. 2012. Real Time Detection of Foodborne Pathogens - For Food Quality Monitoring & Biosecurity . (Technological Innovations in Sensing and Detection of Chemical, Biological, Radiological, Nuclear Threats and Ecological Terrorism, Springer Publishers, USA: Ed. Vaseashta, A.T., Braman, E., Susmann, P.) 149-158.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. Biotechnology Advances, 28(2): 232-254.
- Wang, W., Chen, K., Xu, C. 2006. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. Anal Biochem., 356(2): 303-305.
- Wang, X., Zhu, C. Q., Xu, X., Zhou, G. 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. Food Control, 25(1): 144-149.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol., 17: 804-7.
- Wiedmann, M., Czajka, J., Barany, F., Batt, C. A. 1992. Discrimination of *Listeriamonocytogenes* from other *Listeria* species by ligase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, 58(11): 3443-3447.
- Wilhelm, J., Pingoud, A. 2003. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Chem BioChem., 4: 1120-1128.
- Wolffs, P.F.G., Glencross, K., Norling, B., Griffiths, M.W., 2007. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. Int. J. Food Microbiol., 117: 50-54.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39(1): 75-85.
- Yaron, S., Matthews, K.R. 2002. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes. Journal of Applied Microbiology, 92(4): 633-640.