

Et ve Et Ürünlerinde Patojen Bakterilerin Tespitinde Real-Time PCR Tekniğinin Kullanılması

Fatih Törnük*, Zülal Kesmen, Hasan Yetim

Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri
*fatihornuk@yahoo.com

Özet

Et ve et ürünleri, insanlarda enfeksiyon ve zehirlenmelere neden olan patojen mikroorganizmaların gelişebilecekleri mükemmel besin ortamlarıdır. Bu tür problemleri önlemek amacıyla uygulanan mikrobiyolojik kalite kontrol programlarında, kullanılacak analitik metotların hızlı ve güvenilir olması oldukça önemlidir. Bu nedenle patojen mikroorganizmaların tespitinde son yıllarda DNA'ya dayalı teknikler oldukça önem kazanmış ve özellikle PCR tekniği klasik yöntemlerin yerini alabilecek alternatif bir metot olarak öne çıkmıştır. Diğer PCR yöntemlerinin aksine amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi için elektroforez işlemine ihtiyaç duymayan ve kantitatif sonuçlar verebilen real-time PCR tekniği, patojen mikroorganizmaların tespitinde kullanılabilir potansiyel bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu yöntemde gıda örneğindeki patojen bakteri türüne ait hedef DNA dizileri, reaksiyon sırasında gerçekleşen floresans sinyaldeki artış ile tespit edilebilmektedir. Real-time PCR tekniği ile, et ve et ürünlerinde *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* gibi pek çok patojen bakterinin tanımlanması için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda real-time PCR'ın hızı, hassasiyeti, spesifitesi ve otomasyona uygun olması gibi avantajlarından dolayı gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde umut verici bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, et ve et ürünlerinde bulunabilecek patojenlerin tespitinde real-time PCR tekniğinin kullanım imkânları ile yöntemin bu alandaki geleceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Real-time PCR, Et, Patojen bakteriler

Giriş

Gıda kaynaklı hastalıkları önlemek amacıyla mikrobiyolojik kalite kontrol programlarının, üretimden tüketime kadar tüm gıda zincirine uygulanması, gittikçe önem kazanmaktadır. Ancak bu kontrol programlarında kullanılacak analitik metotların hızlı ve güvenilir olmasının yanı sıra patojenin kontaminasyon derecesi hakkında bilgi vermesi de önemlidir. Patojen bakterilerin tespitinde kültürasyona dayanan geleneksel metotların; uzun zaman almaları, fenotipik özelliklerin ortaya konmasındaki yetersizlikler ve kültüre alınmamış canlı hücrelerin belirlenememesi gibi ciddi dezavantajlara sahip olmaları nedeniyle DNA'ya dayalı

alternatif metotlar geliştirilmeye çalışılmıştır (1). DNA'ya dayalı pek çok yöntem bulunmakla beraber bunlardan en umut verici olanı; hızı, hassasiyeti, spesifitesi, seçiciliği, hedef bakterinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle real-time PCR tekniğidir. Real-time PCR tekniğinde, klasik PCR'dan farklı olarak işaretli PCR ürünlerinin yaydığı floresans sinyali belirleyen optik bir modül mevcuttur. PCR'ın her bir döngüsünde floresans sinyalinin şiddeti enstrümental olarak belirlenir. Klasik PCR'ın aksine amplifikasyon ürünleri, bir bilgisayar yazılımı yardımıyla amplifikasyon sırasında analiz edilir (2). Sonuç olarak bu çalışmada, et ve et ürünlerinde bulunabilecek patojenlerin tespitinde real-time PCR tekniğinin kullanım imkânları ile yöntemin bu alandaki geleceği kısaca değerlendirilmiştir.

Et ve Et Ürünlerinde Patojen Mikroorganizmaların Tespitinde Real-Time PCR: Et ve et ürünleri, insanlara geçen gıda kaynaklı birçok hastalıkta en riskli gıda grubudur (3). Son yıllarda bu gıdalarda patojen mikroorganizmaların tespiti için real-time PCR tekniğine dayalı pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda amplifikasyon ürünlerinin tespitinde kullanılan teknikler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Nükleik Asit Boyaları: Bu teknikte, çift zincirli nükleik asitlere bağlanan bir boyanın oluşturduğu sinyal, termal cycle üzerindeki optik okuyucu ile tespit edilir. En yaygın kullanılan boya, SYBR Green I'dir (2). Araştırmalar, bu boya ile birden çok patojen mikroorganizmanın eşzamanlı olarak tespit edilebildiğini göstermiştir (4). Örneğin Jothikumar ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, 16 saatlik bir zenginleştirme işlemi ile *Listeria* ve *Salmonella* türleri, multipleks real-time PCR ile 1 hücre düzeyinde bile tespit edilebilmiştir (5). Sosisler üzerinde yapılan bir çalışmada ise aynı tür bakteriler yine zenginleştirme işlemi yapılarak sırasıyla 3 ve 4 kob/g hassasiyetle belirlenmiştir (6).

Moleküler Beacon: Bu molekül uçları birbirine yapışık yaklaşık 25-35 baza sahip saç tokası şeklinde işaretli bir oligonükleotiddir. PCR sırasında molekül açılarak komplimenter olduğu amplikona bağlanır ve bu sırada 5' ucunda bulunan boya serbest hale geçerek floresans bir ışın yayar. Bu teknikte, bazı zorluklara rağmen, diğer real-time PCR teknikleriyle başarısız olan spesifik testler yapılabilmektedir (2). İlk olarak sütte *E.coli* O157:H7 tespitinde kullanılan bu tekniğin (7), et ve somon balığında *L. monocytogenes*'in tespitinde de başarıyla uygulanabileceği gösterilmiştir (8).

TaqMan Probları: SYBR Green I'deki güçlükler ve moleküler beacon'daki esneklik probleminin giderilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu teknikte amplifikasyon ürününe spesifik olarak hibridize olan işaretli bir oligonükleotid (TaqMan problemleri) polimeraz enzimi ile yıkılınca, 5' ucunda bulunan boya serbest hale geçer ve yaydığı ışın, real-time cihazında kaydedilir (2). TaqMan problemleri, real-time PCR tekniğinin spesifitesini artırmıştır. *InvA* genine spesifik bir TaqMan probu kullanılarak yapılan bir çalışmada *Salmonella* tespitinde %100 kesinlik

sağlanmıştır (9). Başka bir çalışmada ise, çiğ ıstiridyede bulunan *Vibrio cholerae*, 6-8 kob/g hassasiyetle tespit edilmiş ve yine % 100 spesifite sağlanmıştır (10). Çiğ et ve tofuda *Yersinia enterocolitica* varlığı yine bu teknikle incelenmiş ve hassasiyet saf kültür ve kıyılmış domuz etinde sırasıyla 10^2 ve 10^3 kob/ml olarak belirlenmiştir (11).

FRET (Floresans Resonance Energy Transfer) Problar: Bu teknikte hedef DNA dizisi üzerinde birbirine bitişik olarak hibridize olan iki prob kullanılır. Problardan biri PCR sırasında harici bir ışık kaynağı tarafından uyarılır ve enerjisi bitişikindeki diğer proba aktarılır. Bu probun amplikon miktarı ile orantılı olarak yaydığı ışın tespit edilir. Bu teknikle real-time PCR'ın multipleks kapasitesinin artırılması amaçlanmaktadır (2, 12). Çiğ ve tüketime hazır et ürünlerinde, geleneksel kültür ve enzim immunoassay yöntemi ile *Salmonella* için 10^3 kob/g olarak belirlenen deteksiyon limiti, bu teknik sayesinde 1-10 kob/g düzeyine kadar indirilmiştir (13). Başka bir çalışmada ise, balık ve çeşitli et ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığı, 1-10 hücre hassasiyetle tespit edilebilmiştir (14).

Sonuç

Bugün gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde real-time PCR'a dayalı uluslararası standart metodların geliştirilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Hatta bazı patojenlerin tespitinde kullanılan ticari real-time PCR kitleri piyasaya sunulmuştur. Real-time PCR teknikleri, kültürel yöntemler ve geleneksel PCR tekniklerine kıyasla; hızlı ve multipleks özelliğe sahip olmaları, deteksiyon limitlerinin düşüklüğü, uygulama kolaylığı ve yüksek spesifite gibi çok önemli avantajlara sahiptir. Kısmen yapılacak bir ön zenginleştirme işlemi ise, deteksiyon limitini daha da düşürmektedir. Bu durum, *Salmonella* gibi önemli patojenler için gerekli görülmekle birlikte, bu işlem deteksiyon süresini uzatmaktadır. Diğer yandan, real-time PCR oldukça dinamik bir teknik olmanın yanında ortamdaki canlı ve ölü hücre ayırımını yapmamaktadır. Bu olumsuzluğu gidermek için uygulanan, ölü hücre DNA'larının PCR öncesinde uzaklaştırılması işlemi, yeni bir araştırma konusu olup bu konuda da henüz yeterli araştırma mevcut değildir. Real-time PCR'ın bir diğer dezavantajı ise pahalı olmasıdır. Ancak bildirilen tüm dezavantajlarına rağmen real-time PCR, sonsuz açılımı olan ve giderek kendine yeni kullanım alanları bulan bir tekniktir. İşte patojen bakterilerin tespiti de bu alanlardan birisidir. Dolayısıyla real-time PCR, çeşitli gıdalarda patojen mikroorganizmaların tespitinde gelecek vadeden bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Ancak yukarıda sözü edilen dezavantajların giderilebilmesi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int J Food Microbiol. 83 (1) 39-48.

2. Hanna SE, Connor CJ, Wang HH. 2005. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *J of Food Sci*, 25 (3) 49-53.
3. Ünlütürk A, Turantaş F. 2003. *Gıda Mikrobiyolojisi. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri*, 261 s, Bornova-İzmir.
4. Bagwhat A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int J Food Microbiol*. 84 (2) 217–224.
5. Jothikumar N, Wang X, Griffiths M. 2003. Real-time multiplex SYBR Green I based assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 66 (11) 2141–45.
6. Wang X, Jothikumar N, Griffiths M. 2004. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J Food Prot*. 67 (1) 189–192.
7. McKillip JL, Drake M. 2000. Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J Food Prot*. 63 (7) 855–859.
8. Nadal A, Coll A, Cook N, Pla M. 2007. A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of *Listeria monocytogenes* in food products: Role of target mRNA secondary structure on NASBA design. *J of Microbiol. Methods*. 68 (3) 623-632.
9. Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M, Esteve T, Hoorfar J, Pla M. 2003. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *J Microbiol Methods* 54 (3) 381–390.
10. Lyon WJ. 2001. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol* 67 (10): 4685-4693.
11. Vishnubhatla A, Obersh RD, Fung DYC, Wonglumsom W, Hays MP, Nagaraja TG. 2001. Evaluation of a 5'-nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples. *J Food Prot*. 64 (3) 355–360.
12. Bellin T, Matthias P, Matussek A, Hempen HG, Gunzer F. 2001. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol*. 39 (1) 370–374.
13. Ellingson JLE, Anderson J, Carlson S, Sharma VK. 2004. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol. Cell Probes*. 18 (1) 51–57.
14. Grady JO, Sedano-Balbás S, Maher M, Smith T, Barry T. 2007. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target, *Food Microbiol*. Article in Press.