



Ette Mikrobiyolojik Analizler

Seyda ŞAHİN¹

7.1. Giriş

Gıdaların üretimi, işlenmesi ve muhafazası alanında kaydedilen hijyenik ve teknolojik gelişmeler ve tüketici bilincinin yükselmesine rağmen, gıdalardan kaynaklanan enfeksiyonlar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır (Erol, 2022). Gıdalar farklı kaynaklardan mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal tehlikelere maruz kalabilmektedir. Bu tehlikeler arasında mikrobiyolojik tehlikeler önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Gıdalarda bulunan patojen mikroorganizmalar (bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüsler) veya bunların toksik metabolitleri gıdaların tüketimine bağlı olarak insanlarda önemli sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (Erkmen, 2010; Yörük, 2021). Gıda kaynaklı enfeksiyon veya intoksikasyonların çoğu bakteri (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, diğer Shiga-toksin üreten *E. coli* suşları, *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio vulnificus*) ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucunda oluşmaktadır (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Gıda kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında

¹ Doç. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD., seydasahin@cumhuriyet.edu.tr

bakteriler oluşan vakaların, salgınların ve ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumlu tutulmaktadır. Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlarının görülme sıklığındaki artışın sebebi olarak üretim hatası, muhafaza ve soğuk zincir koşullarına ilişkin hatalar, hijyen eksikliği, enfekte insanlar tarafından bulaştırma, pişirme-ısıtma hataları, paketleme ve nakil hataları şeklinde sıralanabilmektedir (Erol, 2022). Ayrıca, hayvan ve hayvansal ürün ticaretinin küreselleşmesi, insanların yaşam tarzı ve yemek alışkanlıklarının değişmesi, uluslararası seyahatler, yeni gıda üretim teknolojileri, çevre kirliliği, iklim değişikliği ve doğal afetler, mikroorganizmaların mutasyona uğramasının yanı sıra antibakteriyel direnç gelişimi gibi faktörlerle ilişkili bulunmaktadır (Velusamy ve ark., 2012). Gıda kaynaklı enfeksiyonların ve intoksikasyonların küresel çapta halk sağlığını tehdit eden bir sorun haline gelmesi nedeniyle gıda güvenliğinin sağlanması için gıda üretim zincirinin çiftlikten sofraya kadar olan her aşamasında daha fazla kontrole ihtiyacı vardır (Zhao ve ark., 2014). Güvenli gıda sağlanmasında gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların oluşumunu en aza indirmek için et ve et ürünlerinin de patojen bakteriler yönünden analiz edilmesi esastır (Law ve ark., 2015; Şahin ve ark., 2020a).

Hayvansal kaynaklı gıdalar içerisinde et ve et ürünleri yeterli ve dengeli beslenmede çok önemli bir yere sahiptir. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'ne göre; "Et; sığır, manda, koyun, keçi gibi büyük ve küçükbaş hayvanlar; tavuk, hindi, kaz, ördek, beç tavuğu gibi evcil kanatlı hayvanlar ile tavşan ve domuzdan elde edilen, insan tüketimine uygun olan tüm parçalar" olarak tanımlanmaktadır. Genel anlamda ise "Yeterli olgunluğa erişmiş sağlıklı hayvanlardan (büyükbaş, küçükbaş, kanatlı ve su hayvanları) tekniğine uygun şekilde elde edilen yenilebilir hayvansal dokular" olarak tanımlanmaktadır (TGK, 2012). Hayvansal kökenli gıdalar içerisinde et ve et ürünleri biyolojik değeri yüksek proteinler, esansiyel amino asitler, B grubu vitaminler ile demir, kalsiyum, fosfor, çinko ve bakır gibi mineralleri içeren lezzetli, doyurucu ve iştah artıran önemli bir besin maddesidir. Vücut tarafından sentezlenemeyen esansiyel aminoasitleri yeterli ve dengeli oranda içerdikleri için insan beslenmesinde vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Tavuk eti de ince lifli, bağ doku ve yağ oranı daha az, daha gevrek, kolay çiğnenebilir ve sindirilebilir nitelikte,

düşük kalorili, B grubu vitaminleri, esansiyel amino asit ve doymamış yağ asitleri bakımından zengin bir besindir. Yine balık eti de esansiyel aminoasit bakımından zengin olması, yüksek oranda doymamış yağ asidi içermesi nedeniyle, mineral (fosfor, kalsiyum ve magnezyum) maddeler yönünden zengin olmasının yanı sıra A ve D vitamin içeriği nedeniyle önemli bir hayvansal gıdadır (Arslan, 2020). Ancak, etin bu üstün nitelikleri, bileşiminde bulunan yüksek su aktivitesi, pH'sı ile patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların kolayca bulaşabileceği ve hızla üreyip çoğalabileceği uygun bir ortam oluşturmaktadır (Öztürk ve ark., 2006; Aydın ve ark., 2011; Şahin ve ark., 2020a; Şahin ve ark., 2020b). Etin mikrobiyolojik kalitesi, hayvanın kesimdeki fizyolojik durumuna, kesim ve işleme sırasında kontaminasyona, depolama sıcaklığı ve dağıtım koşullarına bağlı olup hijyen kuralları göz ardı edilerek üretilen et ve et ürünlerinde zoonotik etkenler bakımından risk oluşturabilmektedir. Et ve et ürünlerinde yer alan önemli gıda kaynaklı patojen bakterilerden bazıları *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. ve *E. coli* O157'dir. Bu bakteriler gıda kaynaklı hastalıklarda önem arz etmekte ve halk sağlığı sorunlarına yol açabilmektedir (Şahin ve ark., 2020a; Acaröz ve Arslan Acaröz, 2021).

Gıda güvenliğinin sağlanması için gıdaların kalite kontrolünde kullanılan mikrobiyolojik kriterler, gıdanın mikrobiyolojik özelliklerini belirleyen limitler olarak tanımlanmaktadır. Mikrobiyolojik kriterlerin belirlenebilmesi için gıdadaki mikroorganizmaların ve/veya toksinlerin bilinmesi, mikroorganizmaların ve/veya toksinlerin aranması ve sayımların yapılması için analitik yöntemlerin geliştirilmesi, örnekleme alanının saptanması, gıda için uygun olduğu düşünülen mikrobiyolojik limitlerin tespit edilmesi, saptanan limitleri sağlayacak örnek ünite oranlarının belirlenmesi gerekmektedir (Öztürk ve ark., 2006). Et ve et ürünlerinde kullanılan mikrobiyolojik kriterlerle; et ve et ürünlerinde oluşabilecek patojen bakteri riskini kontrol etmek, kontaminasyonu önlemek ve raf ömürlerini belirlemek esastır. Bu bağlamda, gıda güvenliği kriterlerine göre Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde, et ve et ürünlerinde risk oluşturabilecek bakteriler Tablo 1'de verilmiştir (TGK, 2011).

Tablo 1. Et ve Et Ürünlerinde Analiz Edilen Bakteriler ve Limitleri

Gıda	Mikroorganizmalar	Numune Alma Planı ¹		Limitler ² (kob/g-mL)		Referans Metod	
		n	c	m	M		
Et ve Et Ürünleri							
	Kıyma	Aerobik koloni sayısı	5	2	5x10 ⁵	5x10 ⁶	ISO 4833
		<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579
<i>E. coli</i> O157		5	0	0/25 g-mL		ISO 16654	
Çiğ kırmızı et ve hazırlanmış kırmızı et karışımları	<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
	<i>E. coli</i> O157	5	0	0/25 g-mL		ISO 16654	
Çiğ kanatlı eti ve hazırlanmış kanatlı eti karışımları	<i>Salmonella</i> Typhimurium	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
Mekanik olarak ayrılmış kırmızı et ve mekanik olarak ayrılmış kanatlı eti	Aerobik koloni sayısı	5	2	5x10 ⁵	5x10 ⁶	ISO 4833	
	<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
	<i>E. coli</i> O157	5	0	0/25 g-mL		ISO 16654	
Kürlenmiş ve kurutulmuş pastırma, vb. ürünler	Koagulaz pozitif stafilokoklar	5	2	10 ²	10 ⁴	EN/ISO 6888-1 veya 2	
	Sülfite indirgeyen anaerob bakteri	5	2	10 ²	10 ³	ISO 7937	
	<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
Fermente sucuk vb. ürünler	<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 11290-1	
	<i>E. coli</i> O157	5	0	0/25 g-mL		ISO 16654	
Isıl işlem görmüş et ürünleri (sosis, salam, kavurma, döner, köfte, jöle işkembe vb.)	<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 11290-1	
Balıklar	<i>Salmonella</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 11290-1	

(1) n: Numune sayısı; c: m ile M limiti arasında değere sahip olmasına izin verilen numune sayısı

(2) kob: Koloni oluşturan birim

Gıda maddelerinde ürün çeşidine bağlı olarak ve ürünle ilgili yasal kriterler dikkate alınarak mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda gıdalarda aerobik bakteri, *Enterobacteriaceae*, koliform bakteriler, *E. coli*, bazı patojen mikroorganizmalar, maya ve küfler yönünden analizler yapılmaktadır (Aran ve Köseoğlu, 2010; TGK, 2011; Şahin ve ark., 2017).

Gıdaların mikrobiyolojik analizi kültür yöntemine dayalı geleneksel veya kültür temelli yöntemler ve hızlı yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gıdada bulunan mikroorganizmaları tespit etmek için kültür temelli geleneksel yöntemlerde mikroorganizmaların agar plakları üzerinde üretilmesi, biyokimyasal ve serolojik testlerle doğrulanmasına dayanmaktadır (Mandal ve ark., 2011). Kültür temelli yöntemler canlı mikroorganizmaların incelenmesine olanak sağladığından dolayı halen altın standart olarak kabul edilmektedir (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Ancak, kültür temelli yöntemlerle mikroorganizmaların tanımlanabilmesi için ön zenginleştirme, seçici zenginleştirme ve seçici agar kullanımı gibi farklı ortamlara gereksinim vardır. Bu da analiz süresini uzatmaktadır. Kültür temelli yöntemlerde ön zenginleştirme için 2 ila 3 gün, patojen mikroorganizmaların doğrulanması için ise bir haftadan fazla süre gerekebilmektedir. Geleneksel yöntemlerde besiyerlerinin hazırlanması, agar plaklarına ekim ve koloni sayım aşamaları bulunmakta olup hem zahmetli hem de yoğun iş gücü gerektirmektedir (Halkman, 2013; Zhao ve ark., 2014). Ayrıca, et ve et ürünleri gibi raf ömrü kısa olan gıdaların geleneksel yöntemlerle yapılan mikrobiyolojik analizleri sürerken bu gıdalar tüketilebilmekte ya da raf ömrü tamamlanamamaktadır (Yalçın, 2016).

Geleneksel kültür yöntemlerinin gıdadaki düşük düzeyde mikroorganizma bulunması, yavaş gelişen veya strese maruz kalan mikroorganizmaların bulunması durumunda duyarlılıkları sınırlı olabilmektedir (Lee ve ark., 2014). Geleneksel yöntemde kullanılan besiyeri, sıcaklık ve nem gibi laboratuvar koşulları seçici bir ortam meydana getirmek suretiyle, daha farklı koşullarda gelişebilen mikroorganizmaların tespitini engellemektedir (Yelboğa ve Karagüler, 2010). Nitekim, kültüre edilemeyen patojen mikroorganizmalar nedeniyle yanlış negatif sonuçlar alınabilir. Geleneksel mikrobiyolojik analiz yöntemleri ile kültüre edilemeyen patojen mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun üretilemedikleri belirtilmektedir (Aman ve ark., 1995). Yine, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tespit edilememesi patojenlerin bulaşma riskini artırabilmektedir (Law ve ark., 2015).

7.2. Hızlı ve Yeni Mikrobiyolojik Teknikler

Hızlı ve yeni yöntemlere ilk olarak 1960'lı yılların ortalarında ilgi başlamıştır. Önceden klinik mikrobiyolojide ilgi gören hızlı ve yeni yöntemler, gıda mikrobiyologlarının ise 1990'lu yıllardan sonra dikkatlerini çekmeye başlamıştır. Hızlı ve yeni olarak tanımlanan bu yöntemlerin en önemli özelliği kısa sürede sonuç alınabilmesidir (Fung, 2002; Aras, 2011; Halkman, 2013) (Tablo 2).

Tablo 2. Hızlı ve Yeni Tekniklerin Yıllara Göre Gelişimi

Yıl	Hızlı ve Yeni Teknikler
1965 - 1975	Minyatürize biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinin gelişimi
1975 - 1985	İmmunolojik testlerin gelişimi
1985 - 1995	Moleküler yöntemlerin ve polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) uygulanması
1995 - ...	Biyosensör ve DNA mikrodizi gibi yöntemlerin gelişimi

Son yıllarda, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonlarında duyarlılıkları, özgünlüğü ve kısa sürede sonuç alınabilmesi nedeniyle hızlı yöntemler geliştirilmiştir. Hızlı yöntemler; gıda, klinik ve çevresel örneklerde bulunan mikroorganizmalar ile onlara ait metabolitlerin izolasyonu, identifikasyonu, erken tanısı, sayımı ve bakterilerin antibiyotiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydın ve Sudağdan, 2016). Hızlı yöntemler, gıda endüstrisinde çiğ ve işlenmiş gıdalardaki patojenlerin varlığını anında tespit edebildikleri için önemlidir. Ayrıca, hızlı yöntemler gıdalarda düşük sayıda bulunan patojen mikroorganizmaları tespit edecek kadar hassastır. Hızlı yöntemlerle sağlanan ilerlemelerle maliyetler düşmekte, insan hataları en aza inmekte, iş yükü azalmakta ve kısa sürede analizler tamamlanmaktadır (Mandal ve ark., 2011). Et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde moleküler (PZR, mPZR ve DNA mikrodizi), immünolojik (ELISA, LFA) ve biyosensör temelli yöntemler hızlı, hassas ve özgül olmalarından dolayı gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla kullanılabilir (Zhao ve ark., 2014; Güven ve Azizoğlu, 2022).

7.3. Moleküler (Nükleik Asit Esaslı) Yöntemler

Nükleik asit esaslı yöntemler DNA (Deoksiribonükleik asit) veya RNA (Ribonükleik asit)'nin *in vitro* çoğaltılması (amplifikasyonları) sonucu gıda kaynaklı

patojenlerin tespitinde kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Nükleik asit esaslı yöntemlerde, hedef patojen mikroorganizmaya özgü DNA veya RNA dizilerinin tespiti amaçlanmaktadır (Zhao ve ark., 2014). Günümüzde mikrobiyolojik analizlerde, klasik veya geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), çoklu (multipleks) polimeraz zincir reaksiyonu (mPZR), gerçek zamanlı veya kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR), nükleik asit dizi bazlı çoğaltma (NASBA), ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma (LAMP) ve DNA mikrodizi teknolojisi gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

7.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Son yıllarda, gıda kaynaklı patojenlerin ve toksin genlerinin tespiti için en yaygın kullanılan moleküler tabanlı yöntemlerden biri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'dur. Bu yöntem Amerika Birleşik Devletleri'nde 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. PZR yöntemini geliştirmesindeki bu çalışmalarından dolayı Dr. Kary Mullis 1993 yılında Nobel Kimya ödülünü almaya hak kazanmıştır. PZR, DNA'nın belirli bir bölümünün *in vitro* ortamda ısıya dayanıklı enzimler ile çok sayıda çoğaltılmasına yönelik bir teknik olup yeni cihazların geliştirilmesiyle birlikte kısa sürede gerçekleştirilmektedir (Bartlett ve Stirling, 2003). Gıda kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlara neden olan patojen mikroorganizmaların PZR ile tanımlanması, saf kültürler veya ön zenginleştirme yada seçici besiyerlerinde geliştirilen bakterilerin analiz edilmesi veya doğrudan gıda maddesinden, hedef patojen mikroorganizma DNA'sının ekstraksiyon yöntemleri ile izole edilmesi ve devamında amplifikasyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Aydın ve Sudağdan, 2016).

Gıdalarda bulunan bakterilerin PZR yöntemi ile saptanabilmesi için uygun örnek hazırlama metodlarına gerek vardır. Örnek hazırlama aşamaları, bakterinin izolasyon ve identifikasyonu, DNA'nın ekstraksiyonu ve PZR reaksiyonunu engelleyecek bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılması şeklindedir (Özatay, 2012). DNA'nın ekstraksiyonu için fenol/kloroform, ticari DNA izolasyon kiti, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ve DTAB (Dodecyle Trimethyl Ammonium Bromide) gibi çeşitli metodlar kullanılmaktadır (Özşensoy ve Şahin, 2016). DNA ekstraksiyonu, mikroorganizmanın mekanik veya kimyasal yollarla parçalanması, nükleik asit dışındaki maddelerin (proteinler, polisakaritler) uzaklaştırılması ve nükleik asitlerin çöktürülerek ayrılması işlemidir. DNA'nın bakteri hücresinden çıkarılması amacıyla lizozim ve proteinaz K gibi enzimler kullanılabilenkte, su veya denatürasyon çözeltisi içinde kay-

natma veya ısıtma yapılabilmektedir (Beneduce ve ark., 2007; Özatay, 2012). Gıdalarda PZR analizlerinin gerçekleştirilmesi sırasında DNA'nın hedef bölgesinin hasar görmemesi analizin doğru sonuçlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların PZR teknikleri ile saptanmasında 16S rDNA'nın hedef gen bölgesi olarak seçilmesi başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Beneduce ve ark., 2007). Örneğin, PZR ile *Salmonella enterica* tespitinde hedef gen olarak *invA*, *L. monocytogenes* için *hlyA*, *prfA* ve *E. coli* için ise *uspA* gibi bakteri türüne özgü genler başarıyla kullanılmaktadır (Chen ve Griffiths, 1998; Aznar ve Alarcon, 2003; Malorny ve ark., 2003; D'Agostino ve ark., 2004).

PZR'ın çalışma prensibi oldukça basittir. PZR reaksiyonunda, izole edilen hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) belirli bir kısmı, spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile, enzimatik yolla sayısal olarak çoğaltılmaktadır. Bu hedef genetik materyal çok az sayıda, birçok ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve kolayca da identifiye edilebilmektedir (Arda, 2000). PZR yöntemi istenilen sayıda tekrarlanabilen ısıl döngülerden oluşmaktadır. Bir PZR döngüsü üç aşamada gerçekleştirilmektedir. Bu aşamalar ise şu şekildedir: İlk aşama, çift sarmallı DNA iplikçilerinin yüksek sıcaklıkta birbirlerinden ayrılması (denatürasyon), ikinci aşama; çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesine spesifik 20-35 baz uzunluğunda iki ayrı oligonükleotidlerin uygun sıcaklıkta bağlanmaları (annealing), üçüncü adım ise yeni çift zincirli DNA uzaması (polimerizasyon) şeklindedir. Bu üç aşama bir PZR döngüsünü oluştururken, her aşama farklı sıcaklıklar da gerçekleştirilmektedir. Birinci aşama yaklaşık 94-98°C; ikinci aşama 37-65°C, üçüncü aşama ise yaklaşık 70-72°C'de gerçekleşmektedir. Bu üç aşama standart bir PZR reaksiyonunda yaklaşık 30-35 kez tekrar edilerek yeni sentezlenen DNA miktarı her üç adımlı döngüden sonra bir önceki döngüye göre 2n formülüne göre artmaktadır. PZR'dan sonra amplifiye edilmiş ürünler etidyum bromür ile boyanarak agaroz jel üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulmakta ve jel üzerindeki oluşan bantlar ultraviyole ışığında görüntülenmektedir (Yelboğa ve Karagüler, 2010). Et ve et ürünlerinden PZR yöntemi ile tüketici sağlığını riske atabilecek *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli*, *C. jejuni*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *Shigella* sp. ve *S. aureus* gibi gıda kaynaklı birçok patojen mikroorganizma hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir (Alves ve ark., 2012; Zhou ve ark., 2013; Lee ve ark.,

2014; Kocaman ve Sarımeahmetođlu, 2017; Sahin ve ark., 2019; Şahin ve ark., 2020a; Sahin ve ark., 2020b; Sahin, 2020).

7.3.2. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPZR)

Çoklu veya multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPZR), birden fazla hedef gen dizisinin eşzamanlı çoğaltılması ile geleneksel PZR yöntemine göre daha hızlı tespit olanağı sunmaktadır. Multipleks PZR'in temel çalışma prensibi geleneksel PZR'a benzemektedir. Ancak, mPZR yönteminde birden fazla hedef bölgeye bağlanan çok sayıda primer çifti kullanılırken, geleneksel PZR'da ise sadece bir primer seti kullanılmaktadır (Temizkan ve Arda, 2004). Multipleks PZR'da tek bir reaksiyonda daha çok hedef bölge çoğaltılması ile daha az zaman, iş gücü ve sarf malzeme tasarrufu sağlanabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı kullanışlı ve tercih edilen bir yöntemdir. Ancak, mPZR yönteminden doğru sonuçlar almak için metodun iyi optimize edilmesi gerekmektedir. Farklı primerlerin aynı reaksiyon koşullarında çoğalmasını sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli bir şekilde seçilmesi, bağlanma sıcaklığının uygun olması ve primer konsantrasyonunun iyi ayarlanması da oldukça önemlidir (Temizkan ve Arda, 2004; Zhao ve ark., 2014). Başarılı mPZR için gereken diğer faktörler ise; primer, tampon, magnezyum klorür ve deoksiniükleotid konsantrasyonları arasındaki denge; kalıp DNA ve Taq DNA polimeraz miktarı ile döngü sıcaklıklarıdır (Markoulatos ve ark., 2002; Sahin ve ark., 2020b). Başlangıçta, mPZR sadece iki yada üç patojen mikroorganizmayı tespit etmek için kullanılırken, Őimdilerde ise aynı anda beş veya daha fazla patojen mikroorganizmayı belirleme olanağı sunmaktadır. Nitekim, Ryu ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada işlenmiş et ürünlerinden izole edilen *Listeria* spp.'yi yüksek doğrulukla tespit edebilen ve ayırt edebilen yeni bir mPZR yöntemi geliştirilmiştir. Çalışma kapsamında mPZR ile tek bir tüpte aynı anda identifiye edilen *Listeria* türleri; *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. seeligeri* olarak tanımlanmıştır. Sahin ve ark. (2020b) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise farklı hayvan türlerine (koyun, keçi, sığır ve tavuk) ait etlerden elde edilen *S. aureus* izolatlarında multipleks PZR yöntemi ile *seg*, *sei*, *seh*, *sea*, *seb*, *sej* ve *sed* stafilokokal enterotoksin (SE) gen varlığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, gıda kaynaklı salgın veya vakalarda Őüpheli gıda örneklerinden elde edilen izolatlarda multipleks PZR ile *S. aureus* toksin genlerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabileceğini belirtmişlerdir.

7.3.3. Gerçek Zamanlı veya Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR; qPZR)

Gerçek zamanlı veya kantitatif PZR'da elektroforez işlemine gerek duyulmadan klasik PZR yöntemine göre hedef genetik materyalin tespiti son derece hızlı, hassas ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde, reaksiyona başlangıçta konulan hedef DNA'nın çoğalma (amplifikasyon) derecesine bağlı olarak oluşan floresan parlamaya göre eş zamanlı amplifikasyon ve tespit aşaması ekrandan takip edilebilmektedir. Tespit edilen floresan yoğunluğu ampikonların miktarı ile doğru orantılıdır. Günümüzde, GZ-PZR gıdadaki patojen mikroorganizmaların varlığı, kontaminasyon düzeyinin tespiti, mutasyon analizi, gen ekspresyonu ve mikrobiyota analizi gibi birçok farklı amaç için kullanılabilir (Gürsoy ve Otlı, 2017).

Gerçek zamanlı PZR teknolojisinde, DNA çoğalmasını tespit edebilmek için ışığa yapan floresan işaretli moleküller kullanılmaktadır. Bu moleküller hedef diziyeye özgü floresan işaretli oligonükleotidler (TaqMan Prob) ve hedef diziyeye özgü olmayan boyalar (SYBER green) şeklinde iki gruba ayrılabilir (Tutar ve ark., 2015). Önceki çalışmalarda GZ-PZR testlerinde SYBR green boyalar yaygın olarak kullanılırken, son zamanlarda ise daha spesifik saptama ve miktar tayini sağladıkları için floresan problemlerin daha sık kullanıldığı belirtilmektedir (Kralik ve Ricchi, 2017).

TaqMan prob teknolojisi çoğaltılmak istenilen DNA'ya özgü floresanla işaretlenmiş tek zincirli nükleotid dizisi içermektedir (Holland ve ark., 1991). Floresan işaretli probun 5' ucunda raportör molekül, 3' ucunda ise baskılayıcı molekül bulunmaktadır. Baskılayıcı boya (3' uçta) raportör boyanın (5' uçta) floresan ışığa oluşturmamasını engellemektedir (Levin, 2004). DNA'nın çoğaltılması sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerine primerlerin bağlanma bölgeleri arasına TaqMan problemler bağlanmaktadır. Bu şekilde, primerlerin bağlanmasının ardından yeni DNA zinciri oluşmaya başlamaktadır. Probun bağlı olduğu bölgeye geldiğinde Taq DNA polimeraz ile prob parçalanarak floresan boya serbest hale geçmekte ve belirli dalga boyunda ışığa geçmektedir. Her bir döngüde PZR ürün miktarı arttıkça floresan ışımının yoğunluğu da artmaya devam etmektedir (Espy ve ark., 2006).

Gerçek zamanlı PZR yönteminde floresan tespit sistemleri arasında yer alan SYBR green teknolojisi TaqMan problemlerine veya moleküler boncuklara kıyasla basit, düşük maliyetli ve daha güçlü floresan sinyal oluşturmaktadır.

Ancak, yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. SYBR green tüm çift zincirli DNA moleküllerine bağlandığı için her zaman istenilen DNA bölgesinin çoğaldığına işaret etmeyebilir, yanlış pozitif sonuç almak da mümkündür. Gerçek zamanlı PZR'da ortamda spesifik olmayan ürünler ve primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer” olarak adlandırılan ve çift zincirli kısa DNA bölgelerinin oluşumu neticesinde de floresan ışığa gözlemlenmektedir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin yapılması gerekmektedir (Lewin, 2004; Eischeid, 2011). TaqMan problemleri ve moleküler boncuklar ise DNA dizisine özgü problemlerdir ve sadece hedef DNA dizilerine bağlanmaktadır (Levin, 2004). SYBR green teknolojisi ile karşılaştırıldığında TaqMan prob teknolojisinin daha pahalı ve hedef bölgeye özgü olduğundan daha hassas bir metod olduğu belirtilmektedir (Espy ve ark., 2006).

Gerçek zamanlı PZR'da ürünlerin analizi amplifikasyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle klasik PZR tekniğinde ihtiyaç duyulan agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının ultra viole ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek kontaminasyona kapalı otomatize cihazlar ile güvenle çalışılabilmektedir (Fricker ve ark., 2007).

Barbau-Piednoir ve ark. (2013) *Listeria* spp., *L. monocytogenes* ayırımı ve tanımlanması amacıyla SYBR Green boya teknolojisi kullanarak gerçek zamanlı PZR'la yeni bir metod geliştirmiş ve bu metodun validasyonunu (doğrulama) sağlamışlardır. Ayrıca, seçilen primerler optimum PZR verimi elde etmek için kısa bölgeleri (60 ile 103 bç) çoğaltabilecek şekilde tasarlanmıştır. Yöntemin doğruluğu *Listeria* türleri için %98.08 ve *L. monocytogenes* için ise %100 olarak saptanmıştır.

Gıda kaynaklı patojen bakterilerin saptanması ve miktarının belirlenmesi için multipleks GZ-PZR testi de geliştirilmiştir. Örneğin; Hu ve ark. (2014) gerçek zamanlı PZR yöntemi ile sekiz farklı gıda kaynaklı patojeni (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter sakazakii* ve *Shigella* spp.) eş zamanlı olarak tanımlamak için yeni bir multipleks GZ-PZR protokolü geliştirmişlerdir. Çalışmada patojenlere özgü hedef gen bölgesi olarak (*ssaR*, *hlyA*, *rfbE*, *toxR*, *vvh*, *gyrA*, 16SrRNA ve *ipaH*) kullanılmıştır.

Modifiye edilmiş moleküler boncuk belirleme teknolojisi ile bu patojenlerin örneklerden saptama limiti $1,3 \times 10^3$ kob/g ile $1,6 \times 10^4$ kob/g aralığında bulunmuştur. Geleneksel kültür temelli yöntemlerle karşılaştırıldığında geliştirilen bu yöntemin %100 hassasiyet ve %99 özgüllük ile gıda örneklerinde patojen mikroorganizmaların belirlenmesinde hızlı ve güvenilir bir metod olarak kullanılabilceği belirtilmiştir. Ayrıca, GZ-PZR yöntemi ile 90'dan fazla numunenin üç saat içinde analiz edilebileceği de bildirilmiştir.

Gerçek zamanlı PZR yönteminde gıda patojenlerini tanımlamada örnek hazırlama yöntemleri ayrı bir önem taşımaktadır. Gıda örneklerinin homojen olmaması, bakteri sayısının az olması gibi zorluklar analiz öncesi örneklere ön zenginleştirme yapılarak hedef organizmanın yoğunluğunun artırılması ile önlenmektedir (Hanna ve ark., 2005; Fratamico ve Kawasaki, 2008). Bu teknolojiye kısa bir zenginleştirme uygulanarak 1 kob/g'a kadar tespit limiti düşebilmekte ve özellikle gıdalarda bulunan *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* gibi sıfır toleransa sahip gıda kaynaklı patojen bakterileri belirlemede bile yüksek bir hassasiyet sunabilmektedir (Hanna ve ark., 2005). Nitekim, Garrido-Maestu ve ark. (2018) tavuk, sığır eti, midye, sardalya ve ton balığı örneklerinde canlı *L. monocytogenes*'i tespit etmek için ön zenginleştirme ve filtrasyon esaslı multipleks GZ-PZR yöntemi geliştirmişlerdir. *L. monocytogenes*'in tespit limiti 9.5 kob/25 g bulunmuştur. Yöntemin %96.4 hassasiyet, %100 özgüllük ve %97.4 doğruluk ile gıda örneklerinde kültür temelli yöntemlere alternatif olarak kullanılabilceği belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada ise Maurischat ve ark. (2015) tarafından kanatlı boyun derisi ve taze et örneklerinde *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'u belirlemek için TaqMan prob ile multipleks GZ-PZR yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrulanması amacıyla 60 adet deneysel ve 31 adet doğal olarak kontamine tavuk boyun derisi örneğinde *Salmonella* spp., taraması yapılmıştır. Geliştirilen multipleks GZ-PZR protokolü ile *S. Typhimurium* için 3 kob/25 g ve *S. Enteritidis* için 5 kob/25 g sırasıyla saptama limitine ulaşılmıştır. Yöntemin hassasiyet, özgüllük ve doğruluğunun %100 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, araştırmacılar GZ-PZR yönteminin validasyon çalışmaları ile *Salmonella* spp., tespitinde kullanılan geleneksel kültür yöntemi olan ISO 6579:2002'ye alternatif olduğunu, dolayısıyla *Salmonella* spp., izleme programları için teşhis laboratuvarlarına etkin, güvenilir, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntem sunduklarını bildirmişlerdir.

7.3.4. İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma (Loop Mediated Isothermal Amplification-LAMP) Metodu

İlmiğe dayalı izotermal çoğaltma (LAMP) metodu DNA temelli araştırmalara farklı bir boyut kazandıran yeni bir yaklaşımdır. LAMP metodu Notomi ve ark. (2000) tarafından geliştirilen, çoğaltılması istenen hedef gen bölgelerinin izotermal koşullar (60-65°C) altında, iplikçik yer değiştirmesi esasına dayanmaktadır. Diğer nükleik asit esaslı yöntemlerden farklı olarak, LAMP tekniğinin duyarlılığı yüksek, etkin, hızlı ve düşük maliyetli olması gibi avantajları bulunmaktadır. LAMP metodunda komplike cihazlara gereksinim olmaksızın su banyosu veya standart ısıtıcı blok sayesinde amplifikasyon işlemi kolayca gerçekleştirilebilmektedir (Notomi ve ark., 2000).

LAMP metodunda, hedef gen üzerindeki altı farklı bölgeyi tanıyabilen dört adet primer kullanılmaktadır. Bu nedenle yöntem yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. İplikçik yer değiştirme aktivitesi olan DNA polimeraz (*Bst-Bacillus steareothermophilus*) ve özel tasarımı primerler sayesinde amplifikasyon tek aşamada ve sabit bir sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Böylece çok kısa sürelerde yüksek miktarlarda reaksiyon ürünü elde edilebilmektedir (Notomi ve ark., 2015). Klasik PZR ile karşılaştırıldığında bütün reaksiyonun 60 dakikadan daha kısa sürede gerçekleştiği ve PZR'dan 10-100 kat daha hassas olduğu da belirtilmektedir (Wang ve ark., 2008; Wang ve ark., 2015a). LAMP sonucunda oluşan amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforez, bulanıklık ve/veya DNA'ya bağlanan SYBER green gibi floresan boyalar ile tespit edilebilmektedir (Zende ve ark., 2017).

LAMP metodunda, primer tasarımı oldukça önemlidir. LAMP metodunda, hedef gen üzerinde altı farklı bölgeyi tanıyan, iki adet iç, iki adet dış olmak üzere toplam dört primer bulunmaktadır. Bu primerler, ileri iç primer (FIP), ileri dış primer (F3), geri iç primer (BIP) ve geri dış primer (B3) olarak adlandırılmaktadır. FIP primeri F1c ve F2 olarak iki kısımdan oluşmaktadır. F2 kısmı hedef DNA'da bulunan F2c kısmının tamamlayıcısıdır ve genelde 22-24 baz boyutlarındadır. Benzer şekilde BIP primeri de B1c ve B2 olarak iki kısımdan oluşmaktadır. B2 kısmı hedef DNA'da bulunan B2c kısmının tamamlayıcısıdır. Dış primer F3, hedef gen üzerinde bulunan F3c kısmının tamamlayıcısı iken, dış primer B3 ise B3c kısmının tamamlayıcısıdır (Notomi ve ark., 2000).

Gıda kaynaklı patojen bakteri saptanmasında; Maruyama ve ark. (2003) tarafından *E. coli* O157:H7 *stxA2* geninin belirlenebilmesi amacıyla LAMP me-

todu ilk kez kullanılmıştır. Son yıllarda LAMP metodunun; basit, hızlı, özgül, hassas ve düşük maliyetli olması nedeniyle bazı gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir (Garrido-Maestu ve ark., 2017; Zende ve ark., 2017; Telli ve Doğruer, 2019; Doğruer ve Telli, 2020). LAMP yönteminin gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için PZR testlerine kıyasla daha özgül ve hassas olduğu da kanıtlanmıştır (Yamazaki ve ark., 2008; Chen ve ark., 2015; Doğruer ve Telli, 2020). Chen ve ark. (2015) LAMP metoduyla gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı *Salmonella* serotiplerini belirlemişlerdir. *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* bu yöntem ile tanımlanmıştır. LAMP ile *Salmonella* tespit limiti 2.0×10^1 kob/mL iken, PZR ile 2.33×10^3 kob/mL olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda LAMP yönteminin PZR'a göre hızlı, özgül ve hassas olduğu; bu sebeple gıdalardan *Salmonella* spp.'nin kısa sürede belirlenmesi için kullanılabilirliği rapor edilmiştir. Garrido-Maestu ve ark. (2017) *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* analizi için sistematik LAMP metodu geliştirmişlerdir. Gıda örneklerinde (tavuk göğüs eti, hindi göğüs eti) <10 kob/25 g düzeyini LAMP yöntemi ile tespit edilmiştir. Araştırmacılar, LAMP metodunun, klasik kültür yöntemi ve qPZR ile kıyaslandığında yüksek doğruluk gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Doğruer ve Telli, (2020) deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* varlığının direkt kültür yöntemi ve *toxR* bazlı kantitatif ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma (qLAMP) ve canlı-ölü hücre ayırımı için propidium monoazide (PMA)-qLAMP yoluyla belirlemişlerdir. Direkt kültür yöntemi, qLAMP ve PMA- qLAMP yöntemleri ile sırasıyla örneklerde %4, %6 ve %6 oranında *V. parahaemolyticus* tespit edilmiştir. Araştırmacılar, *toxR* bazlı PMA-qLAMP yönteminin, deniz ürünlerinde canlı *V. Parahaemolyticus*'un kantitatif tespitinde daha yaygın ve etkin kullanılabilir alternatif bir yöntem olabileceğini vurgulamışlardır.

Yüksel ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise; tavuk etlerinden (kanat, göğüs ve bagnet) *L. monocytogenes*'in tespitinde kolorimetrik LAMP metodunun performansı değerlendirilmiştir. Bu amaçla, tavuk etlerine 10^0 - 10^4 kob/25 g *L. monocytogenes* inoküle edilmiştir. Ön zenginleştirme sonrası örnekler geleneksel kültür, GZ-PZR ve LAMP metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerin sonucunda doğal olarak kontamine olmuş 150 örneğin 9'unda (%6) *L. monocytogenes* varlığını tespit etmişlerdir. LAMP, qPCR ve klasik metod ile doğal ve yapay yolla kontamine edilen örneklerden *L. monocytogenes* için aynı tespit performansını gösterdiğini ancak izotermal koşullar

altında *L. monocytogenes*'e hassas, özgül, basit ve düşük maliyet gibi özelliklere sahip olan kolorimetrik LAMP yönteminin kısıtlı imkanlara sahip laboratuvarlarda PZR'a alternatif hızlı bir tespit metodu olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için farklı tipte ilmiğe dayalı izotermal çoğaltma (LAMP) yöntemleri de geliştirilmiştir. Örneğin; multiplaks LAMP (mLAMP), reverse transkripsiyon LAMP (RT-LAMP), gerçek zamanlı LAMP (GZ-LAMP) ve *in situ* LAMP bu yöntemlerden bazılarıdır (Han ve Ge, 2010; Shao ve ark., 2011; Ye ve ark., 2011, Wang ve ark., 2015b). Gıda güvenliği açısından et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik analizlerinde kullanılan yöntemlerin daha hızlı, hassas ve güvenilir olması bir gerekliliktir. LAMP metodunun, gıda kaynaklı patojen bakterilerin hızlı amplifikasyonu, yöntemin özgünlüğünün yüksek olması ve daha kısa sürede sonuç alınabilmesi nedeniyle gıda laboratuvarlarının rutin izleme programlarında, salgın hastalıkların erken tanısında ve epidemi risklerini azaltmada potansiyel bir uygulama sağlayacağı da düşünülmektedir.

7.3.5. Nükleik Asit Dizi Temelli Çoğaltma (Nucleic Acid Sequence Based Amplification-NASBA) Metodu

Compton tarafından 1991 yılında keşfedilen nükleik asit dizi temelli çoğaltma (NASBA) metodu yaygın olarak RNA fragmanlarının seçici amplifikasyonu için kullanılmaktadır. NASBA metodu izotermal koşullar altında nükleik asit ya da RNA eşdeğerlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde 41°C sıcaklıkta izotermal koşullarda, üç farklı enzim ve primer kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmektedir (Compton, 1991). Çoğaltma işleminde karışıma RNA'dan DNA sentezini sağlayan kanatlı Myeloblastosis virüsüne (AVM) ait ters transkriptaz (RT), RNA-DNA hibridi oluştuğunda bu iplikçikteki RNA'yı parçalayan *E. coli* RnazH ve DNA'dan RNA sentezi sağlayan faj kökenli RNA polimeraz (T7 RNA polimeraz) olmak üzere üç farklı enzim ve ayrıca iki primer ilave edilmektedir (Hahm ve ark., 2006). NASBA metodunda amplifikasyon ürünleri jel elektroforez, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), enzime bağlı jel testi, elektrokemilüminesan (ECL) ve moleküler boncukların eş zamanlı izlenmesi yöntemleri ile saptanabilir (Moon ve ark., 2022). NASBA yönteminin diğer nükleik asit esaslı yöntemlere göre hızlı olması, izotermal koşullarda çalışması ve tek zincirli RNA'yı çoğaltabilmesi, denatürasyona gerek duyulmadan problemlerin bağlanabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır.

(Böhmer ve ark., 2009). Ayrıca, NASBA metodunun amplifikasyon için termal siklus cihazına bağımlı olmaması ve laboratuvar cihaz donanımının kısıtlı olduğu durumlarda potansiyel teşhis laboratuvarlarının işleyişini kolaylaştırması nedeniyle klasik PZR veya gerçek zamanlı PZR gibi diğer tespit metodlarına göre avantajları bulunmaktadır.

NASBA, RNA virüslerinin saptanması için daha yaygın olarak kullanılsa da gıda ve çevre örneklerinde, örneğin *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *V. cholerae* ve *E. coli* gibi patojen bakteriler de saptanabilmektedir (Fykse ve ark., 2007). mRNA molekülleri genellikle daha kısa yarı ömre sahip olduklarından, canlılık tespiti için DNA tabanlı tespit yöntemlerine göre tercih edilmektedir. NASBA, bir RNA fragmanını amplifiye edebilmekte, bu nedenle canlı hücre tespitinde değerli bir yöntem olarak kabul görmektedir (Zhai ve ark., 2019).

NASBA metodu gıda, klinik ve çevresel örneklerdeki patojen mikroorganizmaların tespitinde geniş bir uygulama alanı bulmaktadır (Min ve Baemner, 2002; Churrua ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2014). NASBA metodu *L. monocytogenes* 16S rRNA ve çeşitli mRNA dizileri hedef alınarak canlı hücrelerin tespitine imkân sağlamıştır. NASBA metodu ile hedef gen olarak *hlyA* mRNA kullanılarak et veya deniz ürünlerinde canlı *L. monocytogenes*'in tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Uyttendaele ve ark., 1995; Cook, 2003; Liu ve ark., 2008).

NASBA metodu ile et örneklerinden *Salmonella* spp.'ye özgü primerler tasarlanarak mRNA dizilerinin çoğaltılması hedeflenmiştir. Zhai ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada gıda örneklerinde gerçek zamanlı NASBA tekniği ile 12 saatlik ön zenginleştirmeden sonra *Salmonella* spp.'nin 7×10^1 kob/mL düzeyinde tespit edilebildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, yöntemin hassasiyetinin yüksek olduğunu ve canlı hücrelerin de tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, farklı gıda matrislerinde de (domuz eti, sığır eti gibi) *Salmonella* spp., tespitinde başarıyla kullanıldığını ve tespit limitinin 10 kob/25 g/mL olduğunu da rapor etmişlerdir (Zhai ve ark., 2019). Bu çalışmada geliştirilen gerçek zamanlı NASBA metodu sayesinde hayvansal kaynaklı gıdalardan *Salmonella* spp.'nin hızlı, özgül ve hassas bir şekilde tespitinin yapılacağı de vurgulanmıştır.

7.3.6 DNA Mikrodizi (DNA Microarray) Teknolojisi

DNA mikrodizi teknolojisi belirli gen bölgelerine özgü nükleotid dizi problemleri kullanılarak, bilgisayar tarafından sinyal sistemiyle tanınması temeline dayalıdır.

nan bir yöntemdir. Bu teknolojiye bakteriyel tanı için *gyrA*, *parE*, 16S rRNA gibi DNA'ya özgü korunmuş ve özel gen bölgelerini hedef alan problr kullanılmaktadır (Tekintaş ve Hoşgör Limoncu, 2018). Oligonükleotid çipleri, oligonükleotid dizi ve tamamlayıcı DNA (complementary DNA-cDNA) diziler olmak üzere farklı mikrodiziler bulunduğu belirtilmektedir. Oligonükleotid diziler, oligonükleotid problrı içeren cam slaytlardan veya çiplerden oluşmaktadır ve bu problr 25 ile 80 bç aralığında kimyasal olarak sentezlenen kısa dizilerdir (Severgnini ve ark., 2011). DNA mikrodizi teknolojisi genel olarak gen ekspresyon çalışmalarında kullanılsa da oligonükleotid dizilerin gıda kaynaklı patojen tespiti alanında da yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Law ve ark., 2015). Bu metotla, örneğe ait nükleik asit parçaları (DNA, mRNA veya cDNA) floresan boya ile işaretlenmekte ve sonrasında tek zincirli şekle dönüşmesi için denatüre edilmektedir. Bu parçalar ilgili oligonükleotid problara bağlanarak hibridize olmaktadır. Sonuçlar prob örnek kompleksinden yayılan floresan sinyalin tespiti ile görsel olarak değerlendirilmektedir. Floresan boya yoğunluğu her bir işaretli nükleik asit parçasının konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Lauri ve Mariani, 2009).

Oligonükleotid DNA mikrodizi teknolojisi kullanarak *Shigella* ve *E. coli*'nin 15 farklı serotipi başarıyla tespit edilebilmiştir (Li ve ark., 2006). Wang ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada oligonükleotid dizi teknolojisi kullanılarak 22 gıda kaynaklı patojen mikroorganizmanın tanımlandığı bildirilmiştir. Bu türlerden bazıları ise; *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. jejuni*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *Cl. perfringens*, *Shigella spp.*, ve *Salmonella spp.*'dir. Araştırmacılar, yöntemin özgüllüğünün yüksek ve hassasiyetinin ise 10^2 kob/mL düzeyinde olduğunu da belirtmişlerdir. Oligonükleotid mikrodizi tekniği, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti ve tanımlanmasında hızlı, yarı-kantitatif ve çok farklı gen bölgelerinin taranmasına izin vermektedir. Bu sayede bir uygulama ile çok sayıda gıda kaynaklı patojen tanımlanabilmektedir (Wang ve ark., 2007). Ancak, bu verimli teknolojinin pahalı olması, hibridizasyon ve etiketlemede yaşanan sorunlar, farklı çiplerin aynı hassasiyette olmaması ve sonuçların yorumlanmasında biyoinformatik desteğe gereksinim duyulması gibi dezavantajlarının da bulunduğu belirtilmektedir (Bal ve Budak, 2012).

Nükleik asit esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde bazı avantaj ve kısıtlı yönleri Tablo 3'te özetlenmiştir (Zhao ve ark., 2014; Law ve ark., 2015).

Tablo 3. Nükleik Asit Esaslı Yöntemlerin Bazı Avantaj ve Dezavantajları

Tespit Yöntemi	Avantaj	Dezavantajları
PZR	Hassas, güvenilir ve özgüldür Otomatizedir	PZR inhibitörlerinden etkilenir DNA'nın saflaştırmasını gerektirir Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek zordur
Multipleks PZR	Hassas, güvenilir ve özgüldür Otomatizedir Çoklu patojen tespit edilebilir	PZR inhibitörlerinden etkilenir DNA'nın saflaştırmasını gerektirir Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek zordur Primer dizaynı çok önemlidir
Gerçek zamanlı PZR	Hassas, özgül, hızlı, tekrarlanabilir Amplifikasyon sonrası ürünlerin jelde görüntülenmesine gerek yoktur İşlem anında PZR amplifikasyon ürünleri izlenir	Cihaz ve malzemeleri pahalıdır PZR inhibitörlerinden etkilenir Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek zordur Deneyimli personel gerektirir Çapraz kontaminasyon meydana gelebilir
NASBA	Hassas, özgül ve düşük maliyetlidir Termal döngü cihazı gerektirmez Canlı mikroorganizmaları tespit edebilir	Canlı mikroorganizmalar gerektirir RNA'nın işlenmesinde güçlüklerle karşılaşabilmektedir
LAMP	Duyarlı, özgül ve düşük maliyetlidir Kullanımı kolaydır Termal döngü cihazı gerektirmez	Primer tasarımı karmaşıktır Bilinmeyen veya sekanslanmamış hedef dizileri tespit etmek zordur
DNA Mikrodizi	Hassas, özgül ve verimlidir Birden fazla patojenin tespit etme olanağı sağlar Serotip tespit etme olanağı sağlar İş gücü düşüktür	Maliyeti yüksektir Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek zordur Deneyimli personel gerektirir Oligonükleotid problemleri ve hedef genlerin işaretlenmesini gerektirir

7.4. İmmünolojik Temelli Yöntemler

Gıda kaynaklı mikroorganizmaların veya toksinlerinin belirlenmesi ve karakterizasyonunda antijen-antikor esasına dayalı immünolojik yöntemler de kullanılmaktadır (Fung, 2009). Bu yöntemler, düşük moleküler ağırlığa sahip mikotoksin, pestisit veya veteriner ilaç kalıntıları gibi gıda kontaminantlarının belirlenmesi amacıyla da tercih edilmektedir (Aras, 2011; Demir ve Ağaoğlu, 2021). İmmünolojik temelli yöntemler antikorun antijene özel olarak bağlanması esasına dayanmaktadır. Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların veya toksinlerinin analizinde çok çeşitli antikorlar kullanılmaktadır. Bir immünolojik yöntemin hassasiyetini büyük ölçüde kullanılan antikorun özelliği belirlemektedir (Zhao ve ark., 2014). Gıda mikrobiyolojisi alanında hem poliklonal ve hem de monoklonal antikorlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Antijen ve antikor reaksiyonlarını uygulamanın birçok yöntemi vardır ancak bu testler içerisinde en yaygını Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA), Yanal Akış Immuno Testi (Lateral Flow Immunoassay-LFA) ve Immuno Manyetik Ayırma (Immunomagnetic Separation-IMS)'dir (Fung, 2009; Law ve ark., 2015).

7.4.1. Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA)

Enzime bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların gıdalardan tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao ve ark., 2014). Bu yöntemde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte olup immünolojik reaksiyon enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. ELISA testinin direkt, indirekt ve sandviç ELISA gibi farklı şekilleri olmasına rağmen en sık kullanılanı ise sandviç ELISA yöntemidir (Fung, 2009). Sandviç ELISA'da aynı antijene bağlanabilen yakalama ve enzim işaretli tespit antikoru olmak üzere iki farklı antikor bulunmaktadır (Fung, 2009; Zhao ve ark., 2014). Sandviç ELISA'da yönteminin prensibi şu şekildedir: kuyucuk tabanı antikorla kaplanmaktadır. Antijeni içeren örnek daha sonra ilave edilmektedir ve antijen-antikor kompleksinin oluşması beklenmektedir. Antijene bağlanan yakalama antikoru ilave edilmektedir. Yakalama antikoruna özgü enzime bağlı ikinci tespit antikoru ilave edilmektedir ve enzimi görülebilir şekle dönüştürmek için ise substrat konulmaktadır. Reaksiyondaki renk değişimi ise spektrofotometrik cihazlar ile ölçülmektedir (Yalçın, 2016). Sandviç ELISA yöntemi hem hassas hem de oldukça stabildir (Zhao ve ark., 2014). Son yıllarda ise

nanoteknoloji alanındaki gelişmelerle paralel olarak, örneklerden patojenlerin immüno-manyetik olarak ayrılması gibi ELISA testlerinde de farklı yaklaşımlar gerçekleştirilmektedir. Bu gibi yöntemlerin ise testin duyarlılığını ve özgüllüğünü artırdığı da belirtilmektedir (Güven ve Azizoğlu, 2022).

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların hızlı tespiti için sandviç ELISA kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin; Zhu ve ark. (2016) et örneklerinde gıda patojenlerinden *B. cereus* varlığını sandviç ELISA ile tespit etmişlerdir. Bu analizdeki *B. cereus*'un tespit limiti 0.9×10^3 hücre/mL olarak bulunmuştur. *B. cereus*'un et örneklerinden geri kazanım oranı ise %94.9 ile %98.4 arasında değişmiştir. Bu sonuçlar, sandviç ELISA'nın gıda örneklerinde *B. cereus* tespitinde etkili olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde sandviç ELISA ile et ve et ürünlerinde *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., ve *L. monocytogenes* gibi önemli gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tespit edildiği de bildirilmiştir (Lilja ve Hanninen, 2001; Taha ve ark., 2010; Coutu ve ark., 2014). Ayrıca, ELISA yönteminin *S. aureus* enteroksinleri (A, B, C, D ve E) *Clostridium perfringens* (α , β ve ϵ), *Clostridium botulinum* nörotoksini (BoNT/A ve BoNT/B) ve *E. coli* Stx1 ve Stx2 gibi et ve et ürünlerinde (sığır, tavuk, koyun eti ve sığır kıyma) bulunan toksinlerin tespiti için de yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Cheng ve Stanker, 2013; Khan ve ark., 2015; He ve ark., 2016; Kahya ve ark., 2016).

Bazı ELISA testleri örneğin Vitek Immuno Diagnostic Assay Sistem (VIDAS), Enzyme Immuno Assay (EIA) ve Transia gibi tamamen otomatik hale getirilmiştir (Glynn ve ark., 2006). Bu otomatize sistemler sayesinde *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, Stafilokokkal enterotoksinleri ve *Campylobacter* spp., gibi gıda kaynaklı patojenlerin veya toksinlerin kısa sürede saptanabileceği belirtilmektedir (Yalçın, 2016).

VIDAS, Enzyme Bağlı Immunosorbent Deneyi (ELISA) ile kombine edilmiş immüno enzimatik bir yöntemdir. ELISA'ya benzer şekilde enzim bağlan-tılı floresan analiz (ELFA) prensibi kullanılmakta olup sonuçların değerlendirilmesinde testin daha duyarlı olduğu belirtilmektedir. Genellikle, test kitine göre değişmekle birlikte öz zenginleştirme sonrası hedef mikroorganizmanın 45 dakika ile 2 saat arasında tespit edildiği testler bulunmaktadır (Yalçın, 2016).

VIDAS sisteminde cihazın katı faz haznesi (Solid Phase Receptacle-SPR) analiz süresince reaktiflerin taşınması ve örnekleme için pipet görevi görmektedir. SPR'nin iç yüzeyi hedef antijenleri tutmak için test edilecek patojen veya toksine ait antikolar ile kaplanmıştır. Testlerde kullanılan antikolar monoklonal antikolardır. Analizin reaktifleri, kapalı reaktif şeritleri içerisinde kullanıma hazır ve önceden dağıtılmış durumdadır. Deney için özel hazırlanan protokol bilgisayar sistemi tarafından son aşamaya kadar yürütülmektedir. Analizin son aşamasında ise substrat floresans veren ürünlere hidrolize olmakta ve bu floresans spektrometrik olarak ölçülerek cihaz tarafından sonuç pozitif veya negatif şeklinde kalitatif olarak alınmaktadır (Vaz-Velho ve ark., 2000; Yalçın, 2016).

Meyer ve ark. (2010) et ve et ürünlerinde *Salmonella* spp., aranmasında VIDAS ve klasik kültür yöntemini kıyasladığında VIDAS yönteminde iki kat daha fazla pozitif örnek tespit edilebildiğini bildirmiştir. Özellikle analiz süresinin kısaltılması sayesinde et ve et ürünlerinde *Salmonella* tespitinde VIDAS sisteminin verimli bir tarama yöntemi olduğu da gösterilmiştir (Meyer ve ark., 2010). Nitekim, klasik kültür teknikleriyle tespiti zaman alan gıda kaynaklı patojen (*L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 ve *Campylobacter* spp., gibi) analizlerinde, VIDAS sistemi ile analiz sürelerinin 25-48 saate indirilebileceği belirtilmiştir (Yalçın, 2016).

VIDAS sisteminin etkinliğinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada Sewell ve ark. (2003) 324 adet doğal olarak kontamine gıda örneğinde VIDAS ve klasik kültür yöntemi ile *Listeria* spp. varlığını araştırmışlardır. VIDAS cihazının etkinliği %97.5 olarak bulunurken hassasiyet %98.1, özgüllük ise %97 bulunmuştur. Kevenk ve Koluman (2022) sığır kıymalarında *L. monocytogenes* varlığını VIDAS ve ISO 11290:1 klasik kültür yöntemi karşılaştırarak araştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen verilere göre VIDAS yöntemi ISO 11290-1 metodu ile karşılaştırıldığında duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranı sırasıyla %99.2, %73.6 ve %90 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, her iki yöntem arasında anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen, VIDAS'ın analiz süresi açısından değerlendirildiğinde daha üstün olduğunu belirtmişlerdir. Gıda enfeksiyon ve zehirlenmelerinde hızlı ve güvenilir tanının çok önemli olduğu bilindiğinden, analiz süresinin kısa olmasından dolayı VIDAS yönteminin daha çok tercih edilebileceğini de vurgulamışlardır.

7.4.2. Yanal Akış Immuno Testi (Lateral Flow Immunoassay-LFA)

İmmünolojik tespit yöntemlerinden biri de yanal akış immuno veya immuno kromatografik kart testinin kullanılmasıdır. Testin hızlı sonuç vermesi, düşük maliyetli, kullanımının kolay, yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan testlerdir (Sahn ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2014). Bu testlerin kaset şekilleri dışında kullanım amacına bağlı olarak geliştirilmiş farklı tasarımları (daldırma vs) da bulunmaktadır. LFA testinde de antijenlerin tespiti sandviç ELISA'ya benzemektedir. Testte kullanılan renklendirici madde ise altın nanopartikülleri veya kolloidal altın olup LFA membranı üzerindeki test bölgesindeki renk oluşumunu sağlamaktadır (Ching ve ark., 2015).

Yanal akış immuno testi çeşitli adımlardan oluşmaktadır. İlk olarak, membran üzerinde iki anti-immünoglobulin G antikor sabitlenir. İkinci olarak, membran üzerinde protein bağlama yeteneğine sahip olan serbest bölge, membranda spesifik olmayan antikor veya antijenin etkileşimini azaltmak için kimyasallar tarafından bloke edilir. Üçüncü olarak, örnek şeride bırakılır ve numune membranın sonuna doğru hareket eder. Sonuç olarak, iki antikorla etkileşime giren örnek membran üzerinde gözle görülür çizgiler oluşturur. Bir immünokromatografik şeridin performansı, bir numunenin hareketine ve antikor-antijen arasındaki etkileşime bağlıdır (Bahadır ve Sezgintürk, 2016).

Yanal akış immuno (LFA) test kitinde üç reaksiyon bölgesi bulunmaktadır. Birinci kuyucuk hedef antijenle reaksiyona girecek antikorları içermekte ve bu antikorlar renk partikülleri ile bağlanmaktadır. Ön zenginleştirilmesi yapılan gıda örneği bu kuyucuğa eklenmekte ve örnekte aranan mikroorganizma varsa antikorlarla reaksiyona girmektedir. Oluşan antijen-antikor kompleksleri ikinci bölgede toplanmaktadır. İkinci bölge, hedef antijen ile reaksiyona girebilecek şekilde düzenlenmiş ikinci bir antikor grubunu içermektedir. Mikroorganizma gıda örneğinde varsa test çizgisine gelen antijen-antikor kompleksi test çizgisine sabitlenmiş antikorlara da bağlanarak, test çizgisi alanında gözle görülebilen renkli bir çizgi oluşmaktadır. Fazla antikorlar ise üçüncü bölgede yığılmaya devam etmektedir. Üçüncü bölge ilk antikorlar ile reaksiyona girebilen diğer bir üçüncü çeşit antikora sahiptir. Böylece üçüncü bölgede ikinci bir renk daha oluşmaktadır ki bu çizgiye de "kontrol" çizgisi denilmektedir. Bu da testin çalıştığını göstermekte olup tüm bu aşamalar yalnızca on dakikada gerçekleşmektedir (Aras, 2011).

Gıda kaynaklı patojen bakterileri tespit etmek için yanal akış testinin duyarlılığını artırmak için uygulanabilecek yeni stratejiler sunulmaktadır. Bu stratejiler arasında yeni etiket uygulamalarının geliştirilmesi, yanal akış immuno test biçimlerinin tasarlanması, diğer yöntemlerle birleştirilmesi ve sinyal amplifikasyon sistemleri geliştirilmesi şeklindedir (Sahn ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda gıdalarda LFA tekniği ile *E. coli* O157:H7'nin 2.3×10^3 kob/mL, *Listeria monocytogens*'in 95 kob/mL, *S. aureus*'un 3 kob/mL, shiga toksin üreten *E. coli*'nin ise 10^4 kob/mL ve *Salmonella* spp., 10^4 kob/mL hassasiyetinde tespit edilebildiğini bildirilmektedir (Zhao ve ark., 2010; Cho ve Irudayaraj, 2013; Liu ve ark., 2013; Yonekita ve ark., 2013; Chen ve ark., 2014).

7.4.3. Immuno Manyetik Ayırma (Immunomagnetic Separation-IMS) Tekniği

Immuno manyetik ayırma (IMS) tekniği gıda örneklerinden mikroorganizmaların aranması için kullanılan hızlı, yüksek duyarlılığa sahip ve uygulanması kolay bir yöntemdir. Bu yöntemin prensibi ise özel antikolarla kaplanmış manyetik boncuk veya nanopartikül gibi paramanyetik parçacıklar sayesinde gıda numunesinden hazırlanan süspansiyondaki hedef mikroorganizmaları yakalamak için kullanılmaktadır. Gıdaların ön zenginleştirme aşamasında umut veren bir gelişme olduğu da bildirilmektedir (Wang et al., 2020a). IMS tekniği hedef bakterinin kontamine ortamdan alınarak küçük hacimlerde konsantre edilmesine olanak sağlamaktadır. IMS tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda analiz süresinin kısılmasının yanı sıra mikroorganizmaların tespitinde çalışmanın hassasiyetini arttırdığı da belirtilmektedir (Bi ve ark., 2020). Günümüzde, IMS tekniği birçok saptama yöntemiyle (örneğin; immünolojik esaslı yöntemler, nükleik asit esaslı yöntemler, floresan yöntemler ve biyosensörler gibi) hedef mikroorganizmaların kısa zamanda, etkili ve hızlı teşhisi için birleştirildiği belirtilmektedir (Wang et al., 2020a). Yapılan bir çalışmada, IMS-LAMP yöntemi ile sığır etlerindeki *E. coli* O157:H7'nin etkin olarak kullanılabilceği ortaya konmuştur. Bu yöntem ile *E. coli* O157:H7'nin et örneklerinden saptanmasında 4 saatlik bir ön zenginleştirme işleminden sonra 6 saat içinde 3×10^1 kob/mL düzeyinde tespit edilebildiği belirtilmiştir (Qin ve ark., 2018).

İmmünolojik esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde bazı avantaj ve kısıtlı yönleri Tablo 4'te özetlenmiştir (Zhao ve ark., 2014; Law ve ark., 2015).

Tablo 4. İmmünolojik Esaslı Yöntemlerin Bazı Avantaj ve Dezavantajları

Tespit Yöntemi	Avantaj	Dezavantajları
ELISA	Özgüldür Zaman ve işçilikten tasarruf sağlamak için otomatikleştirilebilir Bakteri toksinlerin tespit edilmesine olanak sağlar Çok sayıda numuneyi işlenebilir	Hassasiyeti düşüktür Yanlış negatif sonuçlar alınabilir Yakın ilişkili antijenlerle çapraz reaksiyona neden olabilir Ön zenginleştirme gereklidir Deneyimli personel gerektirir Antikorların veya antijenlerin işaretlenmesini gerektirir
Yanal Akış Immuno Testi	Hassas, güvenilir ve özgüldür Maliyeti düşüktür Kullanımı kolaydır Bakteri toksinlerin tespit edilmesine olanak sağlar	Antikorların veya antijenlerin işaretlenmesini gerektirir
Immuno Manyetik Ayırma	Hassas ve özgüldür Diğer testlerle birlikte kullanılabilir Kontamine örneklerden hedef mikroorganizmanın izole edilebilmesi kolaydır Analiz süresini kısaltmaktadır	Maliyeti yüksektir

7.5. Biyosensör Temelli Yöntemler

Biyosensörlerin, farklı uygulama alanları (Tıp, eczacılık, tarım ve savunma sanayi gibi) olmasına rağmen gıda güvenliği ve kalite kontrolünün sağlanması amacıyla da kullanılmaktadır. Biyosensörler mikrobiyolojik, kimyasal kontaminantlar, alerjen maddeler, toksinler, işleme esnasında ortaya çıkan kontaminantların tespitinde ve gıda bileşen analizlerinde kullanılabilir (Baş ve Deniz, 2015).

Biyosensörler, biyobileşenlerin (reseptör) ve fiziksel bileşenlerin (transdüser) bir araya getirilmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Biyosensörler, biyolojik (biyoreseptör) ve dönüştürücü (transdüser) olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Biyosensörün, algılama kısmı biyolojik moleküllere dayanırken, dönüştürücü kısmı ise fizikokimyasal reaksiyonu ölçülebilir şekilde dönüştürmektedir (Muti İstek ve Bulca, 2021). Biyosensörlerin gelişiminde anahtar

rol oynayan biyoreseptörler, analiz edilecek madde ile seçici olarak etkileşime girebilen oldukça duyarlı biyolojik yapılardır. Bu yapılarda, biyolojik moleküller (antikor, enzim, protein ve nükleik asitler gibi) veya biyolojik materyaller (mikroorganizmalar, hücre ve doku gibi) kullanılabilir (Tüylek, 2017; Wu ve ark., 2019).

Biyosensörlerin çalışma prensibi ise; çözelti içerisindeki hedef analitin (analiz edilecek madde), reseptör yüzeyine enjekte edilmesi ile başlamaktadır. Hedef analit reseptör yüzeyinde bulunan tanıyıcı moleküllere tutunmaktadır. Tutunma işlemine bağlı olarak, ölçülebilir biyokimyasal tepkime oluşmaktadır. Bu sinyal analitin yoğunluğu ile doğru orantılıdır (Yılmaz, 2021). Oluşan bu biyokimyasal tepkime; elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, kalorimetrik ve manyetik biyosensörler ile enerjiyi başka bir enerji biçimine dönüştüren sistemler ile gerçekleştirilmektedir (Xiu ve Ying, 2011; Tüylek, 2017). Farklı özelliklerde dönüştürücü sistemlerinin kullanılabilmesine karşın, sıklıkla kullanılan dönüştürücülerin elektrokimyasal, optik sinyal işleme ve ölçme sistemleri olduğu da belirtilmektedir (Baş ve Deniz, 2015; Wang ve ark., 2020b). Nitekim, elektrokimyasal biyosensörler, sağladıkları üstün özellikler ile geleneksel yöntemlerin bir alternatifi haline gelmiştir. Bu yüzden elektrokimyasal biyosensörlerin, gıda kaynaklı patojen analizleri başta olmak üzere günümüzde birçok analiz için kullanım alanı bulduğu da bildirilmektedir (Muti İstek ve Bulca, 2021; Mei ve ark., 2022). Elektrokimyasal biyosensörlerin özellikle mikroorganizma tespit limitinin düşük olması, basit, hızlı, ekonomik olma gibi özellikleri sebebiyle de kalıntıların hem tekli hem de çoklu tayininde tercih edildiği de belirtilmektedir (Wu ve ark., 2019; Silva ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020b; Muti İstek ve Bulca, 2021; Mei ve ark., 2022).

Wang ve ark. (2020b) tarafından yapılan bir çalışmada gıda kaynaklı patojen olan *E. coli* O157:H7'nin kalitatif ve kantitatif tespiti için manyetik boncuk temelli elektrokimyasal immünolojik test yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada, *E. coli* O157:H7'nin yüksek duyarlılıkta tespiti, algılama elemanları olarak birbirine bağlı altın elektrotları kullanan homojen bir manyetik tanecik tabanlı elektrokimyasal empedans sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Sistem için elektrot modifikasyonundan ve örnek matrisi adsorpsiyonundan kaçınılmıştır ve algılama duyarlılığı büyük ölçüde iyileştirilmiştir. Bu yöntemde *E. coli* O157:H7 için tespit limiti 10^2 kob/mL olarak saptanmıştır. Ayrıca yöntem geleneksel ELISA metodu ile kıyaslandığında tespit limitinin üç kat daha düşük olduğu da rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2020b).

Başka bir çalışmada ise tavuk et örneklerinden *E. coli* tespiti için elektrokimyasal biyosensör tasarlanmıştır. Dondurulmuş tavuk etinde *E. coli* K12, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve yüzey plazmon rezonans görüntüleme teknikleriyle incelenmiştir. Çalışmada anti-*E. coli* antikoru ilk olarak fiziksel sorpsiyon tekniği ile altın yüzeyi üzerine sabitlenmiştir. Çalışmada, *E. coli* K12'nin tespit limitinin 10^3 kob/mL olarak saptandığı bildirilmiştir. Bu tespit limitinin, ELISA tekniğiyle elde edilen sonuçlardan daha iyi olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca, biyosensör teknolojisinin dondurulmuş tavuk etinde *E. coli* K12'nin tespitinde başarı ile kullanılabilceği de rapor edilmiştir (Helali ve ark., 2018).

S. aureus'un enterotoksijenik suşları tarafından salgılanan *seb*'in gıda zehirlenmesine neden olan bakteriyel bir toksin olarak tespiti büyük önem taşımaktadır. Nodoushan ve ark. (2019)'ın yaptıkları çalışmada indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve altın nano kestaneler (AuNU'lar) ile modifiye edilmiş bir perde baskılı elektrot kullanarak *seb* tayini için elektrokimyasal aptasensör geliştirmişlerdir. Çalışmada 5,0 ila 500,0 fM arasında geniş bir doğrusal aralık elde edilmiş, tespit limiti 0,21 fM olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar, aptasensörün seçicilik ve tekrarlanabilirlik düzeyinin yeterli olduğunu, ELISA kitleriyle kıyaslandığında ise performansın daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Nodoushan ve ark., 2019). Benzer bir çalışmada ise altın nanoparçacık (AuNPs@MIL-101) floresan ve yüzeyi geliştirilmiş raman saçılması (SERS) sinyallerine dayanarak, gıdalarda bulunan *S. aureus seb*'in 1-500 pg/mL ve 1-750 pg/mL düzeyinde ölçülebileceği belirtilmiştir. Testin tespit limitinin 0,5-0,2 pg/mL düzeyinde oldukça düşük olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca, geliştirilen aptasensörün gıda matrisinin karmaşık yapısında toksin varlığını belirlemede yüksek bir seçiciliğe sahip olduğu da gösterilmiştir (Wang ve ark., 2022).

Ohk ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada tüketime hazır sığır, tavuk ve hindi etlerinden *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Enteritidis* tespiti için fiber optik biyosensör geliştirilmiştir. Gıda örnekleri 18 saat ön zenginleştirmeden sonra optik biyosensör ile patojenler tespit edilmiştir. Optik biyosensörün tespit limiti $<10^3$ kob/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada, optik biyosensör ile ön zenginleştirilmiş et örneklerinden 24 saatten daha kısa bir sürede her bir patojenin başarıyla tespit edildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, multipleks fiber optik sensör sayesinde aynı et örneğinden birden fazla tekli

patojen algılama sensör kullanımını ortadan kaldırarak üç patojenin de aynı anda saptanabileceğini belirtmişlerdir.

Biyosensörlerin; basit, hızlı, gerçek zamanlı, otomasyona uygun ve taşınabilir olma özelliği olduğu belirtilmektedir. Bu özelliklerin yanı sıra, biyosensörler çalışma prensiplerinin gereği olarak hedef molekülün analizinde biyolojik etkileşimlerin kullanılmasından dolayı seçiciliği ve doğruluğu yüksek olan sistemlerdir. Biyosensörler, laboratuvarından bağımsız olarak analiz yapılabilmesi nedeniyle günümüz üretim ve denetim süreçlerinin gerçekleştirilmesi aşamasında önemli kolaylıklar sağlamaktadır. Küçük hacimlerde analiz gerçekleştirilmesi ile daha az örnek ve kimyasala ihtiyaç duyulmakta, böylece analiz maliyeti önemli ölçüde azaltılmaktadır. Kullanım kolaylığı veya otomasyona uyarlanabilmesi nedeniyle uzman personel gereksinimini azaltarak işletme ve analiz maliyetini düşürdüğü de belirtilmektedir. Gıda matrisinin karmaşık yapısı ve tekstürel özellikler nedeniyle analiz performansında düşüş olabileceği belirtilirken, bu dezavantajlı durumun sadece saha analizleri açısından önemli olduğu ancak laboratuvarlar açısından bakıldığında parçalama, filtreleme ve santrifüj gibi temel ekipmanların varlığında bunun bir dezavantaj olarak kabul edilmemesi gerektiği de belirtilmektedir (Muta İstek ve Bulca, 2015).

Biyosensör esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde bazı avantaj ve kısıtlı yönleri Tablo 5'te özetlenmiştir (Zhao ve ark., 2014; Law ve ark., 2015).

Tablo 5. Biyosensör Esaslı Yöntemlerin Bazı Avantaj ve Dezavantajları

Tespit Yöntemi	Avantaj	Dezavantajları
Elektrokimyasal biyosensör	Çok sayıda numuneyi işleyebilir Otomatizedir Etiketlemeye gerek yoktur	Özgüllüğü düşüktür Düşük miktarda mikroorganizma içeren numuneleri analiz etmek için uygun değildir Gıdanın yapısı analizi etkileyebilir Yıkama aşaması çoktur
Optik biyosensör	Hassasiyeti yüksektir Gerçek zamanlı veya gerçek zamanlıya yakın tespit sağlar Etiketlemeye gerek yoktur	Maliyeti yüksektir

7.6. Sonuç

Et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde klasik kültür teknikleri hala altın standart olarak önemini korusa da bu yöntemlerin uzun sürmesi, maliyetli olması ve yoğun iş gücü gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Dolayısıyla, geleneksel yöntemlerin kısıtlı yanlarının giderilmesi; gıda kaynaklı patojenlerin kısa sürede tespit edilebilmesi için daha yeni ve hızlı tanı yöntemlerin araştırılmasına ve geliştirilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Günümüzde, hızlı ve yeni yöntemler ile et ve et ürünlerindeki patojen mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyon ve intoksikasyonları önlemek amacıyla kısa sürede sonuç alınabilen, duyarlı, seçici, kolay ve ekonomik teknikler ile bu etkenlerin tanımlanması ön plana çıkmaktadır.

Nükleik asit esaslı yöntemler (PZR, mPZR ve GZ-PZR gibi) gıda kaynaklı patojenlerin ve toksinlerinin tespiti için klasik kültür tekniklerine göre yüksek duyarlılık, özgüllük ve daha kısa analiz süresi sunmaktadır. Ancak, bu tekniklerin çoğu deneyimli personel ve özel cihazlar da gerektirmektedir. NASBA ve LAMP gibi alternatif nükleik asit esaslı yöntemler gıda kaynaklı patojen ve toksinlerin tespitine olanak sağlamaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin ve toksinlerinin tespiti için ELISA, yanak akış testi gibi immünolojik temelli yöntemler de sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, son zamanlarda çok sayıda biyosensör tabanlı yöntem hızlı ve basit olması nedeniyle et ve et ürünlerinden kaynaklı patojen veya toksin tespiti amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Gıda kaynaklı patojen bakterilerin saptanması için birkaç hızlı yöntemin kombinasyonu da mümkündür, çünkü sadece bir yönteminin kullanılması tespit edilen patojeni doğrulamak için yeterli olmayabilir. Bu amaçla, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların saptanması için hızlı ve yeni yöntemlerin farklı kombinasyonlarının etkilerini ortaya koyan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, gıda mikrobiyolojisi alanında yaşanan bu gelişmelere paralel olarak, gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla, et ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde kullanılacak yeni ve hızlı yöntemlerin standardize edilmesi, validasyonlarının yapılması, kullanımın daha basit hale getirilmesi ile hızlı ve güvenilir sonuçlara ulaşılması mümkün olabilecektir.

Kaynaklar

- Acaröz, U., Arslan Acaröz, D. (2021). Et ve et ürünleri mikrobiyolojisi. Hecer C, Editör. Et ve Et Ürünleri. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; s.75-78.
- Alves, J., Marques, V.V., Pereira, L.F.P., Hirooka, E.Y., De Oliveira, T.C.R.M. (2012). Multiplex PCR for the detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat. *Journal of Food Safety*, 32(3), 345-350.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.
- Aran, N., Köseoğlu V.K. (2010). Gıda Mikrobiyolojisi. Aran N, Editör. Gıda Biyoteknolojisi 1. Baskı. Ankara: Nobel Yayın ve Dağıtım; s. 1-17.
- Aras, Z. (2011). Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97-104.
- Arda, M. (2000). Nukleik Asitlerin İn Vitro Amplifikasyon Yöntemleri In: Temel Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Medisan Yayınları, Ankara.
- Arslan, A. (2020). Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi. 3. Baskı, Medipress Yayıncılık, Malatya.
- Aydin, A., Sudagidan, M., Muratoglu, K. (2011). Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 99-106.
- Aydin, A., Sudağidan, M. (2016). Gıda mikrobiyolojisinde moleküler biyolojik tekniklerin kullanımı ve tiplendirme yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Özel Dergisi*, 2(1), 1-9.
- Aznar, R., Alarcón, B. (2003). PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 958-966.
- Bahadır, E. B., Sezgintürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286-306.
- Bal, S.H., Budak, F. (2012). Mikroarray teknolojisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 38(3), 227-233.
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., & Roosens, N. H. (2013). Development and validation of qualitative SYBR® Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4021-4037.
- Bartlett, J.M.S., Stirling, D. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett J.M.S, Stirling D. Editors, PCR Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol; 226. Humana Press, pp. 3-6.
- Baş, D., Deniz, E. (2015). Gıda güvenliği ve kalite kontrolünde biyosensörler. *Gıda*, 40(4), 225-232.
- Beneduce, L., Fiocco, D., Spano, G. (2007). Development of PCR-based molecular tools for the detection of emerging food-ad water-borne pathogenic bacteria. Méndez-Vilas A, Editor, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, p. 569-576.
- Bi, Y., Shu, M., Zhong, C., Li, S. Y., Li, Y. K., Yang, H. H., Wu, G. P. (2020). A novel SDS rinse and immunomagnetic beads separation combined with real-time loop-mediated isothermal amplification for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in ready-to-eat duck meat. *Food Analytical Methods*, 13(5), 1166-1175.

- Böhmer, A., Schildgen, V., Lüsebrink, J., Ziegler, S., Tillmann, R. L., Kleines, M., Schildgen, O. (2009). Novel application for isothermal nucleic acid sequence-based amplification (NAS-BA). *Journal of Virological Methods*, 158(1-2), 199-201.
- Cheng, L. W., Stanker, L. H. (2013). Detection of botulinum neurotoxin serotypes A and B using a chemiluminescent versus electrochemiluminescent immunoassay in food and serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 755-760.
- Chen, J., Griffiths, M.W. 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in Applied Microbiology*, 27(6), 369-371.
- Chen, X., Gan, M., Xu, H., Chen, F., Ming, X., Xu, H., Liu, C. (2014). Development of a rapid and sensitive quantum dot-based immunochromatographic strip by double labeling PCR products for detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Food Control*, 46, 225-232.
- Chen, Z., Zhang, K., Yin, H., Li, Q., Wang, L., 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.
- Ching, K. H., He, X., Stanker, L. H., Lin, A. V., McGarvey, J. A., Hnasko, R. (2015). Detection of shiga toxins by lateral flow assay. *Toxins*, 7(4), 1163-1173.
- Cho, I. H., Irudayaraj, J. (2013). Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3313-3319.
- Churrua, E., Girbau, C., Martinez, I., Mateo, E., Alonso, R., Fernandez-Astorga, A. (2007). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 85-90.
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350, 91-92.
- Cook, N. (2003). The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental Samples. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 165-174.
- Coutu, J., Morissette, C., D'auria, S., Lacroix, M. (2014). Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Microbiology Research International*, 2(4), 46-52.
- D'agostino, M., Wagner, M., Vazquez-Boland, J. A., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., ... Cook, N. (2004). A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model towards an international standard. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1646-1655.
- Demir, T., Ağaoğlu, S. (2021). Presence of tetracycline-group of antibiotics in the eggs coded according to the cultivation method. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 35(1), 43-47.
- Doğruer, Y., Telli, A.E. (2020). Determination of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods using direct plate counting, quantitative loop-mediated isothermal amplification and propidium monoazide-qLAMP. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67(4), 349-355.
- Dwivedi, H. P., & Jaykus, L. A. (2011). Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 40-63.
- Eischeid, A.C. (2011). SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes*, 4(1), 1-5.
- Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53(3), 220-235.
- Erol, İ. (2022). Gıda Kaynaklı Patojenlerin Epidemiyolojisi. In: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, s. 53-74.

- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., ... Smith, T. (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. In: *Microbial Food Contamination*, Wilson, C.L. Editor, CRC Press Publishers, New York, p. 213-254.
- Fricker, M., Messelhäußer, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1892-1898.
- Fung, D.Y.C. (2002). Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 3-22.
- Fung, D. (2009). Rapid methods and automation in food microbiology: 25 years of development and predictions. In: *Global Issues in Food Science and Technology*, Academic Press, p. 165-176.
- Fykse, E. M., Skogan, G., Davies, W., Olsen, J. S., Blatny, J. M. (2007). Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1457-1466.
- Garrido-Maestu, A., Fuciños, P., Azinheiro, S., Carvalho, J., & 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.
- Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., Prado, M. (2018). Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR. *Food Microbiology*, 73, 254-263.
- Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, T. J., Maher, M. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 126-139.
- Gürsoy, N.C., Barış, O. (2017). Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.
- Güven, E., Azizoglu, R.O. (2022). The recent original perspectives on nonculture-based bacteria detection methods: A comprehensive review. *Foodborne Pathogens and Disease*. <http://doi.org/10.1089/fpd.2021.0078>.
- Hahn BK, Bhunia AK. 2006. Effect of environmental stresses on antibody-based detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1017-1027.
- Halkman, A.K. (2013). Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları. Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, s. 89.
- Han, F., Ge, B. (2010). Quantitative detection of *Vibrio vulnificus* in raw oysters by real-time loop-mediated isothermal amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 60-66.
- 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), R49-R53.
- He, X., Kong, Q., Patfield, S., Skinner, C., Rasooly, R. (2016). A new immunoassay for detecting all subtypes of Shiga toxins produced by Shiga toxin-producing *E. coli* in ground beef. *PloS one*, 11(1), e0148092.
- Helali, S., Sawelem Eid Alatawi, A., Abdelghani, A. (2018). Pathogenic *Escherichia coli* biosensor detection on chicken food samples. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12510.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
- Hu, Q., Lyu, D., Shi, X., Jiang, Y., Lin, Y., Li, Y., ... Li, Q. (2014). A modified molecular beacon-based multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of eight foodborne pathogens in a single reaction and its application. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(3), 207-214.
- Kahya Demirbilek, S., Guran, H., Yilmaz, O. (2016). PCR and ELISA for staphylococcal enterotoxins and detection of some exotoxins from *Staphylococcus* spp. strains by PCR. *Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice*, 72 (1), 28-33.
- Kevenk, T.O., Koluman, A. (2022). Method validation and prevalence of *L. monocytogenes* contamination in ground beef with VIDAS: as an alternative method compared with ISO 11290. *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(2), 2305-2311.
- Khan, M., Nazir, J., Anjum, A. A., Nawaz, M., & Shabbir, M. Z. (2015). Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from mutton, beef and chicken meat. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5323-5328.
- Kocaman, N., Sarımehmetoğlu, B. (2017). Kuzu etlerinden *Listeria monocytogenes* izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64(4), 273-279.
- Kralik, P., Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 108.
- Lauri, A., Mariani, P.O. (2009). Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes & Nutrition*, 4(1), 1-12.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5(770), 1-19.
- Lee, N., Kwon, K.Y., Oh, S. K., Chang, H.J., Chun, H. S., Choi, S.W. (2014). A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(7), 574-580.
- Levin, R.E. (2004). The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology*, 18(1), 97-133.
- Li, Y., Liu, D., Cao, B., Han, W., Liu, Y., Liu, F., ... & Wang, L. (2006). Development of a serotype-specific DNA microarray for identification of some Shigella and pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4376-4383.
- Lilja, L., Hanninen, M. L. (2001). Evaluation of a commercial automated ELISA and PCR-method for rapid detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in poultry products. *Food Microbiology*, 18(2), 205-209.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J. Austin, F.W. (2008). Genotypic Identification. In: *Handbook of Listeria monocytogenes*, Liu D, Editor, CRC Press, New York, USA, p. 169-203.
- Liu, C.C., Yeung, C.Y., Chen, P. H., Yeh, M.K., Hou, S.Y. (2013). *Salmonella* detection using 16S ribosomal DNA/RNA probe-gold nanoparticles and lateral flow immunoassay. *Food Chemistry*, 141(3), 2526-2532.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 290-296.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K. (2011). Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 87-102.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47-51.

- Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. (2003). Detection of bacteria carrying the stx 2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5023-5028.
- Maurischat, S., Baumann, B., Martin, A., Malorny, B. (2015). Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5], 12: i:- by real-time multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 8-14.
- Mei, Y., He, C., Zeng, W., Luo, Y., Liu, C., Yang, M.,...Huang, Q. (2022). Electrochemical biosensors for foodborne pathogens detection based on carbon nanomaterials: recent advances and challenges. *Food and Bioprocess Technology*, 1-16.
- Meyer, C., Thiel, S., Ullrich, U., Stolle, A. (2010). *Salmonella* in raw meat and by-products from pork and beef. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1780-1784.
- Min, J., Baeumner, A. J. (2002). Highly sensitive and specific detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Analytical Biochemistry*, 303(2), 186-193.
- Moon, Y. J., Lee, S. Y., Oh, S. W. (2022). A review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting food borne pathogens. *Foods*, 11(3), 322, 2-15.
- Muti İstek, M., Bulca, S. (2021). Gıda kontaminantlarının analizine yönelik elektrokimyasal biyosensör uygulamaları. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(Ek (Suppl.) 1), 532-544.
- Nagamine, K., Kuzuhara, Y. and Notomi, T. (2002). Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290 (4), 1195-1198.
- Nodoushan, S. M., Nasirizadeh, N., Amani, J., Halabian, R., Fooladi, A.A.I. (2019). An electrochemical aptasensor for staphylococcal enterotoxin B detection based on reduced graphene oxide and gold nano-urchins. *Biosensors and Bioelectronics*, 127, 221-228.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28 (12), e63.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53(1), 1-5.
- Ohk, S.H., Bhunia, A.K. (2013). Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* from ready-to-eat meat samples. *Food Microbiology*, 33(2), 166-171.
- Özatay, Ş. (2012). Molekuler metodların gıda kontrollerindeki uygulama alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 75-81.
- Özşensoy, Y., Şahin, S. (2016). Comparison of different DNA isolation methods and use of dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB) for the isolation of DNA from meat products. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3, 368-374.
- Öztürk, U., Gürbüz, Ü., Çalım, H. D. (2006). Et ve et ürünlerinde mikrobiyolojik kriterler ve halk sağlığı açısından önemi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu.
- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2), 659-664.
- Qin, Y., Puthiyakunnon, S., Zhang, Y., Wu, X., Boddu, S., Luo, B., Fan, H. (2018). Rapid and specific detection of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef using immunomagnetic separation combined with loop-mediated isothermal amplification. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(2), 115-123.
- Sahin, S., Kalin, R., Mogulkoc, M.N. (2019). Distribution of serotypes of *Listeria monocytogenes* in chicken meats in Turkey. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(4), 1859-1864.

- Sahin, S., Mogulkoc, M. N., Kalin, R., Karahan, M. (2020b). Determination of the important toxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from meat samples, food handlers and food processing surfaces in Turkey. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 75(2), 42-49.
- Sahin, S. (2020). Determination of the ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Turkey. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 71(3), 2291-2300.
- Severgnini, M., Cremonesi, P., Consolandi, C., De Bellis, G., Castiglioni, B. (2011). Advances in DNA microarray technology for the detection of foodborne pathogens. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 936-953.
- Sewell, A. M., Warburton, D. W., Boville, A., Daley, E. F., Mullen, K. (2003). The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), 123-129.
- Shan, S., Lai, W., Xiong, Y., Wei, H., Xu, H. (2015). Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(3), 745-753.
- Shao, Y., Zhu, S., Jin, C., 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.
- Silva, N. F., Neves, M. M., Magalhães, J. M., Freire, C., Delerue-Matos, C. (2020). Emerging electrochemical biosensing approaches for detection of *Listeria monocytogenes* in food samples: An overview. *Trends in Food Science Technology*, 99, 621-633.
- Şahin, S., Kalın, R., Arslanbaş, E., Moğulkoç, M.N. (2017). Satışa sunulan tavuk etlerinde bazı bakteriyel ve indikatör mikroorganizmaların belirlenmesi. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 7(1), 47-56.
- Şahin, S., Moğulkoç, M.N., Kalın, R. (2020a). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from retail raw meats. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1), 22-27.
- Taha, E.G., Mohamed, A., Srivastava, K.K., Reddy, P.G. (2010). Rapid detection of *Salmonella* in chicken meat using immunomagnetic separation, CHROMagar, ELISA and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *International Journal of Poultry Science*, 9(831), e835.
- Tekintaş, Y., Hoşgör-Limoncu, M. (2018). Bakteriyoloji alanında kullanılan modern tanı yöntemleri: hızlı ve etkili. *Klimik Dergisi*, 31(3), 176-80.
- Telli, A. E., Doğruer, Y. (2019). Discrimination of viable and dead *Vibrio parahaemolyticus* subjected to low temperatures using propidium monoazide-quantitative loop mediated isothermal amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. *Microbial Pathogenesis*, 132, 109-116.
- Temizkan, G., Arda, N. (2004). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul.
- TGK (2011). Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, Sayı: 28145, Tarih: 29 Aralık 2011, Resmî Gazete, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- TGK (2012). Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği. Sayı: 28488, Tarih: 5 Aralık 2012, Resmî Gazete, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Tutar, E., Köksalan, E., Akyol, İ. (2015). Gıdalarda bulunan mikrobiyal patojenlerin karakterizasyonunda real time PCR teknolojisi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 18(4), 26-39.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80.
- Uyttendaele, M., Schukkink, R., Van Gemen, B., Debevere, J. (1995). Development of NASBA®, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA method. *International Journal of Food Microbiology*, 27(1), 77-89.

- Vaz-Velho, M., Duarte, G., Gibbs, P. (2000). Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 147-151.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynka, O., Vaseashta, A., Adley C. (2012). Real time detection of foodborne pathogens for food quality monitoring biosecurity. In: Vaseashta AT, Braman E, Susmann P, eds. Technological innovations in sensing and detection of chemical, biological terrorism. Dordrecht: Springer Publishing; p.149-58.
- Wang, X. W., Zhang, L., Jin, L. Q., Jin, M., Shen, Z. Q., An, S., ... Li, J. W. (2007). Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 225-233.
- Wang, L., Shi, L., Alam, M. J., Geng, Y., Li, L. (2008). Specific and rapid detection of foodborne Salmonella by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*, 41(1), 69-74.
- Wang, D. G., Brewster, J. D., Paul, M., Tomasula, P. M. (2015b). Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*, 20(4), 6048-6059.
- Wang, Y., Wang, Y., Ma, A., Li, D., Luo, L., Liu, D., ... Ye, C. (2015b). The novel multiple inner primers-loop-mediated isothermal amplification (MIP-LAMP) for rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 20(12), 21515-21531.
- Wang, Z., Cai, R., Gao, Z., Yuan, Y., & Yue, T. (2020a). Immunomagnetic separation: An effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3802-3824.
- Wang, S., Sun, C., Hu, Q., Li, S., Wang, C., Wang, P., & Zhou, L. (2020b). A homogeneous magnetic bead-based impedance immunosensor for highly sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical Engineering Journal*, 156, 107513.
- Wang, Y., He, D., Du, Z., Xu, E., Jin, Z., Wu, Z., Cui, B. (2022). Ultrasensitive detection of Staphylococcal Enterotoxin B with an AuNPs@ MIL-101 nanohybrid-based dual-modal aptasensor. *Food Analytical Methods*, 1-9.
- Wu, Q., Zhang, Y., Yang, Q., Yuan, N., & Zhang, W. (2019). Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens. *Sensors*, 19(22), 4916.
- Xu, X., Ying, Y. (2011). Microbial biosensors for environmental monitoring and food analysis. *Food Reviews International*, 27(3), 300-329.
- Yalçın, H. (2016). Gıda analizlerinde immünoassay (VIDAS, TEMPO, VITEK) ve ELISA yöntemlerinin kullanımı. *Türkiye Klinikleri Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Özel Dergisi*, 2(1): 10-22.
- Yamazaki, W., Ishibashi, M., Kawahara, R., Inoue, K. (2008). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology*, 8(1), 1-7.
- Ye, Y., Wang, B., Huang, F., Song, Y., Yan, H., Alam, M. J., ... 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.
- Yelboğa, E., Karagüler, N.G. (2010). Moleküler biyolojik yöntemler. Aran N, Editör. Gıda Biyoteknolojisi. 1. Baskı Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; p. 49-69.
- Yılmaz, T. (2021). Gıda ürünlerinde mikrobiyal bozulmaya neden olan *Pseudeomonas* spp. bakterisinin yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensör kullanılarak belirlenmesi (Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Alanı, Yüksek Lisans Tezi), Ankara, s. 111.
- Yonekita, T., Ohtsuki, R., Hojo, E., Morishita, N., Matsumoto, T., Aizawa, T., Morimatsu, F. (2013). Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 93(3), 251-256.

- Yörük, N.G. (2021). Gıda Güvenliği ve Mikrobiyel Risk Faktörleri. In: Gıda Güvenliği ve Güncel Uygulamalar. Güner, A. Editör. Sidas Medya, İzmir. s.1-36
- Yüksel, M., Sert, S., Kavaz Yüksel, A., Çetin, B., Gürses, M. (2022). Kolorimetrik loop-mediated izotermal amplifikasyon metodu ile *Listeria monocytogenes*'in tavuk etlerinde hızlı tespiti. *Gıda*, 47(1), 121-135.
- Zende, R.J., Kshirsagar, D.P., Vaidya, V.M., Waghmare, R.N., Todankar, R.P., Shirke, A.H. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification assay (LAMP): a rapid tool for diagnosis of food borne and zoonotic pathogens: a review. *International Journal of Livestock Research*, 7(5), 23-35.
- Zhou, B., Xiao, J., Liu, S., Yang, J., Wang, Y., Nie, F., ... Zhao, G. (2013). Simultaneous detection of six food-borne pathogens by multiplex PCR with a GeXP analyzer. *Food Control*, 32(1), 198-204.
- Zhao, X., He, X., Li, W., Liu, Y., Yang, L., Wang, J. (2010). Development and evaluation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9), 663-670.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for food-borne pathogens. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(3), 297-312.
- Zhai, L., Liu, H., Chen, Q., Lu, Z., Zhang, C., Lv, F., Bie, X. (2019). Development of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for the rapid detection of *Salmonella* spp. from food. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 255-261.
- Zhu, L., He, J., Cao, X., Huang, K., Luo, Y., Xu, W. (2016). Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus cereus* in food. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.