

Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler¹

İbrahim Çakır², M. Lütfü Çakmakçı³

1. Giriş

Nükleik asit bazlı tekniklerin en çok kullanılanları; koloni (DNA) hibridizasyon tekniği, PCR (polimerase chain reaction) tekniği, ribotyping tekniği ve 16S rRNA teknikleridir (1, 2). Geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında, nükleik asit bazlı yöntemlerin en önemli avantajları; kısa sürede sonuç alınabilmesi, canlı hücre gereksinimi olmaması (özellikle hijyen kontrollerinde bulaşının kaynağını göstermek açısından), hasar görmüş hücrelerin de tespit edilebilmesi ve çok spesifik teknikler oldukları için doğruluk oranlarının yüksek olmasıdır (3, 4). Bunun yanında bu tekniklerin bazı dezavantajları ise; canlı mikroorganizmaların ölümlerden ayırt edilememesi, çok değişken bir yapıya sahip olan gıda örneklerinden direkt olarak DNA izolasyonunda karşılaşılan güçlükler, herbir gıda grubu için farklı örnek hazırlama aşaması gereksinimi, gıdadan kaynaklanan bazı enzim, mineral vb maddelerin PCR reaksiyonunu engelleyebilmesi ve belkide bunlardan daha önemlisi bu tekniklerin kullanımı için çok özel aletlere gerek duyulması ve bunun da yatırım maliyetini yükseltmesidir (4, 5, 6) (Çizelge 1).

Çizelge 1. Gıda kaynaklı patojen aranmasında nükleik asit tekniklerin geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması

Uygulama alanı	Avantajları	Dezavantajları
Patojenlerin gıdalardan direkt tespiti	Mikroorganizmanın geliştirilmesi gerekmiyor (teorikte)	Ölü hücreler de tespit edilebilir (PCR), Küçük test hacmi nedeniyle yüksek oranda tespit edilebilir, Gıda bileşenlerinden kaynaklanan inhibisyon (PCR).
Zenginleştirme ortamında kültürün doğrulanması	Hızlı ve hassas, Otomatik tespit edilebilir, Gıdanın doğal florasının yüksek konsantrasyonlarına karşı duyarsız	Koloni eldesi gerekmiyor, bunun için de negatif örneklerin arama dışı bırakılabilmesi mümkün
Diğer uygulamalar	Genetik yapıları düzenlenmiş organizmaların (GMO) spesifik olarak tespit edilebilmesi	

Nükleik asit bazlı ticari tekniklerden bazıları Çizelge 2'de verilmiştir. Ancak burada verilen tekniklerin hepsi FDA veya AOAC tarafından gıdalarda patojen analizinde kullanılmak üzere onaylanmış teknikler değildir.

¹ Prof. Dr. M. Lütfü Çakmakçı danışmanlığında İbrahim Çakır tarafından hazırlanan doktora semineridir.

² Yrd. Doç. Dr.; Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu,

³ Prof. Dr.; Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: cakir_i@ibu.edu.tr

Çizelge 2. Gıda kaynaklı patojenlerin aranmasında kullanılan nükleik asit bazlı ticari kitlerden bazıları

Mikroorganizma	Ticari adı	Format	Üretici firma
<i>Clostridium botulinum</i>	Probelia	PCR ^a	BioControl
<i>Campylobacter</i> spp.	AccuProbe	probe	GEN-PROBE
	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
<i>Escherichia coli</i>	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
<i>E. coli</i> O157:H7	BAX	PCR	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Listeria</i> spp.	GENE-TRAK ^b	probe	GENE-TRAK
	AccuProbe	probe	GEN-PROBE
	BAX	PCR	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Salmonella</i> spp.	GENE-TRAK ^b	probe	GENE-TRAK
	BAX	PCR	Qualicon
	BIND ^c	phage	BioControl
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Staphylococcus aureus</i>	AccuProbe	probe	GEN-PROBE
	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
<i>Yersinia enterocolitica</i>	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
^a Polymerase chain reaction ^b AOAC Official First or Final Action ^c Bacterial Ice Nucleation Diagnostics Adopted			

Gıda mikrobiyolojisinde kullanılan DNA bazlı tekniklerin temeli DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır. Bu tekniklerden en yaygın olanları; koloni (DNA) hibridizasyonu, PCR esaslı yöntemler, RFLP ve Ribotyping yöntemleridir (7, 8).

2. Koloni Hibridizasyon Tekniği

Koloni hibridizasyon tekniğinin ana basamakları; gıdadan toplam DNA' nın izolasyonu, nitroselüloz veya naylon membran üzerine aktarılması ve işaretlenmiş gen problemleri ile hibridizasyon ve membranın görüntülenmesidir.

Koloni hibridizasyon tekniği, radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş problemler kullanıldığında yüksek mikrobiyel flora varlığında kısmen hassas bir teknik değildir. Hatta bu problem selektif besiyeri kullanılarak, toplam bakteri sayısı 10^7 cfu/g olduğu zaman bile ortaya çıkabilmektedir (9, 10).

Koloni hibridizasyon tekniği hiçbir zaman gıdalardan direkt patojen mikroorganizma izolasyonunda rutin koşullarda kullanılmamıştır. Bunun nedenlerinden biri, rutin analiz laboratuvarlarında radyoaktif olmayan maddelerle işaretli problemler kullanıldığında elde

edilen sinyal daha zayıf olmakta ve çok zor tespit edilebilmektedir. Aynı zamanda sıvı olmayan örneklerde mikroorganizma tespit düzeyinin yeterince hassas olmaması da bu tekniğin kullanımını sınırlayan nedenlerden biri olarak ortaya çıkmaktadır. Yayma kültür yöntemi ile sayım yapmak amacıyla örnekten 10 katı seyreltme yapıp ekim yapılmalıdır, ancak 25 gram örnekte 1-10 cfu tespit edilmesi durumunda bu yöntem kullanılamamaktadır (8, 10).

Bununla birlikte koloni hibridizasyon tekniği kültür doğrulama testlerinde bir çok avantaja sahiptir. Bu avantajlardan bazıları ise, çok sayıda petri kutusundan izole edilen örneğin bir tek filtre üzerinde ve aynı anda test edilebilmesi, aynı hibridizasyon çözeltisinin birden fazla filtre için kullanılabilmesidir. Bu durumda negatif sonuçların doğrulanması besiyeri kullanımını ortadan kaldırmakta, bu da analizin maliyetini azaltmaktadır (11).

Hassasiyet ve özgüllük açısından kıyaslandığında, koloni hibridizasyon testinin, *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* pozitif kültürlerinin doğrulanmasında, serolojik ve biyokimyasal testlerle aynı derecede iyi veya bu testlerden daha üstün olduğu kanıtlanmıştır (12).

3. PCR Tekniği

Günümüzde kullanılan DNA bazlı tekniklerin birçoğu (Gen klonlama, DNA dizi analizi ve genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar) PCR temeline dayanmaktadır (Miesfeld 1999). PCR ile gen çoğaltmada gerekli maddeler kopyalanacak hedef DNA, deoksiribonükleotidler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ve dUTP), DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), gene özgü veya genel primerler ve reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan uygun PCR tamponudur. Tekniğin prensibi; bu maddelerin hedef DNA ile birlikte aynı ortama konularak homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra PCR aletine yerleştirilerek hedef DNA'nın çoğaltılması ve oluşan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile tespit edilip görüntülenmesidir (3, 7).

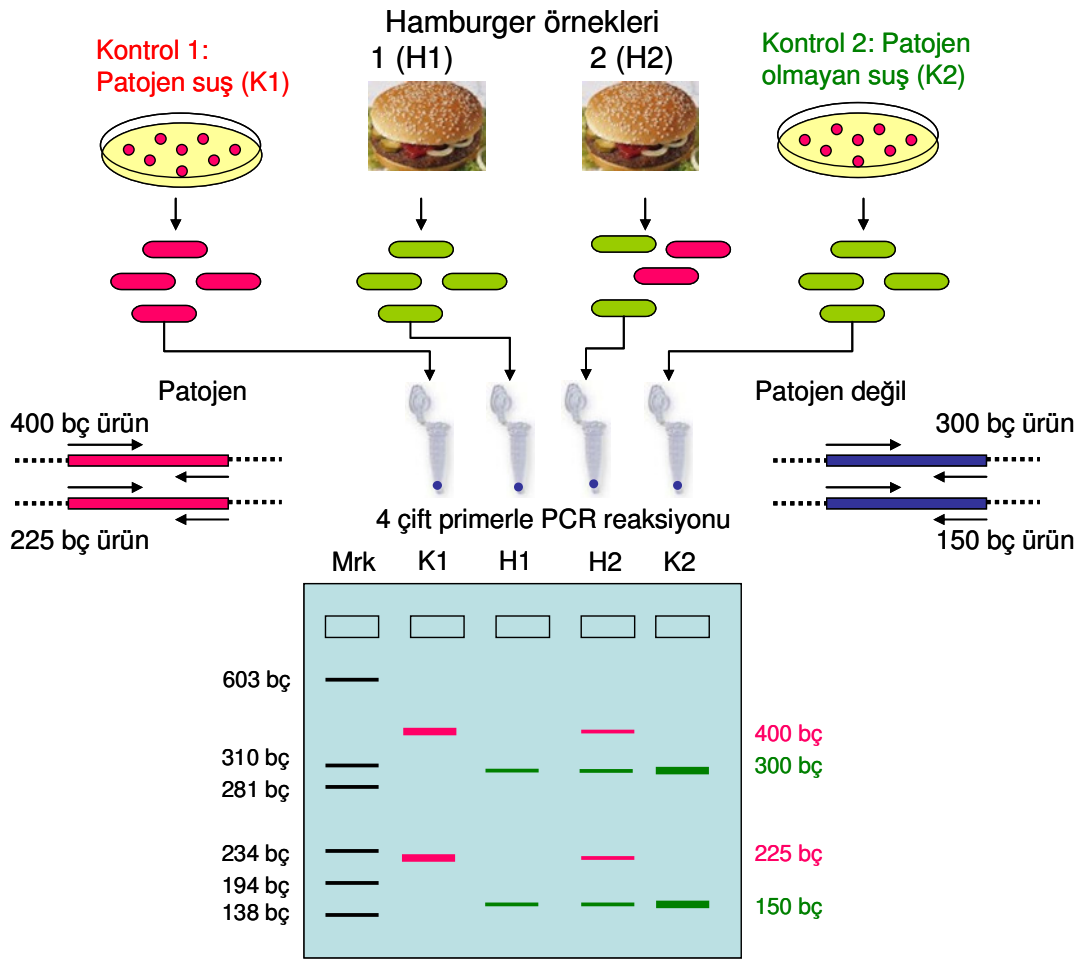
PCR reaksiyonu üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla; hedef DNA çift zincirinin açılması (denaturation; 94 °C'de 30-90 saniye), primerin bağlanması (annealing; 55-60 °C'de 0.5-2 dakika) ve primerin uzaması (extension; 72 °C'de 1 dakika) aşamalarıdır. Bu sıcaklık döngüsü 30-35 defa tekrar ettirildikten sonra polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesi için son aşamada 5 dakika daha beklenerek reaksiyon tamamlanır. Bir sonraki kullanımına kadar PCR ürünleri 4-25 °C'de bekletilir. Burada her bir döngüden sonra oluşan zincirler yeni döngünün hedef zinciri olarak görev yapmaktadır (4).

4. Patojenlerin İzolasyonunda PCR Yöntemi

PCR yöntemi ile patojen mikroorganizma aranması üç aşamada gerçekleştirilir. Bunlar:

1. Örnek hazırlama
2. PCR' da genetik materyal çoğaltma
3. Tespit (agaroz jelde yürütme) ve görüntüleme aşamalarıdır (7).

PCR işleminde hedef genetik materyal genellikle DNA' dır. Çünkü DNA, RNA' ya kıyasla daha stabil olup, direkt olarak gıda materyalinden izolasyonu daha kolaydır. Ancak yine de analiz edilecek örneğin karakterine uygun olarak gıda matriksinden genetik materyalin izolasyonunda farklı işlemler uygulanmaktadır. Örneğin su gibi sıvılarda örnek filtreden geçirilmekte, katı örneklerde ise gıda matriksi uygun tamponlar içinde homojenize edilerek aranan patojen mikroorganizmanın tamamen sıvı faza geçmesi sağlanmaktadır. Bazı durumlarda gıda maddesinde bulunan mikroorganizma sayısının artırılması amacıyla ön zenginleştirme işlemi uygulanmaktadır. PCR işleminde kullanılacak olan DNA, yeterince saf olmalıdır. Aksi halde reaksiyon gerçekleşmeyecek veya uygun miktarda DNA çoğaltılamayacaktır. Bu nedenle elde edilen DNA' nın PCR işleminden önce uygun miktarlarda seyreltilmesi gerekmektedir (1, 10, 13). Şekil 1'de hamburger örneklerinden patojen olan ve olmayan *E. coli* suşlarının pozitif ve negatif kontrolleri ile birlikte Multipleks-PCR yöntemi ile aranması gösterilmektedir.



Şekil 1. Multipleks-PCR yöntemi ile hamburgerde *E. coli* araması

5. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

Türler içindeki genetik farklılıkların belirlenmesi, türler arasındaki farklılıkların belirlenmesinden daha zordur. DNA dizisindeki farklılıklar ve mutasyonlar sonucu ortaya çıkan varyasyonlar her zaman fenotipe yansımaz. Üstelik aynı yapıdaki genler farklı fenotipik özelliklerin kaynağı da olabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı

özellikle aynı türün farklı bireyleri arasındaki farklılıklar en kesin ve doğru biçimde moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak ortaya konulabilmektedir (7).

5.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

DNA dizisindeki farklılıklar belirli endonükleaz enzimleri ile kesilerek ortaya konulabilmektedir. Her bir restriksiyon endonükleaz (RE) enzimi DNA' yı belirli bir bölgeden kesmekte olup kesim sonucu yapışkan veya küt uçlar oluşturmaktadır. Ayrıca kesim sonucu oluşan DNA parçacıklarının büyüklüğü ve sayısı mikroorganizmalar arasında farklılıklar göstermektedir. İşte bu farklılıklardan yola çıkılarak mikroorganizmalar RFLP yöntemi ile tanımlanabilmektedirler. Kesim eğer tüm genoma uygulanırsa makrorestriksiyon analizi, spesifik genlere uygulanıyorsa mikrorestriksiyon analizi olarak adlandırılmaktadır (2, 11).

5.2. Ribotyping

Ribotyping spesifik genlerdeki (16S rRNA genleri) farklılıkların tüm kromozomdaki farklılığın bir göstergesi olması, prensibinden yola çıkılarak geliştirilmiş bir tekniktir. rDNA belirli türlerde bazı değişmeyen bölgeler içermektedir ki bu bölgeler, universal proplar tarafından belirlenebilmekte olup, bunlar için her bir türe özgü prob geliştirmek gerekmemektedir (örneğin *E. coli*'de olduğu gibi). rDNA, diğer birçok gene kıyasla farklılıkları daha az tolere edebilmekte, bu nedenle de RE kalıbı daha kolay çıkarılabilmektedir. rRNA yapılarındaki farklılıklara dayanarak bakterilerin tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını sağlayan bu yöntemin üstün yanı; bakterilerin cins hatta tür düzeyinde, yüksek tekrarlanabilirlik oranı ve kesin fingerprint sonuçları ile tanımlanmasını sağlamasıdır (2, 14).

RiboPrint identifikasyon veritabanı içerisinde varsa, ribotyping yöntemi, bakteri tanımlamada da kullanılabilir. Halen veritabanında 600'den fazla Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmanın RiboPrinter kalıpları bulunmakta olup bu sayı her geçen gün daha da artmaktadır. Veritabanındaki en yüksek kalıp sayısı sırasıyla *Listeria*, *Salmonella* ve *Escherichia coli* ' ye aittir. Ancak isteğe bağlı olarak her mikroorganizma için tanımlama kalıbı çıkarılabilir (14, 15).

PCR ribotyping yöntemi: PCR ribotyping işleminde önce aranan mikroorganizmaya özgü spesifik bölge PCR' da çoğaltılır. Burada birçok rRNA operonlarının olduğu unutulmamalıdır. Bunlardan 16S-25S arasındaki spesifik bölgenin büyüklüğü suşa göre değişmektedir. PCR ribotyping ürünlerinin sayı ve büyüklüklerindeki farklılıklar bir suşun varyeteleri arasındaki farklılıkları göstermektedir (15).

Otomatize ribotyping yöntemi: Bu yöntemde DNA ekstraksiyonu, restriksiyon enzimleri ile kesim, jel elektroforezi, Southern blotting, hibridizasyon, tespit, membrana transfer, verilerin kaydedilmesi (CCD kamera) ve ilk analizi dahil tamamen otomatize edilmiştir. Bir kişi 8 örneği yaklaşık 1 saatte sisteme yükleyebilmekte, sonuçlar 8 saatte alınabilmekte ve günde 32 örnek analiz edilebilmektedir. Yönteme göre jeldeki genetik materyal, membran üzerine transfer edilir ve rRNA operon bölgesi tanımlanmış prob uygulanarak rRNA gen dizisi ortaya çıkarılır. Bu kalıp daha sonra okuyucu tarafından okunarak, dijital kayıt formatında veritabanına kaydedilir. rRNA bantlarının genetik materyal içindeki konumu ve bantların büyüklüğü bakteriler arasında farklılık göstermektedir ki bu farklılıklar tanımlama ve sınıflandırmada esas

kriter olarak kullanılmaktadır. Örneğin *Listeria* için 80, *Salmonella* için 97, *Escherichia* için 65 ve *Staphylococcus* için 252 kalıp tipi tespit edilmiştir. Buna ilaveten 35 farklı türün RiboPrint® kalıpları tespit edilmiştir. Daha çok bakterinin ripoprint kalıpları çıkarıldıkça bu veritabanı genişlemeye devam etmektedir (16).

Otomatize edilmiş ribotyping yöntemlerinin en bilinen örneği olarak Qualicon (DuPont' un bir alt kuruluşu) firması tarafından geliştirilen RiboPrinter® mikrobiyel karakterizasyon sistemidir. RiboPrinter® mikrobiyel karakterizasyon sistemi özel bir beceri veya eğitim gerektirmeden herhangi bir bakterinin genetik kalıbını 8 saatten daha kısa bir sürede otomatik olarak veren bir sistemdir. Bu sistem ile patojen, bozulma etmeni veya starter olarak kullanılan mikroorganizmaların genetik kalıplarının çıkarılması ve karakterizasyonu mümkündür (16).

RiboPrinter® sistemi ile bakterilerin riboprint kalıpları restriksiyon enzim kitleri ile belirlenebileceği gibi tercihe bağlı olarak diğer restriksiyon enzim kitleri ile de belirlenebilir. Bu sistemin identifikasyon veritabanı gün geçtikçe daha da genişlemekte olup, 120'den fazla cins ve 1100 türe ait 4800 kalıptan oluşmaktadır. Bu veritabanı, gıda güvenliği dolayısıyla halk sağlığı açısından önemli olan bakterilerin dışında, farmasotik açıdan önemli olan mikroorganizmalara ve laktik asit bakterilerine ait olan kalıpları da içermektedir. Bu sistemin çok kullanışlı olmasının en önemli iki nedeni; tekrarlanabilir olması ve standardizasyonudur. Ribotyping son 10-15 yıl içerisinde geliştirilmiş en güvenilir sınıflandırma ve tiplendirme yöntemidir (6, 7, 16).

6. Sonuçlar

1. Mikroorganizmalar benzer fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılabilirdiği gibi genotipik özelliklerine göre de sınıflandırılabilmektedir.
2. PCR teknikleri otomatize edilerek rutin gıda analizlerinde çok başarılı bir şekilde kullanılabilir.
3. RFLP ve ribotyping, türleri ve alt türleri kesin olarak tanımlamada veya genotipik farklılıklarını ortaya koymada kullanılan çok hassas tiplendirme teknikleridir.
4. Patojenlerin aranmasında gen problemleri indikatör (marker) olarak kullanılabilir ve özellikle izolatların doğrulanmasında diğer doğrulama yöntemlerinden daha hızlı ve kesin sonuç alınabilmektedir.
5. Bütün bu olumlu yanlarına karşın özellikle de otomatize sistemler laboratuvarın kuruluş maliyetini arttırdığı için gıda mikrobiyolojisinde henüz yeterince yaygın kullanım alanı bulamamıştır.

Kaynaklar

1. Klijn, N. 1996. Molecular Techniques for the Identification and Detection of Microorganisms Relevant for the Food Industry. NIZO-Verslagen V350, 96 p. Wageningen.
2. Olsen, J.E. 2000. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. Food Research International, 33; 257-266.

3. Zindulis, J. 2001. An insider's view into the use of PCR in the food industry. *Food Safety*, 7 (6); 46-64.
4. Hill, W.E., Datta, A.R., Feng, P., Lampel, K.A., Payne, W.L. 2001. Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes. Chapter 24 in, "FDA Bacteriological Analytical Manual 8th Ed. 1995. Revision A. Published and Distributed by AOAC International". Gaithersburg.
5. Feng, P. 2001. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. Appendix 1 in, "FDA Bacteriological Analytical Manual 8th Ed. 1998. Revision A. Published and Distributed by AOAC International". Gaithersburg.
6. Flickinger, B. 2001. Modern microbiology: Providing better data faster. *Food Quality*, January/February, 17-24.
7. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. W.H. Freeman and Company, 1084 p., New York.
8. Jay, J. 2000. *Modern Food Microbiology*, Sixth Edt., Aspen Publ., Gaithersburg, MD.
9. Jogow, J.A. and Hill, W. 1988. Enumeration of virulent *Yersinia enterocolitica* colonies by DNA colony hybridization using alkaline treatment and paper filters. *Molecular and Cellular Probes*, 2; 189-195.
10. Jalava, T. 1993. Detection of Microbial DNA by PCR and Hybridisation. Orion Corporation, 58 p. Helsinki.
11. Freeman, W.M., Robertson, D.J., Vrana, K.E. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques*, 29; 1042-1055.
12. Kim, C., Swaminathan, B., Cassaday, P.K., Mayer, L.W., Holloway, B.P. 1991. Rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* isolated from foods by a colony blot assay using a digoxigenin-labeled synthetic oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology*, 57; 1609-1614.
13. Campbell, T.N. and Choy, F.Y.M. 2001. Large-scale colony screening and insert orientation determination using PCR. *BioTechniques*, 30; 32-34.
14. Miesfeld, R.L. 1999. *Applied molecular genetics*. Chapter 6: The Polymerase Chain Reaction. Wiley-Liss Inc. Publication 293 p., New York.
15. Hines, E. 2000. PCR-based testing: A self-professed lab idiot unravels the mystery. *Food Quality*, March/April; 22-28.
16. http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/assets/downloads/rpbroch.pdf