

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**GIDA PATOJENLERİ İÇİN DİJİTAL PCR İLE HIZLI TESPİT
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yeliz YÜCEL ÖZ

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı

MART 2023

**GIDA PATOJENLERİ İÇİN DİJİTAL PCR İLE HIZLI TESPİT
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Yeliz YÜCEL ÖZ
(521092078)**

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

MART 2023

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY ★ GRADUATE SCHOOL

**DEVELOPMENT OF RAPID DETECTION METHODS FOR FOOD
PATHOGENS USING DIGITAL PCR**

Ph.D. THESIS

**Yeliz YÜCEL ÖZ
(521092078)**

Department of Molecular Biology-Genetics and Biotechnology

Molecular Biology-Genetics and Biotechnology Programme

Thesis Advisor: Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

MARCH 2023

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 521092078 numaralı Doktora Öğrencisi Yeliz YÜCEL ÖZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “GIDA PATOJENLERİ İÇİN DİJİTAL PCR İLE HIZLI TESPİT YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Nevin GÜL KARAGÜLER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK
Gebze Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Zeynep Petek ÇAKAR
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Melek ÖZKAN
Gebze Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 27 Aralık 2022
Savunma Tarihi : 20 Mart 2023





Aileme,



ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın başlamasında ve yürütülmesinde hiçbir zaman desteğini esirgemeyen birikimleri ile yoluma ışık olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ'a en derin duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

İontek İlaç Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. Tic A.Ş. Genel Müdürü Dr. Can Bora Ünal'a bana bu projeyi yürütme ve tezi hazırlama fırsatı verdiği için çok teşekkür ederim. Projenin yürütülmesinde, proje arkadaşlarımdan Sibel Karaman'a üstün emeklerinden dolayı teşekkür ederim. Projenin her aşamasında katkı ve desteklerinden dolayı Dr. Öykü İRİGÜL SÖNMEZ'e, proje arkadaşlarımdan Dr. Onur BİLENOĞLU'na, Ümit FIRAT'a, Arzu ELAGÖZ'e, Berhan DİMELİK'e, İpek ERGAL'a, Altuğ ULUDAĞ'a, Sevil ŞENER'e, Açelya YALÇINTAŞ'a, Aydın ÖZMALDAR'a ve aramızdan çok erken ayrılan sevgili Burak ÖZKÖK'e teşekkür ederim. Cihaz konusundaki yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. Hatice DÜZKALE'ye ve Genometri Biyoteknoloji Arge ve Danışmanlık Hizmetleri Limited Şirketi'ne ve adını sayamadığım birçok kişi ve kuruma çok teşekkür ederim.

Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e proje konusundaki desteklerinden ve suş temini konusundaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Suş konusunda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ'e, Prof. Dr. K. Tayfun ÇARLI ve Prof. Dr. Ayşegül EYİĞÖR'e, Prof. Dr. Işın AKYAR'a, Canan Zöhre KETRE KOLUKIRIK'a çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteklerini sunan eşim Ersoy ÖZ ve oğlum Yiğit Toprak ÖZ'e teşekkür ederim.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1120262 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Mart 2023

Yeliz YÜCEL ÖZ
(Moleküler Biyolog)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Salmonella spp.</i> ve Karakteristik Özellikleri.....	1
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> ve Karakteristik Özellikleri	4
1.3 <i>Salmonella spp.</i> ve <i>Listeria monocytogenes</i> Tespit Yöntemleri	6
1.4 Dijital PCR	11
1.5 Tezin Amacı	12
2. MATERYAL VE METODLAR	13
2.1 Bakteri Türleri ve Büyüme Şartları	13
2.2 Türe Özgü Primer ve Prob Dizaynı	13
2.2.1 <i>Salmonella spp.</i> 'ye özgü primer ve prob dizaynı.....	14
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> 'e özgü primer ve prob dizaynı	15
2.3 İnternal Kontrolün Oluşturulması	16
2.3.1 İnternal kontrolün plazmid içine entegrasyonu.....	18
2.3.2 İnternal kontrolün kullanıma hazır hale getirilmesi	20
2.4 Gıda Örneklerinin Bakteri Örnekleri ile Kontaminasyonu	21
2.4.1 <i>Salmonella spp.</i> ile gıda örneklerinin kontaminasyonu	21
2.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i> ile gıda örneklerinin kontaminasyonu.....	21
2.5 DNA İzolasyonu.....	22
2.6 Real Time-PCR	23
2.7 Droplet Dijital PCR.....	24
2.8 Tasarlanan Deneyler	26
2.8.1 Özgüllük deneyleri	26
2.8.2 Doğrusallık deneyleri	26
2.8.3 Hassasiyet deneyleri.....	27
2.8.4 Dayanıklılık ve Tekrarlanabilirlik Deneyleri	27
3. SONUÇLAR	29
3.1 <i>Salmonella spp.</i> için Primer-Prob Özgüllüğü.....	29
3.2 <i>Salmonella spp.</i> Doğrusallık Deney Sonuçları.....	44
3.3 <i>Salmonella spp.</i> Hassasiyet Deney Sonuçları	48
3.4 <i>Salmonella spp.</i> Tekrarlanabilirlik Deney Sonuçları	62
3.5 <i>Listeria monocytogenes</i> için Primer-Prob Özgüllüğü	66
3.6 <i>Listeria monocytogenes</i> Doğrusallık Deney Sonuçları	69

3.7 <i>Listeria monocytogenes</i> Hassasiyet Deney Sonuçları	73
3.8 <i>Listeria monocytogenes</i> Tekrarlanabilirlik Deney Sonuçları	82
4. TARTIŞMA	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR.....	93
EKLER	101
ÖZGEÇMİŞ.....	121



KISALTMALAR

BHQ	: Black Hole Quencher
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
dPCR	: Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ddPCR	: Droplet Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FAM	: 6-Karboksi-floresein
GTP	: Guanizin üç fosfat (Guanosine triphosphate)
HEX	: Heksakloro-floresein
kob	: Koloni oluşturan birim
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Centre for Biotechnology Information)
RNA	: Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid)
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
UTR	: Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BPW	: Tamponlanmış Peptonlu Su (Buffered Peptone Water)
RVS	: Rappaport-Vassiliadis Soya Sütü Pepton Suyu (Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone)
MKTTn	: Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin
USDA-FSIS	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı- Gıda Güvenliği ve Denetim Hizmeti (United States Department of Agriculture-The Food Safety and Inspection Service)
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (The United States Food and Drug Administration)

BLEB	: <i>Listeria</i> Enrichment Broth Base
MOX	: Modifiye Oxford Agar
ICMSF	: Avrupa Komisyonu ve Uluslararası Gıda Mikrobiyal Spesifikasyon Komisyonu (International Commission on Microbiological Specification for Foods)
EMA	: Ethidium Bromide Monoazide
PMA	: Propidium Monoazide
NA	: Zengin Katı Besiyeri (Nutrient Agar)
NB	: Zengin Sıvı Besiyeri (Nutrient Broth)
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Centre for Biotechnology Information)
MCS	: Çoklu Klonlama Bölgesi (Multi Cloning Site)
MHA	: Mueller Hinton Katı Besiyeri (Mueller Hinton Agar)
MHB	: Mueller Hinton Sıvı Besiyeri (Mueller Hinton Broth)
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)

SEMBOLLER

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
dH₂O	: Distile su
g	: Gram
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
fg	: Femtogram
ml	: Mililitre
R²	: Belirlilik katsayısı
U	: Ünite
dk	: Dakika
%	: Yüzde
kDa	: Kilodalton
R²	: Belirlilik katsayısı
CV	: Değişim katsayısı
pH	: Hidrojen gücü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Round per minute)
Tm	: Erime sıcaklığı
OD₆₀₀	: 600 nm dalga boyunda ölçülen optik densite



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : <i>Salmonella invA</i> ve <i>bipA</i> gen bölgeleri için dizayn edilmiş primer ve prob dizileri.	14
Çizelge 2.2 : <i>Listeria monocytogenes</i> için <i>inlA</i> ve <i>iap</i> gen bölgeleri için dizayn edilmiş primer ve prob dizileri.	15
Çizelge 2.3 : İnternal kontrol oluşturulması için <i>in vitro</i> mutagenез yönteminde kullanılan primer çiftleri.	16
Çizelge 2.4 : <i>In vitro</i> mutagenез için PCR 1.	16
Çizelge 2.5 : <i>In vitro</i> mutagenез için PCR 2.	17
Çizelge 2.6 : PCR 1 ve PCR 2 için termal protokol şartları.	17
Çizelge 2.7 : <i>In vitro</i> mutagenез için iki PCR (PCR1 ve PCR2) ürününü birleştirme reaksiyonu.	17
Çizelge 2.8 : PCR 1 ve PCR 2 birleştirme reaksiyonu için termal protokol.	18
Çizelge 2.9 : TA klonlama yöntemi için PCR ürününün uygun hale getirilmesi.	18
Çizelge 2.10 : TA klonlama yöntemi için hazırlanan PCR reaksiyonu için termal döngü.	18
Çizelge 2.11 : <i>Salmonella bipA</i> gen bölgesi için optimize edilmiş Real Time-PCR bileşen miktarları.	23
Çizelge 2.12 : <i>Salmonella invA</i> gen bölgesi için optimize edilmiş Real Time-PCR bileşen miktarları.	23
Çizelge 2.13 : <i>Listeria monocytogenes inlA</i> gen bölgesi için optimize Real Time-PCR bileşen miktarları.	24
Çizelge 2.14 : <i>Listeria monocytogenes iap</i> gen bölgesi için optimize Real Time-PCR bileşen miktarları.	24
Çizelge 2.15 : Real Time-PCR reaksiyonları için termal döngü.	24
Çizelge 2.16 : <i>Salmonella spp. bipA</i> gen bölgesi için optimize ddPCR bileşenleri. .	25
Çizelge 2.17 : <i>Listeria monocytogenes</i> için optimize ddPCR bileşenleri.....	25
Çizelge 2.18 : ddPCR reaksiyonları için termal döngü protokolü.	25
Çizelge 3.1 : <i>Salmonella bipA</i> gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.	30
Çizelge 3.2 : <i>Salmonella invA</i> gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.	34
Çizelge 3.3 : <i>bipA</i> gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.	37
Çizelge 3.4 : <i>invA</i> gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.	40
Çizelge 3.5 : <i>Salmonella</i> için Real Time-PCR doğrusalılık deneyinden elde edilen Ct değerleri.	45
Çizelge 3.6 : <i>Salmonella spp.</i> için iki tekrarlı yapılan ddPCR doğrusalılık deneyine ait sonuçlar.	47

Çizelge 3.7 : Doğrusallık 1 ve doğrusallık 2 deneyi için ortalama değerlerin belirlenmesi.....	47
Çizelge 3.8 : 1-3-5 saat ön inkübasyona tabi tutulan örneklerin ddPCR sonuçları. ..	50
Çizelge 3.9 : Şekil 3.6'ya ait ddPCR sonuçları.....	51
Çizelge 3.10 : 850, 85 ve 8.5 kob/ml bakteri içeren dilüsyonlarla kontamine edilen 25 g kıyma örneğinin 3 saat inkübe edilerek elde edilen DNA'nın liyofilizasyon ile tamamının kullanılması.....	52
Çizelge 3.11 : 1130-113-11.3 ve 1.1 kob/ml bakteri ile kontamine edilen 25 g kıyma örneğinin 3 ve 5 saat ön inkübasyondan sonra elde edilen ddPCR sonuçları.....	54
Çizelge 3.12 : Duyarlılık deneyine ait ddPCR sonuçları.	56
Çizelge 3.13 : Probit analizi için 850, 85 and 11 kob/ml bakteri ile kontamine edilerek 3 saat inkübe edilen örneklerden elde edilen ddPCR sonuçları.....	58
Çizelge 3.14 : ddPCR çalışmasında hassasiyet deneyine ait probit analiz sonucu....	59
Çizelge 3.15 : Real Time-PCR çalışması için hassasiyet çalışması.	60
Çizelge 3.16 : <i>Salmonella</i> Real Time-PCR çalışması için probit analizi.	62
Çizelge 3.17 : Real Time-PCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinde elde edilen Ct değerleri (Öz ve diğ, 2020).	63
Çizelge 3.18 : Real Time-PCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen değerler (Öz ve diğ, 2020).	64
Çizelge 3.19 : ddPCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen ddPCR sonuçları(Öz ve diğ, 2020).	64
Çizelge 3.20 : ddPCR çalışması için Çizelge 3.19'a ait ek bilgiler.	65
Çizelge 3.21 : ddPCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen değişkenlik katsayıları.	66
Çizelge 3.22 : <i>Listeria monocytogenes</i> için Real Time-PCR tür içi çapraz reaktivite çalışma sonuçları.....	68
Çizelge 3.23 : <i>Listeria monoytogenes</i> doğrusallık çalışması için Real Time-PCR çalışmasına ait Ct değerleri.....	70
Çizelge 3.24 : <i>Listeria monocytogenes</i> ddPCR doğrusallık çalışma sonuçları.....	72
Çizelge 3.25 : <i>Listeria monocytogenes</i> için ön zenginleştirme süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan ddPCR çalışma sonuçları.....	75
Çizelge 3.26 : <i>Listeria monocytogenes</i> çalışmasına ait DNA örneklerinin liyofilize edilerek 3 kuyucukta çalışılması ile elde edilen ddPCR sonuçları.	76
Çizelge 3.27 : Probit Analizi için tekrarlı çalışmalardan elde edilen sonuçlar.....	79
Çizelge 3.28 : Hassasiyet karşılaştırma çalışması için Real Time-PCR sonuçları. ...	81
Çizelge 3.29 : <i>Listeria monocytogenes</i> için Real Time-PCR tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen Ct değerleri.	83
Çizelge 3.30 : <i>Listeria monocytogenes</i> Real Time-PCR için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için değişkenlik katsayıları.	84
Çizelge 3.31 : <i>Listeria monocytogenes</i> ddPCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde konsantrasyon değerleri.....	85
Çizelge 3.32 : <i>Listeria monocytogenes</i> ddPCR için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için değişkenlik katsayıları.	86

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : pGEMT-Easy vektörü içerisine entegre edilen <i>in vitro</i> mutagenез ürünü Sanger dizileme sonucu.	19
Şekil 2.2 : İnternal kontrol dizisinin entegre edildiği vektörün (pGem-T Easy, Promega) genetik haritası.	20
Şekil 3.1 : <i>Salmonella spp.</i> Real Time-PCR kapsama ve dışlama deneyleri (Öz ve diğ, 2020).	30
Şekil 3.2 : <i>invA</i> ve <i>bipA</i> gen bölgeleri için ddPCR karşılaştırma sonuçları 1D ekran görüntüsü (Öz ve diğ, 2020).	44
Şekil 3.3 : <i>Salmonella spp.</i> Real Time-PCR doğrusalılık çalışması sonuç grafikleri.	45
Şekil 3.4 : <i>Salmonella spp.</i> ddPCR doğrusalılık çalışması.	46
Şekil 3.5 : <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 suşu ile kontamine edilen 25 g kıyma örneğinden 1-3-5 saat inkübasyon ile ddPCR sonuçları.	49
Şekil 3.6 : Bir gece inkübasyona devam eden <i>Salmonella</i> ile kontamine örneklerin ddPCR sonuçları.	50
Şekil 3.7 : <i>Salmonella</i> ile kontamine edilen örneklerden 3 saat inkübasyon sonrası elde edilen DNA'nın liyofilize edilerek kullanılması.	52
Şekil 3.8 : 3 ve 5 saat inkübe edilen örneklerden elde edilen DNA'nın 15 µl dH ₂ O ile sulandırılarak üç kuyucukta çalışılması.	53
Şekil 3.9 : 1.1 kob/ml bakteri dilüsyonu ile kontamine örneklerin 3 saatlik inkübasyonundan sonra DNA'nın ddPCR'da üç reaksiyonda çalışılması (Öz ve diğ, 2020).	56
Şekil 3.10 : <i>Salmonella spp. bipA</i> ve <i>Listeria monocytogenes iap</i> gen bölgesi Real Time-PCR artış eğrilerinin karşılaştırılması.	67
Şekil 3.11 : <i>Listeria</i> tür içi çapraz reaktivite çalışması.	68
Şekil 3.12 : <i>Listeria monocytogenes</i> için Real Time-PCR türler arası çapraz reaktivite testi için örnek gösterim.	69
Şekil 3.13 : <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 suşuna ait kültür örneğinden elde edilen Real Time-PCR doğrusalılık deneyi.	70
Şekil 3.14 : <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 suşuna ait DNA örneğinden elde edilen Real Time-PCR doğrusalılık deneyi.	70
Şekil 3.15 : <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313'e ait DNA dilüsyonu ile Real Time-PCR doğrusalılık grafiği.	71
Şekil 3.16 : <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313'e ait kültür dilüsyonu ile Real Time-PCR doğrusalılık grafiği.	71
Şekil 3.17 : <i>Listeria monocytogenes</i> ddPCR doğrusalılık çalışmasına ait örnek görüntü.	72
Şekil 3.18 : <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 suşu ile gerçekleştirilen ddPCR doğrusalılık grafiği.	73
Şekil 3.19 : <i>Listeria monocytogenes</i> ile kontamine edilen örnekleri için ön zenginleştirme süresinin belirlenmesi.	74

Şekil 3.20 : Kültüre edilen <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 örneklerinden elde edilen DNA'nın liyofilize edilerek �� kuyucukta çalışılması.	76
Şekil 3.21 : 1.14 kob/ml bakteri ile kontamine örneklerden 4 saat inkübasyon sonrası elde edilen ddPCR �alışması 1D görüntüsü.	79
Şekil 3.22 : <i>Listeria monocytogenes</i> için Real Time-PCR hassasiyet �alışması.	81



GIDA PATOJENLERİ İÇİN DİJİTAL PCR İLE HIZLI TESPİT YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Gıdalar besleyici ve metabolize edilebilen substratlar olarak değerlendirildiğinde bu özellikleri nedeniyle birçok mikroorganizmanın büyümesi için uygun ortam sağlamaları kaçınılmazdır. Kontamine yiyecek veya içeceklerin tüketilmesi ile gıda kaynaklı patojenlerin meydana getirebileceği birçok hastalık mevcuttur ve dünya üzerinde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı için yaygın ve ciddi bir tehdit olmaya devam etmektedir. Bu hastalıkların şiddeti basit akut semptomlarla ilgili olabileceği gibi ciddi ve yaşamı tehdit edici seviyelere erişebilir. Patojen mikroorganizma bulaşlarını önlemek ve dolayısıyla insan sağlığı açısından oluşabilecek ciddi durum ve ölümleri engellemek amacıyla gıdalar için üretim aşamasından tüketim aşamasına kadar gerekli kalite kontrol programlarının uygulanması son derece önemli bir süreçtir.

Kalite kontrolde kullanılabilecek geleneksel yöntemler kültüre dayalıdır. Bu yöntemler basit, kolaylıkla adapte edilebilir ve genel olarak ucuzdur. Kültüre dayalı yöntemlerde sırasıyla bakterinin kültür ortamında büyütülmesi, bu ortamdan izole edilmesi, izolasyon sonrası biyokimyasal ve/veya serolojik tanımlama yapılması ve bazı durumlarda subspesifik tanımlama yapılma aşamaları gerçekleşmektedir. Bu nedenle kültüre dayalı tanımlama uzun zaman almaktadır. Bu yöntemlerin, fenotipik özelliklerin ortaya konmasındaki yetersizlikleri, kültüre alınmamış mikroorganizmaların belirlenememesi ve sonuca birkaç günde ulaşılabilmesi gibi dezavantajları insanları hızlı, daha güvenilir, hassas metotların geliştirilmesine yöneltmiştir. Bu yöntemlerin büyük çoğunluğu antikör ve nükleik asit tabanlı teknikleri kapsamakla birlikte geleneksel yöntemlerin modifikasyonu ile oluşan teknikleri de içermektedir.

Patojen mikroorganizmaların tespitinde son yıllarda nükleik asit tabanlı teknikler oldukça önem kazanmıştır. Bunlardan en öne çıkanları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniklerine dayanmaktadır. Gıda patojenlerinin tespitinde gıda mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından kullanılan PCR testleri mevcuttur. Geleneksel PCR yöntemi elektroforez gibi görüntüleme sistemlerine ihtiyaç duyar. İkinci nesil PCR olarak tabir edilebilecek Real Time-PCR tekniğinde, elektroforez gibi işlemlere gerek kalmadan çoğalan ürün aynı anda floresan sinyali ile görüntülenebilmesi yanında kantitasyona da olanak sağlayabilmektedir. Birçok doğrulanmış ve ticarileşmiş farklı özgülüğe, doğruluğa ve hassasiyet limitine sahip ticari Real Time-PCR testi mevcuttur.

Teorik olarak PCR, bir kopya nükleik asitten iki saatten az bir zamanda milyonlarca kopya üretebilmektedir. Fakat gıdalardaki inhibitörlerin varlığı hassasiyeti düşürmektedir. Sonuca ulaşmak 30-90 dakika gibi bir zaman almakla birlikte hassasiyet limitleri 10^3 - 10^4 kob/g civarındadır. Bu nedenle mikrobiyal zenginleştirme yöntemleri ile sistemi kombine etmek düşük patojen sayısı nedeniyle negatif sonuç alınması, fizyolojik olarak strese girmiş veya yaralı patojen hücrelerin tespit zorluğu

ve ölü hücrelerden gelebilecek deoksiribonükleik asitin (DNA) elimine edilememesi gibi birçok limitasyonla baş edilebilmek mümkün olacaktır. Kısmen yapılacak bir ön zenginleştirme işlemi ile hassasiyet limitleri bu yöntemde düşürülebilmektedir. Fakat bu işlem sonuç alma süresini uzatmaktadır. Ön zenginleştirme işlemi mikroorganizmanın çeşidine göre 6-8 saatten 48 saate kadar uzayabilmektedir. Uluslararası Standardizasyon Örgütü'ne göre *Salmonella* için bu süre 18-20 saat, *Listeria monocytogenes* için ise 25-26 saat olarak belirtilmiştir.

Teknolojinin gelişmesiyle bir öncekine göre daha avantajlı sistemler geliştirilmekte ve birçok farklı sistem kullanıcıların onayına sunulmaktadır. Nükleik asitlerin biyolojik ve moleküler biyolojik çalışmalarda doğru ve kesin bir şekilde kantite edilmesi, üzerinde çalışılan ve birçok alanda uygulaması olan önemli bir konudur. Dijital PCR bu iş için oldukça geniş kullanım yelpazesine ulaşmış yeni bir platform olarak görülmektedir. Bu yöntemle herhangi bir referans standarda veya dışsal kontrole ihtiyaç duyulmadan doğrudan nükleik asit kantitasyonu yapılabilmektedir ve yöntem Real Time-PCR sistemi ile aynı primer prob yapısını kullanmaktadır. Real Time-PCR yönteminden farklı olarak inhibitörlere daha dayanıklı olması ve yöntem gereği reaksiyon içerisindeki 1 kopyayı tespit edebilecek hassasiyete sahip olabilmesi dijital PCR yöntemini daha avantajlı duruma getirmiştir.

Bu çalışmada yaygın kullanılan Real Time-PCR sistemi yerine sonuç alma süresini azaltacak bir yöntem araştırması yapılmıştır. 3. nesil PCR olarak da adlandırılan ve bir kopyaya kadar hassas sonuç verebilme yeteneğine sahip Droplet Dijital PCR (ddPCR) sistemi ile *Salmonella spp.* türlerini ve *Listeria monocytogenes*'i yüksek hassasiyette tespit edebilecek minimum zenginleştirme aşamasına sahip bir yöntem geliştirmek üzerine çalışılmıştır. *Salmonella spp.* için gıda matrisi olarak çiğ kıyma örnekleri, *Listeria monocytogenes* için süt örnekleri seçilmiştir. Çalışma sonucunda *Salmonella spp.* için 25 g örnekte 1.39 kob hassasiyette sonuç alınırken *Listeria monocytogenes* için 1.35 kob hassasiyette sonuçlar alınmıştır.

DEVELOPMENT OF RAPID DETECTION METHODS FOR FOOD PATHOGENS USING DIGITAL PCR

SUMMARY

Since foods can be utilized as nutrient and metabolized substrates, they inevitably provide a suitable environment for the growth of many microorganisms. Many diseases can be caused by foodborne pathogens through the consumption of contaminated food or beverages and continue to be a widespread and serious threat to public health around the world. The severity of these diseases may remain in simple acute symptoms or it can reach serious and life-threatening levels. Foodborne pathogens are defined as biological agents capable of causing a foodborne illness and they can be included in bacteria, virus or parasite groups. *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.* and *Yersinia enterocolitica* are considered as the most common foodborne pathogenic bacteria.

Salmonella which is found widely in nature is an important zoonotic pathogen having economic and political importance. Warm and cold-blooded animals' intestinal tract is the main reservoir of the *Salmonella spp.* Due to the contamination, this pathogen has been isolated from a large variety of foods both processed and unprocessed products such as meat, fruit, and vegetables. Salmonellosis caused by *Salmonella spp.*, is an important public health problem. Every year, millions of cases are recorded around the world and resulting in thousands of deaths. The dose of bacteria taken through food is related to the severity of the infection and requires zero tolerance in the process of food control.

Another the most common foodborne pathogen *Listeria* can cause serious infections, especially in immunocompromised individuals, newborns, pregnant women, and elderly people. These infections can cause fetal loss, stillbirth, meningitis, meningoencephalitis, septicemia, and death. The mortality rate of *Listeria monocytogenes* infection is higher than the other food pathogens. *Listeria* species can be found in various environments such as soil, water, wastewater, and foods. This group of bacteria can also survive in refrigerator conditions and it has tolerance to high osmotic pressure, high salt concentration, and low pH. Listeriosis is a severe infectious disease caused by the consumption of food contaminated with *Listeria monocytogenes*. Due to the severity of this disease, zero tolerance is required in most food quality control processes.

It is extremely important to implement the necessary quality control programs for foods from production to the consumption stage to prevent the transmission of pathogenic microorganisms, and thus to prevent both the serious situations concerning human health, and deaths that may occur. Traditional methods used in quality control are based on cultivation. These methods are simple, easily adaptable, and generally inexpensive. However, these methods are time-consuming as they require the growing

of bacteria in a culture media, performing biochemical and/or serological identification after bacterial isolation, and, in some cases, subspecific identification. The disadvantages of these methods, such as their inability to reveal phenotypic characteristics and to identify uncultured microorganisms, as well as the fact that it takes several days to obtain results, have prompted researchers to develop faster, more reliable, and more sensitive methods. The vast majority of these developed methods include not only antibody and DNA-based techniques, but also techniques formed by the modification of traditional methods as well. In recent years, DNA-based techniques have gained importance in the detection of pathogenic microorganisms. The most prominent of these techniques is based on Polymerase Chain Reaction (PCR). There are many PCR methods used in food microbiology laboratories to detect food pathogens. The traditional PCR method requires imaging systems such as electrophoresis. In the Real Time-PCR technique, which can be called the second-generation PCR, the proliferating DNA can be displayed simultaneously with the fluorescent signal without the need for processes such as electrophoresis, and this technique also enables quantitation.

Many validated and commercialized Real Time-PCR methods are available with varying limits of specificity, accuracy, and sensitivity. Theoretically, PCR can produce millions of copies of one copy of DNA in less than two hours. However, the presence of inhibitors in foods reduces sensitivity. Although producing result in PCR takes 30-90 minutes, its sensitivity limits are only around 10^3 - 10^4 cfu/g. Therefore, combining the PCR approach with the microbial enrichment methods can overcome many limitations such as false negative results due to low pathogen count, difficulty in detecting physiologically stressed or injured pathogen cells, and inability to eliminate DNA from dead cells. Combining PCR with a partial pre-enrichment process may reduce the sensitivity limits. However, the pre-enrichment process continues from 6-8 hours to 48 hours depending on the type of microorganism. The time of this process in the ISO standard is specified as 18-20 hours for *Salmonella* and 25-26 hours for *Listeria*. Advantageous systems are being launched out with the development of technology compared to the previous ones, and many different systems are offered to users for approval. The accurate and precise quantitation of nucleic acids by these systems is an important issue and continues to be studied in many fields.

Digital PCR is accepted as a new platform that has reached a wide range of uses. It enables direct nucleic acid quantification without the need for any reference standard or external control. Compared to Real Time-PCR, digital PCR is more resistant to inhibitors and has the sensitivity to detect even one copy in the reaction, making it more advantageous. This system combines PCR and digital imaging technology. The working principle of digital PCR can be summarized as, dividing the reaction into compartments and counting each compartment by checking of the selected fluorescent. One of the commercially available digital PCR technologies is based on microdroplet production, while the other is based on microfluidic chips. In droplet digital PCR (ddPCR) thousands of droplets are generated by the titration of water, oil, and stabilizing chemicals within a tube. In the first step, the sample is put into a machine called a droplet generator with all the required chemicals. After, the 20 μ L mixture is divided into approximately 20000 droplets through titration. In this step, DNA is distributed randomly into the droplets with the chemicals required for PCR. Following this, the tube is put into a thermal cycler for the PCR process. Hereby, a separate PCR process occurs in every droplet. After the PCR step, the droplet reader counts droplets by determining the fluorescent as positive or negative. Using Poisson statistics,

average target DNA copy number is calculated per reaction due to the estimation of concentration.

In this study, via using ddPCR, a highly sensitive, precise, and rapid method is developed for detecting the most common two food pathogens: *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* instead of widely used Real Time-PCR based methods. ddPCR technology is combined with the minimum enrichment time that would generate same-day reports. While raw minced meat samples are selected as a food matrix for *Salmonella spp.*, milk samples are selected for *Listeria monocytogenes*. As a result, by means of this new method, a sensitivity of 1.39 CFU is obtained in a 25 g sample for *Salmonella spp.*, while that of 1.35 CFU is obtained for *Listeria monocytogenes*.

The effectiveness of primer probes used in this study is investigated with various performance experiments. Taqman hydrolysis probe technology used in Real Time-PCR could also be used in ddPCR. Using the same primers and probes in the digital PCR stage makes it possible that Real Time-PCR can be used for the control of ddPCR. In this way, PCR can be screened simultaneously and the optimization of the PCR stage for the digital PCR will be completed to a large extent. In order to test the performance of the method, Real-Time PCR experiments are also conducted in this study. The addition of internal control to the experimental setup from the DNA isolation stage will provide information on both the success of DNA extraction and the existence of any PCR inhibitors. For this purpose, a sequence of 5' untranslated region (UTR) of the Hepatitis C Virus is selected and the probe binding region replaced a sequence belonging to the human *Factor 5* gene by *in vitro* mutagenesis method. After that, it is cloned into a vector.

The specificity of the primers and probes used in this study is tested experimentally by exclusion and inclusion studies and is found as 100%. Specificity studies were also checked by *in silico* homology search. Since the primers and probes used in both Real Time-PCR and ddPCR studies share the same chemistry, specificity studies are limited by Real Time-PCR. *Salmonella* specificity test is performed with 86 different isolates belonging to *Salmonella spp.* species and with 74 non-*Salmonella spp.* The *Listeria* specificity test is performed with 10 different *Listeria monocytogenes* isolates, 4 different *Listeria spp.* isolates and 132 different non-*Listeria* isolates. Real Time-PCR linearity experiments are performed for both DNA isolated from serially diluted bacterial cultures from stock and dilutions of isolated DNA. The dynamic range is found at an acceptable range for both *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*. Linearity experiments are also performed for ddPCR. The dilution series obtained from 10-fold differences of the cultured bacteria are used to calculate the dynamic range. The range is found acceptable in both *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. The performance of the system is also tested in terms of its sensitivity, reproducibility, and repeatability. The results obtained from the experiments show that model performance meets the desirable criteria.

In this study, the recognition ability of ddPCR with maximum sensitivity is tried to be measured by adding the shortest possible pre-enrichment step. While this period is determined as 3 hours for *Salmonella*, it is determined as 4 hours for *Listeria monocytogenes*. This step also eliminates the problem of living-dead bacteria separation. The addition of this step makes the proposed method more sensitive and has higher performance when compared to the Real Time-PCR.

1. GİRİŞ

Çalışma içerisinde önerilen tespit yöntemi için en sık rastlanan gıda patojenleri içerisinde *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* için tasarımlar ve deney planlamaları yapılmıştır. Bu bağlamda ilgili patojenlerin karakteristik özellikleri ve genel tanımlama yöntemleri ile ilgili bilgiler sunulmuş olup kullanılacak yöntem ile ilgili bilgiler sıralanmıştır.

1.1 *Salmonella spp.* ve Karakteristik Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesinden çomak şeklinde ve spor oluşturmeyen formda olan *Salmonella* türleri fakültatif anaerob olup gram negatif bakteri grubunda yer alır. *Salmonella* 2-5 mikron uzunluğunda ve 0.5-1.5 mikron genişliğinde hareketli kamçıya sahiptir. *Salmonella* serovarları 4460-4857 kb arasında değişen genom büyüklüğüne sahip olup *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olarak iki gruba ayrılır (El-Gazzar ve Marth, 1992; Andino ve Hanning, 2015). *Salmonella enterica* ise 6 alt türü içermekte olup bu türler;

S. enterica subsp. enterica,

S. enterica subsp. salamae,

S. enterica subsp. arizonae,

S. enterica subsp. diarizonae,

S. enterica subsp. houtenae

S. enterica subsp. indica (Grimont ve Weill, 2007) olarak gruplandırılmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü Referans ve Araştırma İşbirliği Merkezi (WHO Collaborating Centre for Reference and Research) tarafından *Salmonella* için önerilen Kauffman-White sınıflandırma yöntemine göre *Salmonella*'nın 2579 alt tipi bulunmaktadır. Bu yöntemde somatik, flagellar ve kapsüler antijenlerine göre bir sınıflandırma yapılmaktadır ve serotiplerin 2557 adet ile büyük çoğunluğu *Salmonella enterica* türüne ait iken 22 tanesi ise *Salmonella bongori* türüne aittir (Wray ve Wray 2000).

7°C ile 45°C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında büyüme özelliğine sahip olan bu mikroorganizma için optimal büyüme sıcaklığı 37°C olup birçok farklı gıdada 2-4°C aralığında geliştiği tespit edilmiştir (Josefsen, 2009). Konak ve konak dışı ortamlardaki yaşam döngüsü sebebiyle her yerde rastlanabilen (Wiedemann ve diğ, 2015) bu organizma toprak, bitki, su gibi doğal ortamlarda önemli ölçüde gelişemese de şartların elverişliliği çerçevesinde su içerisinde haftalarca ve toprak içerisinde yıllarca canlı kalabilir (Hansen, 2013).

Kuş, sürüngen ve böcek gruplarının da bağırsaklarında rastlanabilen bu bakterinin büyüme ve üremek için kullandıkları ana ortam insan ve çiftlik hayvanlarının bağırsaklarıdır. Bağırsak boşluğunda kolonize olan *Salmonella* feçes ile dışarı atılarak dış ortamda bulaş oluşturmakta başka hayvanların da bağırsaklarında kolonize olabilmektedir. Birçok yere bulaş yapabilen bu bakteri genel olarak kirli sularda bulunur. Bu suları tüketen insan ve hayvan dışkıları ile kontaminasyon döngüsü devam edebilir (Andino ve Hanning, 2015). Uluslararası platformda hayvanların ve hayvansal ürünlerin sevkiyatı dünya çapında *Salmonella spp.* yayılımından büyük ölçüde sorumludur (Andino ve Hanning, 2015).

Dünya Sağlık Örgütü Gıda Kaynaklı Hastalık Yükü Epidemiyoloji Referans Grubu (Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group of WHO)'na göre dünya çapında her yıl 1.9 milyar kişi diyareye (ishal) yakalanmakta olup 715000 ölüm gerçekleşmektedir. Diyare vakalarının üçte biri gıda kaynaklı olup %9'luk kısmı *Salmonella spp.* ile ilişkilidir ve bu oran 180 milyon vakaya karşılık gelmektedir (Besser, 2018). 230000 vaka ile non-typhoidal *Salmonella enterica* ölümlerin çoğundan sorumludur (Havelaar ve diğ, 2015). Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) verileri incelendiğinde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her sene 1.35 milyon *Salmonella* enfeksiyonu ile birlikte 26500 hastaneye yatış vakası ve 420 kişinin ölümü meydana gelmektedir (URL-1).

Salmonella spp. süt, biftek, domuz eti, tavuk yumurtası, işlenmiş ve işlenmemiş yiyecekler gibi çok çeşitli gıdalardan izole edilmiş olup kontamine olmuş gıdaların tüketimi ile hem insan hem de hayvanlarda salmonellozise neden olmaktadır (Lim ve diğ, 2005; Wray ve Wray, 2000; de Freitas Neto ve diğ, 2010; URL-1) Hastalığın ciddiyeti kontaminasyonun dozuna bağlıdır (Malorny ve diğ, 2008) ve bu seviye oldukça düşüktür (Hara-Kudo ve diğ, 2005; Wolffs ve diğ, 2006; Malorny ve diğ,

2008). Bu nedenle, *Salmonella spp.*'nin gıdalarda sıfır tolerans ile aranması istenmektedir.

Salmonellozis insan ve hayvanlarda semptomlara göre tifo (enterik ateş) ve non-tifoidal salmonellozis adı verilen iki grup altında incelenir (Sánchez-Vargas ve diğ, 2011; Langridge ve diğ, 2012). *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*, *S. sendai* serovarları enterik ateş ile ilişkili olup insan için invazivdirler ve sistemik hastalığa neden olurlar. Enfeksiyonu takiben nadir olarak gastroenteride neden olurlar. Non-tifoidal olan salmonellozis ise nadir olarak ekstraintestinal fokal enfeksiyonlarla ilişkili olup özellikle gastroenterit ile ilişkilendirilmektedir (Langridge ve diğ, 2012).

Salmonella konak aralığına göre; konak adapte (konak ile sınırlandırılmış) ve konağa adapte olmayan (konakla sınırlandırılmamış) *Salmonella spp.* tipleri olarak iki gruba ayrılır (Uzzau ve diğ, 2000; Wray ve Wray, 2000). Konak adapte serotipler belli sayıda türde sistematik hastalıklara neden olurlar. *Salmonella typhi* sadece insanda sistemik hastalıkla ilişkilidir (Uzzau ve diğ, 2000; Wray ve Wray, 2000; Crump ve diğ, 2015; de W Blackburn ve McClure, 2009). Konakla sınırlandırılmamış serotipler ise geniş bir aralıkta birbiriyle ilişkisiz konaklarda enfeksiyona neden olabilir.

İnce bağırsakta çoğalan *Salmonella* kolonize olur ve bağırsak dokusuna geçerek enterotoksin üretimi ile birlikte inflamatuvar reaksiyona ve ishale neden olur. Eğer kan dolaşımına katılır veya lenfatik sisteme geçiş yaparsa daha ciddi sorunlara yol açabilir. Küçük çocuklar ve yaşça büyük veya kronik hastalığı olan kişiler veya immün sistemi baskılanmış kişiler salmonellozise karşı daha hassastırlar (de W Blackburn ve McClure, 2009).

Hastalığın seyri, alınan bakteri dozuna, kişinin immün özelliklerine ve genetik alyapısına ve enfekte eden *Salmonella* türünün genetik özelliklerine bağlıdır (Wray ve Wray, 2000). Enfektif dozun 10^5 hücre veya daha fazlası olduğu uzun yıllar düşünülmesine rağmen, salgın kayıtlarından 10-100 hücreden daha az olduğu bilgisi elde edilmiştir (de W Blackburn ve McClure, 2009; Kothary ve Babu, 2001).

Yıllık olarak 40000'den daha fazla vaka *Salmonella* ile ilişkilendirilmektedir. 1980'li yıllardan sonra *Salmonella spp.* kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasında artış yaşanmış olup ekonomik anlamda önemli sağlık harcamalarının yanında hastalığa yakalanan kişiler için finansal olarak kayıplara ve işveren kurumlar için hasta

Çalışanlardan dolayı performans anlamında düşüşlere sebep olmuştur. Yıllık mali kaybın 3.6 milyar dolardan fazla olduğu rapor edilmiştir (Keskin, 2022).

1.2 *Listeria monocytogenes* ve Karakteristik Özellikleri

Listeria genusu, gram-pozitif, omak şekilli, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, 0.5 mikron genişliğinde 1.5 mikron uzunluğunda birbiriyle yakın ilişkili bir grup bakteriyi içermektedir. *Listeria* türleri ideal olarak 30-37°C de çoğalmaktadır fakat - 0.4 - 45°C arası sıcaklığa dayanıklıdır (Välímáa ve diğ., 2015). *Listeria* genusu 17 türü kapsamaktadır (Jeyaletchumi ve diğ., 2010; Liu, 2006; Rothrock Jr ve diğ., 2017; Orsi ve Wiedmann, 2016; Orsi ve diğ., 2011; Datta ve Burall, 2018). Bu türler *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocortiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, *Listeria booriae* olup sadece *Listeria monocytogenes* insan patojenidir, fakat *L.seeligeri*, *L.ivanovii* and *L.innocua*’nın insanda hastalık oluşturduğu ile ilgili az sayıda rapor bulunmaktadır (Jeyaletchumi ve diğ., 2010). *Listeria monocytogenes* aynı zamanda geviş getiren hayvanlarda da enfeksiyon yaratabilir (Guillet ve diğ., 2010). *Listeria* somatik ve flagellar antijenlerine göre 13 serotipe ayrılmakta olup bu serotipler 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7 olarak gruplandırılmaktadır. Bunlar arasında, 1/2a, 1/2b, and 4b serotipleri insanlarda hastalığa neden olan en yaygın serotiplerdir (Rasheed, 2022).

Toprak, su, atık su gıdalar gibi çok çeşitli ortamlarda bulunabilen *Listeria* türleri hazır gıdaların artan tüketimi ile birlikte gıda kaynaklı fırsatçı bir patojen haline gelmiştir. Listeriozis adı verilen gıda kaynaklı hastalığa neden olan *Listeria monocytogenes* pastörize edilmemiş süt, peynir, pişirilmemiş et ve yemeye hazır gıdalardan insanlara bulaşabilmektedir (Henri ve diğ., 2017; Gilmour ve diğ., 2010). *Listeria monocytogenes*’in tatlı ve tuzlu sular yanında, hayvan yem ve gübrelerinden, kümes hayvanlarından, deniz mahsullerinden, pişmiş ve pişmemiş et ve et ürünlerinden, sebze ve meyve gibi birçok üründen, sığır yüzey ve karkaslarından izolasyonu sağlanmıştır (Keskin, 2022). Dış ortamda oldukça yaygın olarak bulunmasının yanında yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek ozmotik basınç, düşük pH gibi zor çevresel şartlara toleranslı olması, dolap sıcaklığında bile gelişebilmesi gibi özellikleri sebebiyle gıdaların üretim

ve dağıtım aşamalarında *Listeria* kontaminasyonu kolaylaşmaktadır (Rothrock Jr ve diğ, 2017; Liu ve diğ, 2015). *Listeria* özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde, yeni doğanlarda, hamilelerde ve yaşlı insanlarda ciddi enfeksiyonlar yaratabilir. Bu enfeksiyonlar ölü doğum, menenjit, meningoensefalit, sepsis ve ölüme neden olabilir (Almeida ve Almeida, 2000; Lee ve diğ, 2012; Yildirim ve diğ, 2010). *Listeria monocytogenes* nedeniyle ölüm oranı diğer gıda patojenlerinden *Salmonella enteridis*, *Campylobacter* ve *Vibrio* türleri gibi gıda patojenlerini %30 gibi bir değerle geçmektedir (Liu, 2006). Avrupa Birliği'nde 2011 yılında 1476 vaka yaşanmış ve listeriozis %12.7'lik ölüm oranıyla Avrupa Birliği sürveyansı altındaki tüm zoonotik hastalıklar arasında en ciddi insan hastalığına neden olmuştur (Välimaa ve diğ, 2015).

Listeria monocytogenes tarafından kontamine olmuş gıdanın konakçı tarafından tüketilmesi ile mide asidi, konakçı proteolitik enzimleri vs. gibi çevresel faktörleri stres cevap genleri ile aşan *Listeria monocytogenes* internalin adı verilen yüzey proteinlerinin yardımıyla konakçı hücre içerisine girer (Liu, 2006). Internalin proteinleri patojenite için önemlidir. Ancak patojenik ve patojenik olmayan *Listeria* türleri içerisinde internalin kodlayan birçok gen bulunmasına rağmen sadece *inlA* ve *inlB* ve *inlC* genleri virulansla ilişkilendirilmiştir (den Bakker ve diğ, 2010). Bu proteinlerden InlA proteini *inlA* geni tarafından kodlanır ve 88 kDa'dur. E-cadherin'e bağlanarak *Listeria monocytogenes*'in konak hücre içine taşınmasını sağlar. Diğer önemli proteinlerden InlB, *inlB* geni tarafından sentezlenen 65 kDa'luk proteindir. Bu protein patojenin fibroblast, hepatosit, epitel hücreleri gibi daha geniş konak hücre tipine patojenin girişini sağlar. Hücre içine giren *Listeria monocytogenes* vakuol içerisinde lokalize olarak vakuolü parçalar. Parçalama işlemini *Listeria monocytogenes* virulansı için önemli olan Listeriolisin O (LLO) toksini (*hly* geni tarafından kodlanır) ve Phosphatidyl-inositol-phospholipase (PI-PLC) tarafından gerçekleştirilir. Vakuolün parçalanması ile sitosole geçen *Listeria monocytogenes* hücre içi büyüme ve çoğalma gösterir (Liu, 2006). *Listeria monocytogenes* türleri genetik olarak birbirinden farklıdır ve farklı virülans potansiyelleri göstermektedirler. Tür çeşitliliği hakkında detaylı bilgi hala eksiktir (Ragon ve diğ, 2008).

Listeria monocytogenes'in gıda kontaminasyonuna dayalı listeriozis vakalarında enfektif dozu $>10^4$ kob/g'dir. *Listeria monocytogenes* $<10^4$ kob/g gibi düşük dozda içeren gıda tüketimi ile klinik hastalık oluşurken 10^2 – 10^4 kob/g içeren gıda tüketimi

immün sistemi baskılanmış kişilerde listeriozise neden olmuştur (Välimaa ve diğ, 2015).

ABD’de yıllık olarak 250 ölümle birlikte toplam 1600 listeriozis vakası olduğu tahmin edilmektedir. Listeriozisin neden olabileceği toplam ekonomik yükün ise sağlık masrafları, üretimde meydana gelebilecek kayıplar ve yaşam kalitesindeki düşüklükle beraber yaklaşık 2.04×10^{12} dolar olduğu, yıllık vaka başına ise 1282000 dolar olduğu tahmin edilmektedir (Välimaa ve diğ, 2015).

1.3 *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* Tespit Yöntemleri

Salmonella spp. tanısı için kullanılan ve geleneksel olarak kabul edilen kültüre dayalı tanımlama işleminde seçici olmayan ön zenginleştirme aşamasını takip eden seçici bir zenginleştirme basamağı ve bunu takip eden seçici katı besiyerinde üreme gösteren şüpheli kolonilerin serolojik ve biyokimyasal olarak incelenerek doğrulanması aşamaları vardır (Lee ve diğ, 2015). Bazı kurumlar tarafından bu zenginleştirme aşamaları farklı olmakla birlikte uluslararası kabul gören ISO 6579-1:2017 metodunda ön zenginleştirme işlemi Buffered Peptone Water (BPW) ve devamında Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone (RVS) ile Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) sıvı besi yerinde selektif zenginleştirilmesini kapsamaktadır. Bu standardın hassasiyeti 25 g örnek için 1 kob *Salmonella*’yı tanımlamak olarak belirlenmiştir (ISO, 2017). Seçici katı besiyeri üzerinde inkübasyon sonucu üreyen kolonilerin biyokimyasal ve serolojik doğrulanması yapılır ve prosedürün tamamı 4-6 iş gününde sona ermektedir (ISO, 2017).

Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO), Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı- Gıda Güvenliği ve Denetim Hizmeti (USDA-FSIS) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından *Listeria monocytogenes* aranması için önerilen teknikler günümüzde kullanılan güvenilir teknikler olarak yer almaktadır. *Salmonella* tanısında olduğu gibi *Listeria monocytogenes*’in tanısında da “gold standard” olarak tanımlanan kültürleme yönteminde ön zenginleştirme aşamasını takiben yine bir seçici zenginleştirme aşaması ve sonrasında katı besiyerinden selektif izolasyon ve takiben doğrulama işlemleri yer alır. Ön zenginleştirme için FDA metodunda Buffered *Listeria* Enrichment Broth Base (BLEB) kullanılmakta olup UVM *Listeria* Enrichment Broth USDA/FSIS tarafından önerilmektedir. ISO 11290-1 standardı ise Fraser Broth’u ön zenginleştirme için kullanmaktadır. Örneklerin ön zenginleştirme ve selektif olarak

zenginleştirme işlemlerinden sonra selektif besiyeri olarak, Palcam ve Modifiye Oxford Agar (MOX) en çok tercih edilen besi yerleridir (Kevenk, 2014).

Gıdalarda Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre 25 g örnekte *Listeria monocytogenes*'in hiç bulunmaması gerektiği bildirilmiş olup *Listeria monocytogenes*'in belirlenmesinde sıfır tolerans koşulu izlenmektedir. Bunun için 25 g örnekte var/yok testi uygulanmaktadır (Keskin, 2022; Kevenk, 2014). Birçok ülkede yasal düzenlemelerle tolerans sınırları belirlenmiştir. Avrupa Komisyonu ve Uluslararası Gıda Mikrobiyal Spesifikasyon Komisyonu (ICMSF, International Commission on Microbiological Specification for Foods) tarafından yemeye hazır ürünlerde için *Listeria monocytogenes* sayısının 100 kob/g'den az olmasını önermektedir. ABD'de aynı durum için sıfır tolerans olarak önerilmektedir (Lee ve diğ, 2015).

Konvansiyonel yöntem olarak da adlandırılan kültüre dayalı geleneksel yöntemler gıda patojenlerinin tespitinde özgüllükleri, güvenilirlikleri ve hassasiyetleri nedeniyle "gold standart" metot olarak adlandırılmaktadır (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Hem kalitatif hem kantitatif sonuç vermeleri ve ucuz olmaları gibi avantajlara rağmen sonuç alma süresinin birkaç gün sürmesi bu yöntemin dezavantajlarından (Mandal ve diğ, 2011). Halk sağlığını korumak, infektif hastalığın yayılımını önlemek, gıda güvenliğini sağlamak için ham madde ve bitmiş ürünlerin patojen bakımından hızlıca araştırılması birçok yönden önemlidir. Düşük sayıda hatta 1 kob patojenin bile enfektif dozda olabileceği düşünüldüğünde kompleks biyolojik ortamdan ve patojenik olmayan organizmalardan patojenik organizmanın ayrılmasını sağlayacak testlerin geliştirilmesi ve bu testlerin aynı zamanda insan kaynaklı hataların üstesinden gelerek zaman kazandırması ve ucuz olması tercih sebebi olacaktır (Mandal ve diğ, 2011). Biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ve teknolojinin ilerlemesi ile birlikte gıda patojen tespiti için daha hızlı sonuç veren birçok yöntem zaman içinde geliştirilmiştir. Birçok araştırmacı ise hızlı gıda patojen testleri geliştirme üzerine çalışmaktadır. Bu yöntemler hızlı testler adı altında değerlendirilir (Mandal ve diğ, 2011). Kültüre dayalı yöntemlerin immünolojik ve moleküler temelli yöntemlerle kombinasyonu ile sonuç alma zamanı iyileştirilmeye çalışılmıştır. Bu testler ilk nesil hızlı testler adı altında değerlendirilebilir (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Hızlı testler genel olarak immünolojik testler, nükleik asit tabanlı testler ve biyosensör tabanlı testler olarak sınıflandırılabilir (Zhao ve diğ, 2014).

İmmünolojik testler, nispeten ucuz kolay uygulanabilir testler olarak karşımıza çıkmaktadır. Kullanılan özel antikorlar kendine özgü antijene bağlandığında tanımlama yapan bu sistemlerden en çok kullanılanı Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Çok kullanılan diğer yöntem ise lateral-flow immunoassay dir (Law ve diğ, 2015). Sandwich ELISA yöntemi en etkili yöntemlerden olup bu sistemde antikorlardan biri mikrotitre plaka kuyucuklarına immobilize edilir. Test edilmek istenen gıda örneğinden gelen bakteriye ait antijen varsa bu antikora bağlanır. Antikora bağlanmayan antijenler ortamdaki uzaklaştırılır ve enzim bağlı olan ikinci bir antikor sisteme eklenerek antijene bağlanması sağlanır. İki antikor arasında kalan antijen renksiz substratın renkli forma geçmesi ile tanımlanır (Zhao ve diğ, 2014). ELISA yönteminde bakteri için 10^3 - 10^5 kob/ml arasında olan hassasiyet limiti toksin veya proteinler için birkaç ng/ml arasındadır. Tanı için yüksek sayıda hücre gerektiğinden direk gıda örneklerinden tespit olanaksızdır. Tespit için en az 16-24 saatlik zenginleştirme işlemi gereklidir (Mandal ve diğ, 2011). Bu yöntemle yapılmış ticari BIOLINE *Salmonella* ELISA testi ile test edilen 20 gıda matriksinden en az 4 tanesinde hassasiyet 1kob/25g örnek olarak bulunmuştur (Bolton ve diğ, 2000). Fakat en az 24 saatlik ön zenginleştirme aşaması gereklidir. “Lateral Flow Immunoassay”lerde ise önceden membran üzerine tutturulmuş antikor veya antijenin test edilmek istenen gıda örneğinde hedefi bulması ile membran üzerinde oluşan renk değişiminin görsel olarak izlenmesi söz konusudur. Renk değişimi için genellikle streptavidin-biotin sistemi kullanılmakta olup birçok test için 2-10 dakika içerisinde bu değişim gözlemlenmektedir (Zhao ve diğ, 2014). Ön zenginleştirme aşaması ile kombine ticari olarak kullanılan birçok “lateral flow” testi bulunmaktadır. Bu sistem 10^7 - 10^8 kob gibi yüksek konsantrasyonda hücreye ihtiyaç duymakta olduğundan bir zenginleştirme aşaması gereklidir (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Teknolojik gelişmeler ile birlikte bu yöntemler üzerine otomatize edilmiş ve daha verimli sistemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler dışında prosese spesifik antikorlarla kaplı magnetik boncukların kullanıldığı “immuno-capture” yönteminde tanımlanmak istenen bakteri bulunduğu floradan ve inhibe edici maddelerden ayrılır ve testin hassasiyeti yükseltilir. Bu metodun moleküler yöntemlerle kombinasyonu testin gücünü arttırmaktadır (Gasnov ve diğ, 2005).

Biyosensörler enzim, antikor, nükleik asit ve hücre reseptörü gibi biyolojik materyali tanıyarak bu tanımayı bir dönüştürücü ile ölçülebilen elektrik sinyaline dönüştürebilen

analitik cihazlar olarak tanımlanabilir (Zhao ve diğ, 2014). Biyosensörler dönüştürücü mekanizmalarına göre kategorize edilir. Optik biyosensörler, elektrokimyasal biyosensörler, piezoelektrik biyosensörler, immünosensörler, yüzey plazmon rezonans biyosensörleri bunlardan bazılarıdır (Zhao ve diğ, 2014). Spesifik olarak çevresel örneklerden ve gıda örneklerinden tanıma yapan birçok biyosensör geliştirilmiştir (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Biyosensörlerin en önemli avantajlarından biri hızlı ve gerçek zamanlı sonuç vermesi ve birçoğunun kolay taşınabilir olmasıdır. Biyosensörlerin iyi bir tanı kabiliyeti vardır ve ön zenginleştirme gerektirmez (Law ve diğ, 2015). Gıda patojenlerinin tespiti için yaygın olarak optik biyosensörler geliştirilmiştir. Elektrokimyasal biyosensörlerle de oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Örneğin sebze örneklerinde antikor tabanlı potansiyometrik biyosensör ile *E. coli* için hassasiyet 10 hücre/ml olarak bulunmuştur (Law ve diğ, 2015). Biyosensörler düşük hacimde yüksek saflıkta örneğe ihtiyaç duyar. Bu ihtiyaca rağmen büyük çoğunluğunun hassasiyet limiti istenen seviyede değildir. Bu seviyeye ulaşabilmek için ön zenginleştirme işlemleri ile kombinasyon teorik olarak istenen hassasiyeti sağlayabilir (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Biyosensörlerin ucuz ve güvenilir olarak üretilmesi, saklanması, stabilizasyonu ve sensör kalibrasyon metotları ile ilgili problemler yaygın olarak kullanılmasının önündeki önemli problemlerdendir (Law ve diğ, 2015).

Nükleik asit tabanlı testlerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gıda patojenlerinin tespitinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemle sentetik olarak sentezlenen hedefe özgü tek zincirli deoksiribonükleik asit (DNA) parçaları ilgili bölgenin 5' ucu ve 3' ucunda homoloji gösterdiği bölgeye bağlanarak istenilen DNA parçası termostabil DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılır. DNA bölgesini çoğaltma işlemi genellikle 3 aşamalı döngünün çoklu tekrarı ile otomatik "thermal cycler" cihazları içerisinde gerçekleştirilir. İlk aşama çift zincirli DNA'nın denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesidir. Bu işlem için 95°C gibi yüksek sıcaklıkta DNA'yı belli süre ısıtmak yeterlidir. İkinci aşamada 5' ve 3' DNA dizisine özel olarak tasarlanmış oligonükleotidlerin tek zincirli hale gelmiş olan DNA üzerindeki spesifik bölgeye hibridize olması aşamasıdır. Bu işlem için sıcaklığın hibridizasyon sıcaklığına getirilmesi gereklidir. Uzama adı verilen sonraki aşamada DNA polimeraz enziminin ortamdaki deoksiribonükleotidleri kullanarak oligonükleotidleri uzatma ve DNA sentezini gerçekleştirme işlemi vardır. Çoğaltılan DNA bölgesi görsel olarak jel elektroforez ile

görüntülenir. PCR yöntemi hızlı ve hassas bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Kültürleme ve immünolojik yöntemlere göre daha hızlı olmasına rağmen çok düşük hassasiyet limitlerini karşılayamıyor olması bir dezavantajdır (Priyanka ve diğ, 2016).

Günümüzde PCR yönteminin bir üst versiyonu olarak kabul edilebilecek Real Time-PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmakta olup bu yöntemde çoğaltılan nükleik asit bölgesi sürekli olarak görüntülenmekte ve artışlar eğri olarak bağlantılı yazılım üzerinden görüntülenebilmektedir. Görüntüleme işlemi farklı şekilde ışıma yapma özelliğine sahip probler yardımıyla olmaktadır. Bu yöntem hızlı, spesifik ve güvenilir bir yöntem olmakla birlikte farklı organizmaların eş zamanlı olarak tanımlanması aynı anda mümkün olabilmektedir (Priyanka ve diğ, 2016).

PCR yöntemi çok güçlü bir yöntem olarak karşımıza çıkmakla birlikte gıdalardan veya patojen zenginleştirme işlemi sırasında kültür ortamından gelen inhibitörlerden etkilenmektedir. Diğer yandan canlı ve ölü hücrelerden gelebilecek nükleik asiti ayırt etmeden çoğaltır (Mandal ve diğ, 2011). Ölü hücrelere ait DNA'yı elimine etmek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Ribonükleik asit (RNA), hücre ölümünden sonra çabuk bozulmaya uğradığından canlı hücrelere ait nükleik asiti tespit etmek üzere PCR'da hedef molekül olarak kullanılması bu yöntemlerden biridir. Fakat bu yöntemde hücrenin canlılığını kaybetmesinden sonra kalıcı olabilecek veya bozulmaya henüz uğramamış RNA bölgelerinin çoğaltılması ihtimal dahilindedir. Ethidium bromide monoazide (EMA) ve propidium monoazide (PMA) gibi DNA ya bağlanan boyalar ile canlı ölü bakteri ayrımı PCR aşamasında yapılabilmektedir (Dwivedi ve Jaykus, 2011). Bu yaklaşımda hücre zarı bütünlüğü bozulmuş olan hücreler ölü kabul edilir ve hücre zarı zarar görmüş olduğundan (Wagner ve diğ, 2008) bu boyalar ile muamele sonrası boyaların azid grupları ile DNA arasında görünür ışık sayesinde kovalent bağ oluşturulur. Bu şekilde işlem görmüş örneklerden DNA izolasyonu sonrasında PCR reaksiyonu içerisinde eğer ölü hücrelerden gelen EMA veya PMA'ya bağlı DNA molekülleri varsa PCR inhibisyonu gerçekleşir. Bu durumda sadece membran yapısı bozulmamış hücrelerden gelen DNA'ya ait bir amplifikasyon olacağından ölü hücrelerin DNA'ları reaksiyondan elimine edilmiş olur (Wagner ve diğ, 2008).

Yeni geliştirilen bazı PCR metotları ve nano/biyosensörler de 10^2 - 10^4 hücre veya pikogram seviyesindeki toksinleri tanıyabilme kabiliyetleri belirtilmiş olup bu yaklaşımlarda düşük seviyeleri saptayabilme özelliği nedeniyle eğer hassasiyet ihtiyaçlara uygun ise hiç kültürleme yapmadan direk patojen tespit edilebilir veya çok

daha kısa bir zenginleştirme aşaması yeterli olabilir. Bu durumda patojen 4-8 saat içerisinde tanımlanabilir fakat bu sistemlerde tekrarlanabilirlik ve doğruluğun belirlenmesi ortamdan gelebilecek PCR inhibitörleri ve strese girmiş veya yaralanmış hücrelerin tespiti ile ilgili problemler mevcuttur. Bu nedenle birçok kit bu problemlerin eliminasyonu için 24 saatlik zenginleştirme aşamasını önermektedir (Bhunja, 2014).

“Loop-mediated isothermal amplification”, “nucleic acid sequence-based amplification”, “DNA microarray” yöntemleri PCR’a dayalı olmayan nükleik asit tanı yöntemleri olup gıda patojenlerinin tespitinde de kullanılan diğer tekniklerdir (Wang ve Salazar, 2016).

1.4 Dijital PCR

Moleküler biyolojik araştırmaların birçok alanında oldukça yaygın kullanım alanı bulan dijital PCR (dPCR) nükleik asitlerin kantitasyonu ve tanımlanması için yeni bir yaklaşım olarak tanımlanabilir. Bu yöntemde herhangi bir referans veya dış kontrole ihtiyaç duyulmadan hedef molekülün kopya sayısı belirlenir. Yöntemin ana çalışma prensibi “böl ve say” olarak özetlenebilir. Yaygın olarak kullanılan iki tip dijital PCR yönteminden birisi mikroakışkan çip tabanlı dijital PCR olarak adlandırılırken diğeri emülsiyon PCR tabanlı dijital PCR olarak adlandırılır (ddPCR, droplet digital PCR) (Hindson ve diğ, 2011). ddPCR yöntemi Real Time- PCR yöntemi ile aynı primer prob teknolojisini kullanır. Bu yöntemde araştırılmak istenen nükleik asitle birlikte PCR reaksiyonu için gerekli olan primer ve problemler ve diğer gerekli bütün kimyasallar karıştırılarak “droplet generator” denen cihazda su, yağ ve stabilize edici kimyasallar ile birlikte titre edilir (Huggett ve diğ, 2015). Titrasyon sonucu 20 mikrolitrelik karışım “droplet” de denen yaklaşık 20000 kompartmana ayrılır (Pinheiro ve diğ, 2012; Sedlak ve Jerome, 2013). Her droplet, bir yağ küreciğinin içerisinde PCR için gerekli bütün malzemeleri içeren bir yapıdır (Huggett ve diğ, 2015). Kürecikler birbirine eşittir ve bu küreciklerin içerisine dağılan DNA rastgele yerleştirilir (Hindson ve diğ, 2011). Her bir droplet bu durumda ya bir ya da birden fazla hedef DNA içerirken bazıları içermeyecektir. Kürecik oluşturma işleminden sonra elde edilen yapı PCR işleminin oluşması için termal döngü cihazına yerleştirilir ve reaksiyon gerçekleştirilir. Böylece bir PCR tüpü içerisinde kompartmanlara ayrılmış binlerce PCR reaksiyonu aynı anda gerçekleştirilir. Bu işlem de tamamlandıktan sonra droplet okuyucu adı verilen cihaz içerisinde okutulan tüp içerisindeki her bir kürecikte

reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği dolayısıyla DNA içerip içermediği seçilen floroforun ışıma yapıp yapmamasına göre sayılır ve Poisson istatistiği yöntemi ile reaksiyonda kullanılan DNA miktarı tahmin edilir ve kantitasyon yapılır (Hindson ve diğ, 2011; Takahashi ve diğ, 2014). Böylelikle yüksek hassasiyet ve doğrulukta sonuçlar alınır. 96 reaksiyonun sonucuna droplet okuyucu cihazında yaklaşık olarak 3 saatte ulaşılır. Daha doğru sonuçlar vermesi, inhibitörlere karşı daha dayanıklı olması ve daha hassas sonuçlar vermesi gibi özellikleri en yakın rakibi olan Real Time-PCR'a göre dPCR'ı avantajlı kılar (Chen ve diğ, 2017).

1.5 Tezin Amacı

Bu çalışmada ddPCR teknolojisi ile olabilecek minimum zenginleştirme aşamasını kombine ederek, gıda kaynaklı en yaygın patojenlerden olan *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* türlerinin tanısı için hassas ve güvenilir bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yaygın bir kullanıma sahip Real Time-PCR sistemi yerine sonuç alma süresini azaltacak ve aynı gün içerisinde sonuç verme süresine sahip bir sistemin geliştirilmesi için minimum gereksinimleri belirlemek üzere *Salmonella spp.* için gıda matrisi olarak çiğ kıyma örnekleri, *Listeria monocytogenes* için süt örnekleri seçilmiştir. Yasal gereksinimlerde de belirtilen 25 g ve 25 ml örnek üzerinden tanımlama yapmak amaçlanmıştır. Nihai hedef bu belirtilen miktardaki örnekler içerisinde bulunan patojeni 1 kopya hassasiyette tespit edebilmektir.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1 Bakteri Türleri ve Büyüme Şartları

Çalışma için kullanılan suşlar ulusal ve uluslararası kuruluşlardan sağlanmış olup Ek A'da sunulmuştur. Elde edilen bütün bakteriler sonradan kullanım için stoklanarak saklanmıştır. Stok oluşturulacak tüm suşlar için sıvı (Nutrient Broth, NB) (RTA, Türkiye) ve agar formunda zengin besiyeri (Nutrient Agar, NA) (RTA, Türkiye) kullanılmıştır. Gliserol stoğu hazırlamak üzere $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ zengin besiyerinde büyütülen bakterilerden tek koloni alınarak 5 ml NB içerisine inoküle edilmiş $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve 150 rpm de orbital karıştırıcı üzerinde bir gece boyunca büyütülerek OD_{600} değeri 0.1 olacak şekilde 20 ml NB besiyerine ekim yapılmış sonrasında 150 rpm'de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de OD_{600} 1.0 değerine kadar büyütülmüştür. Tekrar kullanım için 1 ml bakteri solüsyonu 13000 rpm'de 3 dakika çöktürülmüş ve oluşan bakteri peleti üzerinden supernatant atılarak pelet 1 ml %10 gliserol solüsyonu ile resüspense edilmiş ve -80 derecedeki dolaba kaldırılmıştır.

Stok bakterinin tekrar kullanımı, NB içerisine inokülasyon yapılarak bir gece büyütüldükten sonra bakteri solüsyonundan alınan 100 μl solüsyonun katı zengin besiyerine yayılması ve 37°C de bir gece inkübe edilmesinden sonra tek koloninin sıvı zengin besiyerine alınması ve bir gece büyütülmesi ile olmuştur. DNA izolasyonu 300 μl bakteri süspansiyonundan yapılmıştır.

2.2 Türe Özgü Primer ve Prob Dizayını

Her bir tür tanımlaması için primer ve prob dizilerine karar verebilmek adına literatür araştırması sonucunda belirlenen gen dizileri veritabanlarından (NCBI- National Centre for Biotechnology Information (URL-2) indirilerek ilgili gen hizalama dosyaları oluşturulmuştur (Alignment). Hizalama için European Bioinformatics Institue (URL-2) tarafından yayınlanan Clustral Omega programı kullanılmıştır. Elde edilen hizalama dosyaları içerisinde en korunmuş bölgeler üzerinden primer ve prob bağlanma bölgeleri seçilmeye çalışılmıştır. Kesin bölgeler üzerinden primer ve prob dizilerini belirlemek için Vector NTI Advance 10 yazılımı (*Thermo Fisher Scientific*, United States) kullanılmıştır. Primer ve prob bağlanma bölgelerinin özgüllüğü aynı zamanda NCBI nucleotide BLAST analizi (URL-3) ile kontrol edilmiştir. Türe özgü

tanımlamaları yapacak problemlerin hem dijital PCR hem de Real Time-PCR kullanımı amaçlandığından her iki cihazda ortak olarak ölçüm alınabilecek 6-carboxy-fluorescein (FAM) boyası ile 5' kısmından işaretlenmiştir, problemlerin 3' uçlarına ise soğurucu olarak Black Hole Quencher (BHQ) 1 eklenmiştir. Bütün primer ve problemler Eurofins Genomics (Almanya) firmasından sipariş edilmiştir.

2.2.1 *Salmonella spp.*'ye özgü primer ve prob dizaynı

Literatür araştırması sonucunda *Salmonella* tanısı için kullanılabilecek *invA* ve *bipA* gen bölgeleri üzerine odaklanılmıştır. *invA* gen bölgesi *Salmonella* türleri arasında oldukça korunmuş olup türe özgü bir gen olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle spesifik bir tanımlama için PCR çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Shanmugasamy ve diğ, 2011; González-Escalona ve diğ, 2012). *Inv* geninin (operonunun) ilk lokusu olan *invA* bölgesi memeli intestinal hücrelerini enfekte edebilmek için gerekli bir protein kodlamaktadır (Galán ve Curtiss 3rd, 1991; Galán ve diğ, 1992). *invA* gen bölgesi ile yapılan bazı çalışmalarda spesifik olmayan amplifikasyonlarla birlikte *S. saintpaul* gibi *Salmonella spp.* türlerini tanıyamama gibi sorunlar bildirilmiştir (Calvo ve diğ, 2008). Bu nedenle çalışmamıza alternatif bir bölge üzerinden de dizayn yapılmasına karar verilmiştir. Dizayn bölgesi olarak *bipA* (BPI ile indüklenebilir protein A) geni seçilmiştir. Bu gen bakteriler arasında büyük oranda korunmuş olup guanosine triphosphate (GTP) binding elongation family proteinleri grubuna dahil, hücre içinde birçok fonksiyonu düzenleyen ribozomal bir proteini kodlamaktadır (Calvo ve diğ, 2008; Kumar ve diğ, 2015). Çalışmada kullanılan primer ve prob dizileri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 : *Salmonella invA* ve *bipA* gen bölgeleri için dizayn edilmiş primer ve prob dizileri.

Primer İsmi	Dizi	Tm Değeri (Erime Sıcaklığı)
<i>invA</i> -İleri Primer	TCTCTGGATGGTATGCCCCG	63.1°C
<i>invA</i> -Geri Primer	TAAACTTCATCGCACCGTCA	61.6°C
<i>invA</i> -Prob-FAM	FAM-CGGTATTATTGATGCGGATGC	64.6°C
<i>bipA</i> -İleri Primer	CTGACCAACATGCGTGC	57.9°C
<i>bipA</i> -Geri Primer	ACTTCTACCAGTTCGTCGTC	55.6°C
<i>bipA</i> -Prob-FAM	FAM-AATTAAAATGAGCCTTGAGCAAGCG-BHQ1	70.7°C

2.2.2 *Listeria monocytogenes*'e özgü primer ve prob dizaynı

Literatür araştırması sonucunda *Salmonella* tanısı için kullanılabilecek *invA* ve *bipA* gen bölgeleri üzerine odaklanılmıştır. *Listeria monocytogenes*'i diğer *Listeria spp.* türlerinden ayırmak için yapılan nükleik asit tabanlı testlerde özellikle PCR'a dayalı yöntemlerde 16 S ribozomal RNA (rRNA), 23 S rRNA genleri ve 16 S-23 S rRNA "intergenic spacer" bölgeleri arasındaki dizi farklılıklarından faydalanılmıştır. Diğer yandan birçok virülans geni de PCR çalışmalarında *Listeria monocytogenes* tanısı için kullanılmıştır. Listeriolysin O (LLO) kodlayan *hly* (*hlyA*) geni, p60 adı verilen "invasion associated" proteini kodlayan *iap* geni, ActA yüzey proteininin sentezinden sorumlu *actA* geni, *Listeria monocytogenes* antijen sentezi yapan *Dth-18* adıyla da bilinen *lmaA* geni, internalin A sentezinden sorumlu *inlA* geni, internalin B sentezinden sorumlu *inlB* geni, Pozitif regulatory factorA sentezinden sorumlu *prfA* geni, amino peptidase C sentezinden sorumlu *pepC*, fibronectin-bindingprotein sentezi yapan *fbp* ve phospholipase C protein sentezi yapan *plcB* geni üzerinde çalışmalar vardır. Birçok klinik izolatta listeriolysin O nedeniyle hemolitik aktivite görüldüğünden listeriolysin O sentezi virülanslık için önemlidir. Bu nedenle, bu gen *Listeria monocytogenes* tanısı için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Law ve diğ, 2015; Almeida ve Almeida, 2000; Liu, 2006; Hein ve diğ, 2001). Çalışmalar içerisinde *iap*, *inlA*, ve *hly* genleri için alignment çalışmaları yapılmış olup primer (ileri ve geri) ve prob dizaynı için *inlA* ve *iap* genleri uygun bulunmuştur. İki gen için yapılacak çalışmalarda uygun bölge üzerinden çalışmalara devam edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer prob dizileri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 : *Listeria monocytogenes* için *inlA* ve *iap* gen bölgeleri için dizayn edilmiş primer ve prob dizileri.

Primer İsmi	Dizi	Tm Değeri (Erime Sıcaklığı)
<i>inlA</i> -İleri Primer	AGTTTCATGTGGACGGCAAAG	64.1°C
<i>inlA</i> -Geri Primer	GTCGGCATTATCCGTACTGA	63.5°C
<i>inlA</i> -Prob-FAM	FAM-ATTGACTGAACCAGCTAAGCCYGT-BHQ1	67.2°C
<i>iap</i> -İleri Primer	TTTGTCAGTTAAGTATTTACCGTT	57.3°C
<i>iap</i> -Geri Primer	CTGTTAGCGCAACTTGGYTAA	61.5°C
<i>iap</i> -Prob-FAM	FAM-TGATKGACGTAATAATRCTGTTATCAACA-BHQ1	65.9°C

2.3 İnternal Kontrolün Oluşturulması

Çalışmada kullanılacak patojenlerin tespitinde DNA izolasyon aşamasını ve PCR inhibisyonunu (baskılanmasını) kontrol etmek üzere çalışmalara internal kontrolün dahil edilmesi planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Hepatitis C Virüs'ü 5' untranslated region (UTR) bölgesine ait 410 bp uzunluğundaki bölge seçilerek *in vitro* mutagenез yöntemi (Ho ve diğ, 1989) ile prob bağlanma bölgesi insan Faktör 5 genine ait bir dizi ile değiştirilerek doğada olmayan sentetik bir dizi elde edilmiş ve bu dizinin pGEMT-Easy (Promega, Amerika) vektörü içerisine klonlanmıştır.

İnternal kontrol dizisinin oluşturulmasında kullanılan ileri ve geri dış primer dizileri ve prob bağlanma bölgesini değiştirmek için kullanılan primer dizileri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 : İnternal kontrol oluşturulması için *in vitro* mutagenез yönteminde kullanılan primer çiftleri.

Primer	Dizi	Tm Değeri
HCV-IC-İleri Primer	*5'-ATCCCTGGACAGGCAAGGCTTGCGAGTGCCCCGGGA-3'	71.4°C
HCV-IC-Geri Primer	*5'-CCTTGCCTGTCCAGGGATTTTCGCGACCCAACACTACTCG-3'	68.8°C
IVT-İleri Primer	5'- ACACTCCACCATGAATCACTCC-3'	62.7°C
IVT-Geri Primer	5'- AACTCCACCAACGATCTGAC-3'	58.6°C

* İtalik harfler HCV dizisine aittir. Komplementer FV dizileri kalın harfler ile gösterilmiştir.

Primerler Eurofins Genomics (Almanya) firmasından temin edilerek iki ayrı PCR reaksiyonu aşağıdaki miktar ve şartlarda optimize edilmiştir (Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5).

Çizelge 2.4 : *In vitro* mutagenез için PCR 1.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
Pfu DNA Polymerase 10X Buffer + MgSO4	1x
dNTP Miks	0.2 µM
IVT-İleri Primer	1 µM
HCV-IC-Geri primer	1 µM
Pfu DNA Polimeraz	2 U
cDNA (HCV)	0.5 µg
dH ₂ O	25 mikrolitreye hacmi tamamlayacak şekilde
Toplam Hacim	25.0 µl

PCR reaksiyonlarında Pfu DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır (Promega, Amerika). Reaksiyonlar buz üzerinde gerçekleştirilmiş olup termal döngü için Biorad DNA Engine (Amerika) cihazı kullanılmıştır. HCV RNA'sı reaksiyonlarda kullanılmadan

önce komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmiştir. cDNA'ya çevirme işlemi “ReverseAid First DNA Synthesis Kit” (Thermo Fisher Scientific, Amerika) talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.5 : *In vitro* mutagenез için PCR 2.

Bileşen	Reaksiyon içindeki son konsantrasyon
Pfu DNA Polymerase 10X Buffer + MgSO ₄	1x
dNTP Miks	0.2 µM
HCV-IC-İleri Primer	1.0 µM
IVT-Geri Primer	1.0 µM
Pfu DNA Polimeraz	2.0 U
cDNA (HCV)	0.5 µg
dH ₂ O	25 mikrolitre hacmi tamamlayacak şekilde
Toplam Hacim	25.0 µl

Her iki reaksiyon için Çizelge 2.6'da belirtilen termal protokol uygulanmıştır.

Çizelge 2.6 : PCR 1 ve PCR 2 için termal protokol şartları.

Aşama	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
1 İlk Denatürasyon	95°C	02:00 dk.	1
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	
2 Primer Bağlanma	58°C	01:00 dk.	50
Sentez	72°C	00:45 dk.	
3 Zincir Uzatma	72°C	07:00 dk.	1

Her iki reaksiyondan elde edilen PCR ürünleri agarose jel ile kontrol edildikten sonra elde edilen ürünler üçüncü bir PCR reaksiyonu ile iki PCR ürününü birleştirme reaksiyonu olarak kullanılmıştır. Bu reaksiyon için Pfu DNA Polimeraz enzimi kullanılmıştır (Promega, Amerika). Kullanılan miktarlar (Çizelge 2.7) ve termal protokol (Çizelge 2.8) aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 2.7 : *In vitro* mutagenез için iki PCR (PCR1 ve PCR2) ürününü birleştirme reaksiyonu.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
Pfu DNA Polymerase 10X Buffer + MgSO ₄	1x
dNTP Miks	0.3 µM
PCR 1 Ürünü	1.0 µg
PCR 2 Ürünü	1.0 µg
Pfu DNA Polimeraz	2.5 U
IVT-İleri Primer	2.0 µM
IVT-Geri Primer	2.0 µM
dH ₂ O	50 mikrolitre hacmi tamamlanacak şekilde
Toplam Hacim	50.0 µl

Çizelge 2.8 : PCR 1 ve PCR 2 birleştirme reaksiyonu için termal protokol.

	Aşama	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
1	İlk Denatürasyon	95°C	02:00 dk.	1
	Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	
2	Primer Bağlanma	58°C	01:00 dk.	50
	Sentez	72°C	01:30 dk.	
3	Zincir Uzatma	72°C	10:00 dk.	1

PCR reaksiyonu agaroz jel (Gel Doc, Biorad, USA) üzerinde kontrol edildikten sonra Sanger dizileme yöntemi ile değiştirilen bölge kontrol edilerek doğrulama yapıldıktan sonra pGEMT-Easy vektörü içerisine TA klonlama yapılmak üzere hazırlanmıştır (Ho ve diğ, 1989).

2.3.1 İnternal kontrolün plazmid içine entegrasyonu

İnvitro mutagenез için doğrulanmış PCR ürününü TA klonlama için hazır hale getirmek üzere taze PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Aşağıda PCR miktarları (Çizelge 2.9) ve termal döngü (Çizelge 2.10) şartları verilmiştir. PCR reaksiyonu için Taq Polymerase enzimi kullanılmıştır (Thermofisher Scientific, Amerika).

Çizelge 2.9 : TA klonlama yöntemi için PCR ürününün uygun hale getirilmesi.

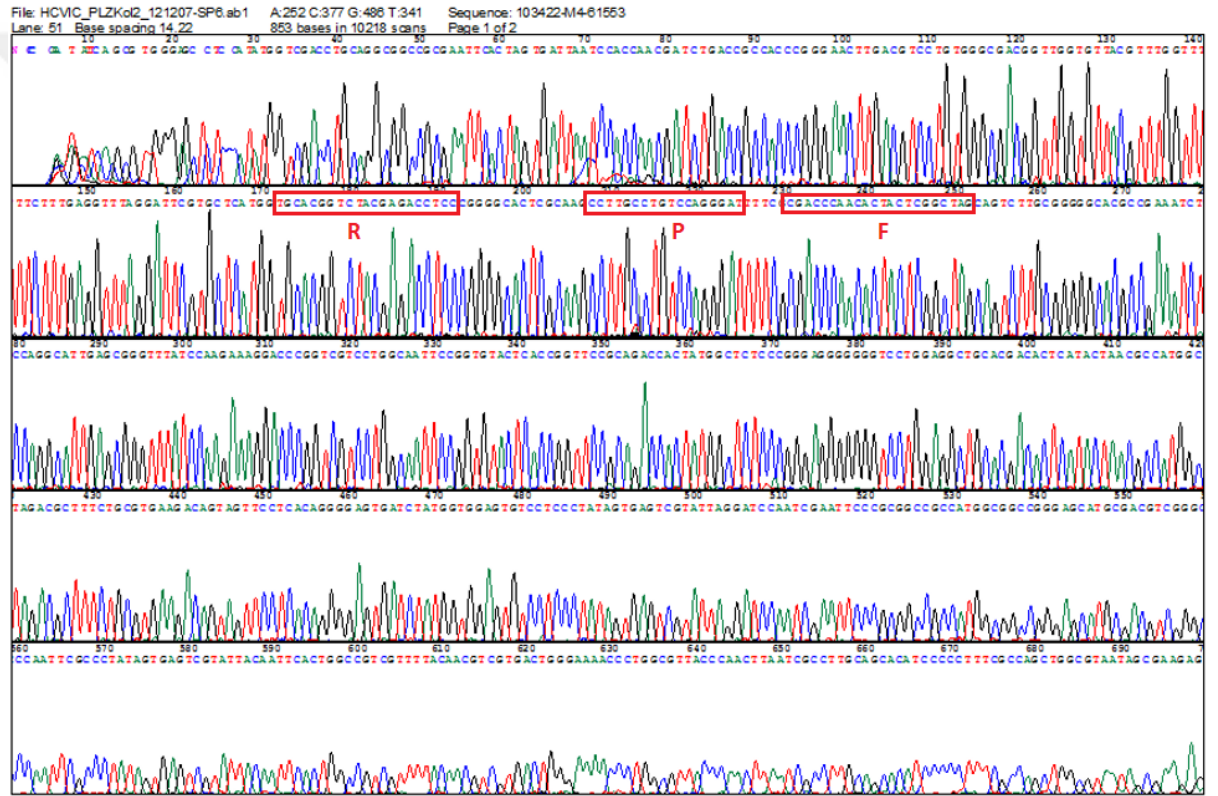
Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
10x Taq Buffer (Thermofisher Scientific, Amerika)	1x
MgCl ₂ (Thermofisher Scientific, Amerika)	2.5 mM
dNTP Miks (Promega, Amerika)	0.2 µM
Taq DNA Polymerase (Thermofisher Scientific, Amerika)	0.8 U
IVT-İleri Primer	2.0 µM
IVT-Geri Primer	2.0 µM
İnvitro Mutagenез PCR Ürünü	1.0 µl
dH ₂ O	25 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	25.0 µl

Çizelge 2.10 : TA klonlama yöntemi için hazırlanan PCR reaksiyonu için termal döngü.

	Aşama	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
1	İlk Denatürasyon	95°C	02:00 dk.	1
	Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	
2	Primer Bağlanma	58°C	01:00 dk.	50
	Sentez	72°C	00:45 dk.	
3	Zincir Uzatma	72°C	07:00 dk.	1

PCR reaksiyonu Biorad DNA Engine cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR ürününün pGEMT-Easy vektörüne ligasyonu (entegrasyonu) üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ligasyon işlemi tamamlandıktan sonra vektör

JM109 kompetan hücreleri (Promega, Amerika) içerisine üretici firmanın talimatları doğrultusunda transforme edilmiştir. Transormasyondan sonra seçilen hücrelerden PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Amerika) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmidin içerdiği diziyi doğrulamak adına T7 ve SP6 genel primerleri kullanılarak Sanger dizileme yöntemi ile izolatlar dizilenmiştir (Macrogen, Kore) (Şekil 2.1) ve gerektiği takdirde tekrar izole edilmek üzere plazmidin izole edildiği koloni %10 gliserol içerisinde -80 °C stok olarak saklanmıştır. Şekil 2.1’de gösterim SP6 primeri ile yapılan dizileme sonucudur. Burada, F: ileri primer bağlanma bölgesini, P: prob bağlanma bölgesini ve R: geri primer bağlanma bölgesini göstermektedir.

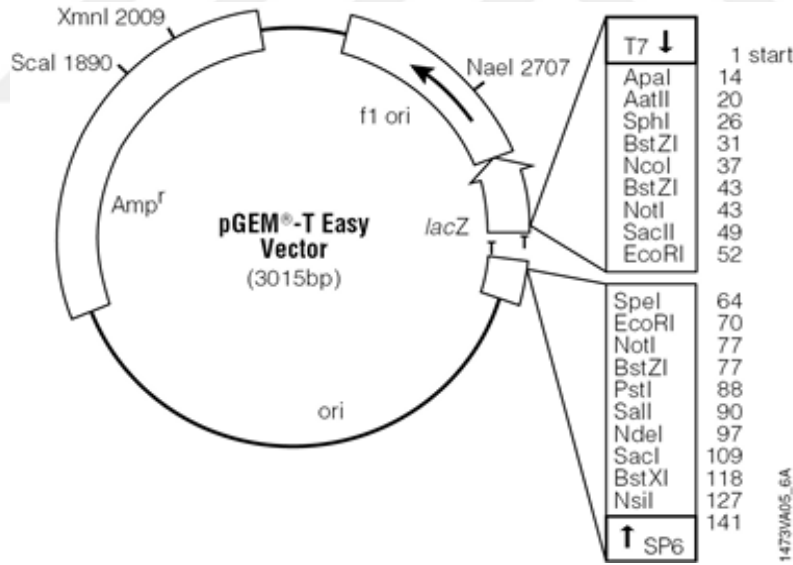


Şekil 2.1 : pGEMT-Easy vektörü içerisine entegre edilen *in vitro* mutagenез ürünü Sanger dizileme sonucu.

İnternal kontrol probunun hem Real Time-PCR hem de ddPCR çalışmalarında ortak kullanıma uygun olması açısından 5’ ucundan hexachloro-fluoresceine (HEX) ile işaretlenmiştir ve 3’ ucuna quencher olarak BHQ 2 eklenmiştir. İnternal kontrol prob dizisi HEX-CCTTGCCTGTCCAGGGATC-BHQ2 şeklinde son halini almıştır. İnternal kontrol ileri primeri dizisi CTAGCCGAGTAGAGTTGGGTCG ve İnternal kontrol geri primeri TGCACGGTCTACGAGACCTCC şeklindedir.

2.3.2 İnternal kontrolün kullanıma hazır hale getirilmesi

pGEMT-Easy vektörü içerisinde entegre halde bulunan internal kontrol bölgesi korunacak şekilde vektörü daire şeklinden düz şekle getirmek için restriksiyon enzimi *XmnI* ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzim kesim yeri vektör üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.2). Şekil 2.2’de Plazmid üzerinde *XmnI* restriksiyon enzimi (Promega, Amerika) ile kesim bölgesi gösterilmiştir. Vektör üzerinde MCS (Multi Cloning Site) bölgesi içine entegre edilen internal kontrol dizisi *XmnI* restriksiyon enzimi ile yapılan tekli kesimden etkilenmeden plazmidin düz bir yapıya getirilmesi ile düz yapının yaklaşık orta kısımlarında konumlanmıştır. Reaksiyonlarda, kesim işlemi yapılarak belli oranda seyreltilmiş internal kontrol kullanılmıştır. Kullanılacak miktarı belirlemek için 10 katlık farklarla dilüsyonlar hazırlanmış ve 1000-100-10 bakteri sayısına sahip örneklerle birlikte farklı internal kontrol dilüsyonları 5 µl kullanılarak DNA izolasyonu aşamasında eklenmiş ve Real Time-PCR çalışmasında uygun 32-35 Ct değerine denk gelen dilüsyon internal kontrol olarak kullanılmıştır. Kullanılan dilüsyon değerinin ddPCR için de uygun olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.2 : İnternal kontrol dizisinin entegre edildiği vektörün (pGem-T Easy, Promega) genetik haritası.

2.4 Gıda Örneklerinin Bakteri Örnekleri ile Kontaminasyonu

2.4.1 *Salmonella spp.* ile gıda örneklerinin kontaminasyonu

Çiğ kıyma örnekleri *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu ile kontamine edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ zengin katı besiyerinde büyütülen bakterilerden tek koloni alınarak 5 ml NB içerisine inoküle edilmiş $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve 150 rpm de orbital karıştırıcı üzerinde bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyütülen bakteriden OD_{600} 0.1 değerini alacak şekilde 20 ml NB besiyerine ekim yapılarak 150 rpm'de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de OD_{600} of 1.0 değerini alana kadar büyütülmüş ve bu bakterilerden $1/10^1$ - $1/10^{10}$ arası 10 katlık farklarla NB içerisinde seri dilüsyon örnekleri hazırlanmıştır. Çalışmalarımızda genellikle $1/10^7$ - $1/10^9$ arasındaki dilüsyonlar çiğ kıyma örneğini kontamine etmek için kullanılmıştır. Bu aralıktaki dilüsyonlar potansiyel olarak deneyde kullanılabilecek bakteri sayılarını vermektedir. En muhtemel sayı yöntemi ile bakteri sayısını belirlemek üzere her bir dilüsyon örneğinden 3 tekrar olacak şekilde 0.1 ml bakteri zengin katı besiyerine ekilerek ertesi gün sayım yapılmıştır fakat sayım sonucunu beklemeden taze olarak seri dilüsyon yapılmış bakteri örnekleri ile kontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 25 g çiğ kıyma ve 25 ml süt örneği için 1ml bakteri dilüsyonu kullanılarak kontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontamine edilen örnekler homojenize edilerek steril yarı filtreli stocmaher torbası (Interscience, France) içerisindeki 100 ml NB ile karıştırılmıştır. Daha sonra belirlenen saatte örnekleme için 5 ml örnek alınarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon işleminden sonra $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ de kontamine örnekler etiketlenerek gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemine kontamine edilmemiş negatif örnek de eklenmiştir. Negatif örnek ayrıca kültürlenme işlemi veya Real Time-PCR ile de doğrulanmıştır.

2.4.2 *Listeria monocytogenes* ile gıda örneklerinin kontaminasyonu

UHT işlemi görmüş süt örnekleri *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşu ile kontamine edilmiş ve deneyler gerçekleştirilmiştir. $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ mueller hinton W/ %5 sheep blood katı besiyerinde (MHA) (RTA, Türkiye) büyütülen bakterilerden tek koloni alınarak 5 ml mueller hinton W/ %5 sheep blood sıvı besiyeri (MHB) içerisine inoküle edilmiş $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve 150 rpm de orbital karıştırıcı üzerinde bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyütülen bakteriden OD_{600} 0.1 değerini alacak şekilde 20 ml MHB besiyerine ekim yapılarak 150 rpm'de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de OD_{600} 1.0 değerini alana kadar

büyütülmüş ve bu bakterilerden $1/10^1$ - $1/10^{10}$ arası 10 katlık farklarla MHB içerisinde seri dilüsyon örnekleri hazırlanmıştır. Çalışmalarımızda genellikle $1/10^6$ - $1/10^9$ arasındaki dilüsyonlar süt örneğini kontamine etmek için kullanılmıştır. Bu aralıktaki dilüsyonlar potansiyel olarak deneyde kullanılabilecek bakteri sayılarını vermektedir. En muhtemel sayı yöntemi ile bakteri sayısını belirlemek üzere her bir dilüsyon örneğinden 3 tekrar olacak şekilde 0.1 ml bakteri MHA katı besiyerine ekilerek ertesi gün sayım yapılmıştır fakat sayım sonucunu beklemeden taze olarak seri dilüsyon yapılmış bakteri örnekleri ile kontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyonda 25 ml süt örneği için 1 ml bakteri dilüsyonu kullanılarak steril yarı filtreli stocmaher torbası (Interscience, France) içerisindeki 100 ml MHB ile karıştırılmıştır. Daha sonra belirlenen inkübasyon süresi olan 4. ve 5. saatlerde 5 ml örnek alınarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon işleminden sonra 37 ± 2 °C de kontamine örnekler etiketlenerek gece boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon işlemine kontamine edilmemiş negatif örnek de eklenmiştir. Negatif örnek ayrıca kültürleme işlemi veya Real Time-PCR ile de doğrulanmıştır.

2.5 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları İontek Fluorion i24 otomatik izolasyon cihazı ile i24 bacterial isolation kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Saf bakteri kültürlerinden oluşturulan seri dilüsyonlardan DNA izolasyonu için 1ml kullanılmıştır. 13000 rpm de 3 dakika santrifüj edilen bakteri dilüsyonlarından supernatant atılarak çöktürülen bakteri sedimenti 300 µl 1x PBS solüsyonunda (Sigma-Aldrich, Amerika) çözülmüştür. Çözelti üzerine 5 µl sulandırılmış internal kontrol eklenmiştir.

Yapay olarak kontamine edilmiş gıda örneklerinden DNA izolasyonunu gerçekleştirmek için 5 ml örnek kullanılmıştır. Stocmaher torbasında inkübe edilen örneklerden steril ortamda dereceli tek kullanımlık pipetle alınan 5 ml örnek 50 ml steril falkon tüpleri içerisine aktararak 5000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant atılmış ve bakteri sedimenti 300 µl 1x PBS solüsyonunda çözülüp üzerine 5 µl internal kontrol eklenerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Otomatik olarak 50 µl dH₂O içerisine alınan izole DNA örneklerinden tüm DNA'yı kullanabilmek için tüplere liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır.

Kapsama ve dışlama deneylerinde, bakteri kültürlerinden izolasyon için aynı izolasyon protokolü kullanılmıştır. Bu deneyler için izole edilen DNA'lar spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV-1601, Japonya) ölçülerek en az 30 ng/μl DNA içerdiği kontrol edilmiştir.

2.6 Real Time-PCR

Her iki patojen için Real Time-PCR optimizasyonu Quantitect Probe PCR Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aşağıda her bir patojen için optimize miktarlar belirtilmiş olup bütün tanılar için Çizelge 2.15'te belirtilen ortak termal protokol kullanılmıştır.

Salmonella tanısı için 2 gen bölgesi üzerinden Real Time-PCR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Salmonella bipA* ve *invA* gen bölgesi amplifikasyonu için yapılan optimize miktarlar Çizelge 2.11 ve Çizelge 2.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.11 : *Salmonella bipA* gen bölgesi için optimize edilmiş Real Time-PCR bileşen miktarları.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
Qaiagen Quantitect Probe PCR Kit	1x
<i>bipA</i> -İleri Primer	0.08 μM
<i>bipA</i> -Geri Primer	0.08 μM
<i>bipA</i> -Prob	0.05 μM
İnternal Kontrol-İleri Primer	1.2 μM
İnternal Kontrol-Geri Primer	1.2 μM
İnternal Kontrol-Prob-HEX	0.1 μM
DNA	1.0 μl
dH ₂ O	25 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	25.0 μl

Çizelge 2.12 : *Salmonella invA* gen bölgesi için optimize edilmiş Real Time-PCR bileşen miktarları.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
Qaiagen Quantitect Probe PCR Kit	1x
<i>invA</i> -İleri Primer	0.2 μM
<i>invA</i> -Geri Primer	0.2 μM
<i>invA</i> -Prob-FAM	0.1 μM
İnternal Kontrol-İleri Primer	1.2 μM
İnternal Kontrol-Geri Primer	1.2 μM
İnternal Kontrol-Prob-HEX	0.1 μM
DNA	1.0 μl
dH ₂ O	25 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	25.0 μl

Listeria monocytogenes tanısı için 2 gen bölgesi üzerinden Real Time-PCR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Listeria monocytogenes inlA* ve *iap* gen bölgesi

amplifikasyonu için yapılan optimize miktarlar Çizelge 2.13 ve Çizelge 2.14'te verilmiştir. *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella spp.* tanısında kullanılan termal döngü protokolü Çizelge 2.15'de yer almaktadır.

Çizelge 2.13 : *Listeria monocytogenes inlA* gen bölgesi için optimize Real Time-PCR bileşen miktarları.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
Qiagen Quantitect Probe PCR Kit	1x
<i>inlA</i> -İleri Primer	0.4 µM
<i>inlA</i> - Geri Primer	0.4 µM
<i>inlA</i> -Prob-FAM	0.05 µM
İnternal Kontrol-İleri Primer	0.4 µM
İnternal Kontrol-Geri Primer	0.4 µM
İnternal Kontrol-Prob-HEX	0.8 µM
DNA	1.0 µl
dH ₂ O	25 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	25.0 µl

Çizelge 2.14 : *Listeria monocytogenes iap* gen bölgesi için optimize Real Time-PCR bileşen miktarları.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
Qiagen Quantitect Probe PCR Kit	1x
<i>iap</i> -İleri Primer	0.4 µM
<i>iap</i> -Geri Primer	0.4 µM
<i>iap</i> -Prob-FAM	0.05 µM
İnternal Kontrol-İleri Primer	0.4 µM
İnternal Kontrol-Geri Primer	0.4 µM
İnternal Kontrol-Prob-HEX	0.8 µM
DNA	1.0 µl
dH ₂ O	25 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	25.0 µl

Çizelge 2.15 : Real Time-PCR reaksiyonları için termal döngü.

Aşama	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
1 Enzim Aktivasyonu	95°C	15:00 dk.	1
Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	
2 Primer Bağlanma	58°C	00:45 dk.	50

Primer ve probler Eurofins Genomics (Almanya) firmasından temin edilerek bütün Real Time-PCR reaksiyonları Fluorion Detection System (İontek, Türkiye) adı verilen Real Time-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.7 Droplet Dijital PCR

Dijital PCR çalışmaları QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad Laboratories, Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ddPCR reaksiyonunda bileşen miktarları *Salmonella spp.* ve *Listeria monocytogenes* tanısı için sırasıyla Çizelge 2.16 ve Çizelge

2.17’de gösterilmiştir. QX200 droplet generator (Biorad laboratories, Amerika) cihazı droplet üretmek için kullanılmıştır. ddPCR için hazırlanan karışım (20 µl) ve 70 µl QX200 droplet generator oil for probes (Biorad laboratories, Amerika) 8 kuyucuklu droplet kartuşunun kuyucuklarına üretici firmanın talimatları doğrultusunda pipetlenerek dropletler oluşturulmuştur. Elde edilen 40 µl droplet 96 kuyucuklu PCR plakasına (Eppendorf, Almanya) transfer edilerek şeffaf heat-seal ile ilgili cihazda (PX1 PCR Plate Sealer) (BioRad Laboratories, Amerika) kapatılarak DNA Engine thermal cycler (Biorad laboratories, Amerika) cihazına aktarılarak Çizelge 2.18’de belirtilen termal protokol uygulanmıştır.

Çizelge 2.16 : *Salmonella spp. bipA* gen bölgesi için optimize ddPCR bileşenleri.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
2x ddPCR Supemix for Probes	1x
<i>bipA</i> -İleri Primer	1.0 µM
<i>bipA</i> -Geri Primer	1.0 µM
<i>bipA</i> -Probe-FAM	0.25 µM
İnternal Kontrol-İleri Primer	1.2 µM
İnternal Kontrol-Geri Primer	1.2 µM
İnternal Kontrol-Prob-HEX	0.125 µM
DNA	5.0 µl
dH ₂ O	20 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	20.0 µl

Çizelge 2.17 : *Listeria monocytogenes* için optimize ddPCR bileşenleri.

Bileşen	Reaksiyon İçindeki Son Konsantrasyon
2x ddPCR Supemix for Probes	1x
<i>inlA</i> -İleri Primer	0.5 µM
<i>inlA</i> -Geri Primer	0.5 µM
<i>inlA</i> -Probe-FAM	0.0625 µM
İnternal Kontrol-İleri Primer	0.5 µM
İnternal Kontrol-Geri Primer	0.5 µM
İnternal Kontrol-Prob-HEX	0.05 µM
DNA	5.0 µl
dH ₂ O	20 mikrolitreye tamamlanacak miktarda
Toplam Hacim	20.0 µl

Çizelge 2.18 : ddPCR reaksiyonları için termal döngü protokolü.

Aşama	Derece	Zaman	Döngü Sayısı
1 Enzim Aktivasyonu	95°C	10:00 dk.	1
2 Denatürasyon	95°C	00:30 dk.	
2 Primer Bağlanma	58°C	01:00 dk.	50
3 Son İnkübasyon	98°C	10:00 dk.	1

Salmonella için ddPCR çalışmalarına *bipA* geni üzerinden devam edilirken, *Listeria monocytogenes* için *inlA* geni üzerinden devam edilmiştir.

Reaksiyon bittikten sonra droplet reader (Biorad Laboratories, Amerika) cihazına yerleştirilen örneklerden okumalar alınmıştır. Cihazla temin edilen Quantasoft 1.3.2.0 yazılımı ile sonuçlar analiz edilmiştir. ddPCR sonuç analizlerinde 20 µl'lik PCR için orta ve düşük sayıda pozitif droplete sahip fakat toplam droplet sayısı 10000 den az örnekler için ilgili sonuç değerlendirmeye alınmamıştır. Buna ek olarak pozitif droplet sayısı en az iki olarak bulunan örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Dropletlerin yüksek sayıda pozitif olduğu durumlarda toplam droplet sayısı 8000 ve yukarısı ise ilgili sonuç değerlendirmeye alınmıştır (Dreo ve diğ, 2014; Pecoraro ve diğ, 2019; Rački ve diğ, 2014; Levin, 2015).

2.8 Tasarlanan Deneyler

2.8.1 Özgüllük deneyleri

Optimize edilen Real Time-PCR şartlarında kullanılan her bir türe özgü primer çiftinin ve problemlerin özgüllüğünü (spesifitesini) belirlemek için dizayn aşamasında bilgisayar ortamında BLAST Analizi (URL-3) yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda istenilen patojene en yüksek özgüllük sağlanmış olup hedeflenmeyen *Salmonella spp.* dışı türler ile de herhangi bir benzerlik bulunmamıştır. Deneysel olarak çapraz reaktivite testi için tür içi ve tür dışı patojenlerden elde edilen DNA'lar ile Real Time-PCR aşamasında elde edilen amplifikasyon eğrileri değerlendirilmiş olup her bir primer çifti ve prob için çalışmalar yapılmıştır. ddPCR ve Real Time-PCR çalışmalarının paralel olarak değerlendirilmesi amaçlandığından her iki çalışma için aynı primer çifti ve prob kullanılacak şekilde deneyler planlanmıştır. Real Time-PCR çalışmaları ve ddPCR çalışmalarında aynı primer ve prob kimyası ile (Taqman) tanıma yapıldığından deney özgüllüğü Real Time-PCR çalışmaları ile sınırlandırılmıştır. ddPCR ile bu çalışmaların tekrarına gerek duyulmamıştır.

2.8.2 Doğrusallık deneyleri

Her bir patojen saptanmasında doğrusallık aralığını belirlemek üzere direk DNA izolatından elde edilen 10 katlık farklarla hazırlanan seri dilüsyonlar ve 10 katlık farklarla seri olarak dilüe edilmiş bakteri kültüründen elde edilen DNA izolatları kullanılmıştır. Her bir örnek iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Bu iki doğrusallık çalışması diğer yandan izolasyon aşamasında meydana gelebilecek DNA kaybı hakkında da bilgi vermektedir. Dinamik aralıktaki doğrusallığı belirlemek için tekrarlı

Çalışmaların ortalama Ct değeri üzerinden belirlilik katsayısı (R^2) hem Real Time-PCR hem de ddPCR çalışmaları için hesaplanmıştır.

2.8.3 Hassasiyet deneyleri

Çalışmada en nihayi hedef 25 g örnek için olabilecek en iyi hassasiyet seviyesine ulaşmak olduğundan amaca uygun şekilde seri olarak dilüe edilmiş bakteri örnekleri ile belirlenen gıdalar yapay olarak kontamine edilmiştir. Model gıda olarak *Salmonella spp.* için çiğ kıyma, *Listeria monocytogenes* için süt örnekleri seçilmiştir. Kontamine edilen örnekler kısa bir ön zenginleştirme işlemine tabi tutularak hem Real Time-PCR hem de ddPCR için hassasiyet çalışmaları yapılmıştır. Doğrusallık deneylerinden elde edilen n bilgilere dayanılarak çalışma içerisine kısa bir ön zenginleştirme aşamasının eklenmesi uygun bulunmuştur.

Kısa n zenginleştirme aşamasının şartlarını belirlemek için en uygun olabilecek ve aynı gün içinde sonuç almayı etkilemeyecek bir sürenin belirlenmesi amacıyla deneyler planlanmıştır. Bu aşama için yapay olarak kontamine edilmiş örneklerden belli zaman periyotlarında örnek alınarak Real Time-PCR ve ddPCR çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar karşılaştırılarak en uygun n zenginleştirme süresi saptanmaya çalışılmıştır. Hassasiyet seviyesinin hesaplaması için hem Real Time-PCR çalışmalarında hem de ddPCR çalışmalarında probit analizi kullanılmıştır.

2.8.4 Dayanıklılık ve Tekrarlanabilirlik Deneyleri

Salmonella spp. Real Time-PCR çalışmalarında dayanıklılık ve tekrarlanabilirlik deneyleri için 605 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyon ile kontamine edilmiş çiğ kıyma örnekleri kullanılmıştır. 3 saat ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş bu örneklerden DNA izolatu elde edilerek tekrarlanabilirlik için üç farklı zamanda hazırlanmış primer prob dilüsyonu ile 4 tekrarlı çalışma, 3 farklı operatör tarafından 5 farklı günde yapılmıştır. alışmalar arası ve çalışma içi tekrarlanabilirlik, değişim katsayısının (coefficient of variant, CV) hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Benzer deney üç tekrarlı olarak 6050 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyon ile ddPCR çalışması için yapılmış ve CV verileri değerlendirilmiştir.

Listeria monocytogenes Real Time-PCR çalışmalarında dayanıklılık ve tekrarlanabilirlik deneyleri için 156 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyon ile kontamine edilmiş süt örnekleri kullanılmıştır. 4 saat ön zenginleştirme işlemine tabi

tutulmuş bu örneklerden DNA izolatu elde edilerek tekrarlanabilirlik için u farklı zamanda hazırlanmış primer prob dilüsyonu ile 4 tekrarlı çalışma, 3 farklı operatör tarafından 5 farklı günde yapılmıştır. alışmalar arası ve çalışma içi tekrarlanabilirlik CV hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Benzer deney u tekrarlı olarak 1500 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyon ile ddPCR çalışması için yapılmış ve CV verileri değerlendirilmiştir.

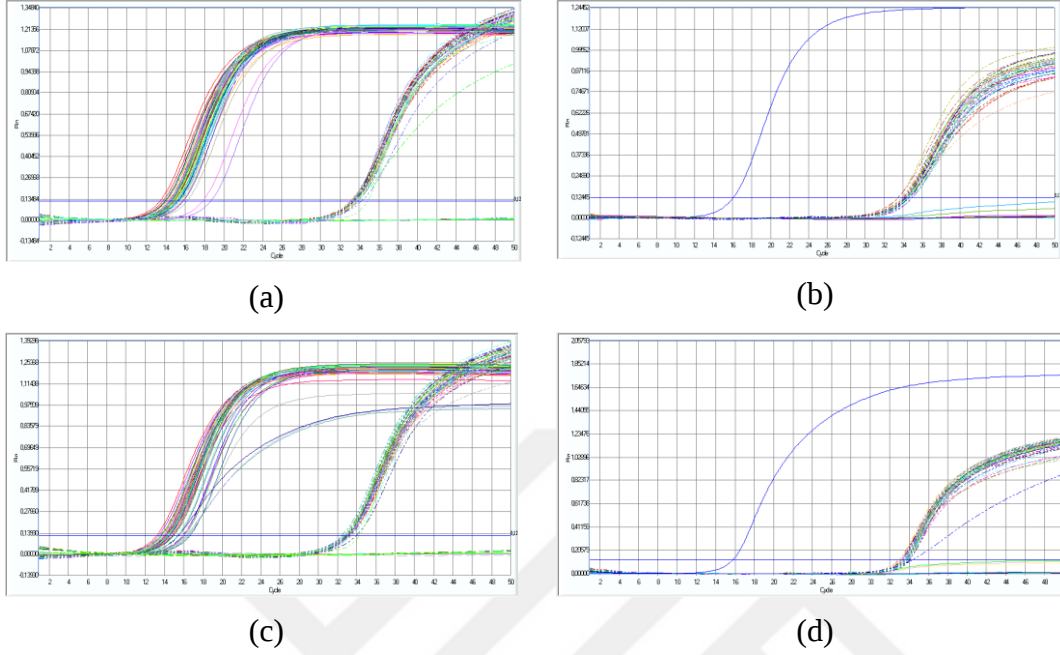


3. SONUÇLAR

3.1 *Salmonella spp.* için Primer-Prob Özgüllüğü

Dizayn aşamasında “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) analizi ile *in silico* olarak yapılan analizlerde çapraz reaktivite yaratabilecek herhangi bir homoloji ile karşılaşılmamıştır. Deneysel olarak özgüllüğü göstermek üzere *Salmonella spp.*’ye ait 86 farklı serotip ile birlikte 74 adet *Salmonella spp.* grubuna ait olmayan farklı bakteri türleri kullanılmıştır. *Salmonella* için *bipA* ve *invA* gen bölgeleri için dizayn edilen her primer çifti için deneyler gerçekleştirilmiş olup *Salmonella spp.* suşlarının hepsinde artış eğrisi elde edilirken *Salmonella spp.* dışı suşlarda herhangi bir artış görülmemiştir. Çalışmaya pozitif ve negatif kontroller eklenmiş olup, her örnek için internal kontrol artışları ile izolasyon ve PCR aşamasında oluşabilecek hatalar kontrol edilmiştir. *Salmonella spp. bipA* gen bölgesi için kapsama ve dışlama Real Time-PCR deney sonuçları sırasıyla Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.3’de, *Salmonella spp. invA* gen bölgesi için kapsama ve dışlama Real Time-PCR deney sonuçları sırasıyla Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.4’de verilmiştir (Öz ve diğ, 2020). Yapılan Real Time-PCR çalışma görüntüleri Şekil 3.1’de sunulmuştur (Öz ve diğ, 2020). Kesikli çizgiler internal kontrol artış eğrilerini gösterirken düz çizgiler *Salmonella spp.* artışlarına ait eğrileri göstermektedir. Şekil 3.1 (a) *Salmonella bipA* bölgesi için *Salmonella spp.* türleri ile yapılan Real Time-PCR deney sonuçlarını göstermektedir. Negatif kontrol dışında deneye dahil edilen bütün *Salmonella* suşları için FAM kanalından artış eğrisi elde edilmiştir. İnternal kontrol artışları bütün örnekler için HEX kanalından pozitif sinyal vermiştir. Şekil 3.1 (b) *Salmonella bipA* bölgesi için *Salmonella spp.* dışındaki türler ile yapılan Real Time-PCR deney sonuçlarını göstermektedir. Pozitif kontrol (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028) dışındaki bütün *Salmonella* dışı suşlar için FAM kanalından herhangi bir artış elde edilmemiştir. İnternal kontrol artışı HEX kanalından kontrol edilmiş ve bütün *Salmonella* dışı örneklerde negatiflik doğrulanmıştır. Şekil 3.1 (c) *invA* bölgesi için *Salmonella spp.* türleri ile yapılan Real Time-PCR deney sonuçlarını göstermektedir. Negatif kontrol dışında denenen bütün *Salmonella* suşları için FAM kanalından artış eğrisi elde edilmiştir. İnternal kontrol artışları bütün örnekler için HEX kanalından pozitif sinyal vermiştir. Şekil 3.1 (d) *invA* bölgesi için *Salmonella spp.* dışındaki türler ile yapılan Real Time-PCR deney sonuçlarını göstermektedir. Pozitif kontrol (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028)

dışındaki bütün *Salmonella* dışı suşlar için FAM kanalından herhangi bir artış elde edilmemiştir. İnternal kontrol artışı HEX kanalından kontrol edilmiş ve bütün *Salmonella* dışı örneklerde negatiflik doğrulanmıştır.



Şekil 3.1 : *Salmonella* spp. Real Time-PCR kapsama ve dışlama deneyleri (Öz ve diğ., 2020).

Çizelge 3.1 : *Salmonella bipA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A1	Pozitif Kontrol (<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028)	ATCC 14028	FAM	15.72	Pozitif
			HEX	33.64	Pozitif
A3	Negatif Control (<i>Klebsiella pneumonia</i>)	SA2807	FAM	-	Negatif
			HEX	33.74	Pozitif
A2	<i>Salmonella minnesota</i>	mR5a	FAM	13.31	Pozitif
			HEX	33.42	Pozitif
A4	<i>Salmonella typhimurium</i>	SARA1	FAM	15.57	Pozitif
			HEX	33.53	Pozitif
A5	<i>Salmonella saintpaul</i>	SARA22	FAM	14.98	Pozitif
			HEX	33.30	Pozitif
A6	<i>Salmonella heidelberg</i>	SARA30	FAM	13.58	Pozitif
			HEX	33.07	Pozitif
A7	<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARA41	FAM	15.04	Pozitif
			HEX	33.58	Pozitif
A8	<i>Salmonella muenchen</i>	SARA63	FAM	14.03	Pozitif
			HEX	33.30	Pozitif
A9	<i>Salmonella enteritidis</i>	27655	FAM	17.00	Pozitif
			HEX	33.45	Pozitif
A10	<i>Salmonella paratyphi A</i>	SA4249	FAM	14.35	Pozitif
			HEX	33.80	Pozitif
A11	<i>Salmonella paratyphi A</i>	RKS2907	FAM	15.39	Pozitif
			HEX	33.80	Pozitif

Çizelge 3.1 (devam) : *Salmonella bipA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A12	<i>Salmonella enteritidis</i>	RKS53	FAM	15.14	Pozitif
			HEX	33.22	Pozitif
B1	<i>Salmonella paratyphi A</i>	RKS4993	FAM	14.78	Pozitif
			HEX	33.26	Pozitif
B2	<i>Salmonella paratyphi C</i>	RKS4594	FAM	13.84	Pozitif
			HEX	33.04	Pozitif
B3	<i>Salmonella paratyphi C</i>	RKS4620	FAM	14.30	Pozitif
			HEX	33.25	Pozitif
B4	<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS4994	FAM	14.45	Pozitif
			HEX	33.20	Pozitif
B5	<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS5021	FAM	17.07	Pozitif
			HEX	33.96	Pozitif
B6	<i>Salmonella pullorum</i>	RKS5078	FAM	17.18	Pozitif
			HEX	34.01	Pozitif
B7	<i>Salmonella pullorum</i>	RKS2242	FAM	14.60	Pozitif
			HEX	33.25	Pozitif
B8	<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS5079	FAM	17.54	Pozitif
			HEX	33.70	Pozitif
B9	<i>Salmonella dublin</i>	RKS4699	FAM	14.21	Pozitif
			HEX	33.24	Pozitif
B10	<i>Salmonella dublin</i>	RKS4732	FAM	16.13	Pozitif
			HEX	33.44	Pozitif
B11	<i>Salmonella agona</i>	SARB1	FAM	14.62	Pozitif
			HEX	33.55	Pozitif
B12	<i>Salmonella derby</i>	SARB9	FAM	14.21	Pozitif
			HEX	33.81	Pozitif
C1	<i>Salmonella gallinarum</i>	SARB21	FAM	14.79	Pozitif
			HEX	33.64	Pozitif
C2	<i>Salmonella haifa</i>	SARB22	FAM	15.24	Pozitif
			HEX	33.39	Pozitif
C3	<i>Salmonella heidelberg</i>	SARB23	FAM	14.95	Pozitif
			HEX	33.67	Pozitif
C4	<i>Salmonella indiana</i>	SARB25	FAM	15.28	Pozitif
			HEX	33.84	Pozitif
C5	<i>Salmonella infantis</i>	SARB26	FAM	14.71	Pozitif
			HEX	33.20	Pozitif
C6	<i>Salmonella miami</i>	SARB28	FAM	15.13	Pozitif
			HEX	33.11	Pozitif
C7	<i>Salmonella montevideo</i>	SARB31	FAM	13.98	Pozitif
			HEX	33.21	Pozitif
C8	<i>Salmonella newport</i>	SARB36	FAM	17.74	Pozitif
			HEX	33.72	Pozitif
C9	<i>Salmonella newport</i>	SARB37	FAM	14.29	Pozitif
			HEX	33.16	Pozitif
C10	<i>Salmonella newport</i>	SARB38	FAM	14.42	Pozitif
			HEX	33.15	Pozitif
C11	<i>Salmonella paratyphi A</i>	SARB42	FAM	14.71	Pozitif
			HEX	33.47	Pozitif
C12	<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARB43	FAM	14.11	Pozitif
			HEX	33.15	Pozitif
D1	<i>Salmonella paratyphi C</i>	SARB48	FAM	14.54	Pozitif
			HEX	33.57	Pozitif

Çizelge 3.1 (devam) : *Salmonella bipA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
D2	<i>Salmonella pullorum</i>	SARB51	FAM	14.54	Pozitif
			HEX	34.16	Pozitif
D3	<i>Salmonella reading</i>	SARB53	FAM	14.31	Pozitif
			HEX	33.39	Pozitif
D4	<i>Salmonella rubislaw</i>	SARB54	FAM	14.27	Pozitif
			HEX	33.43	Pozitif
D5	<i>Salmonella saintpaul</i>	SARB55	FAM	13.87	Pozitif
			HEX	33.36	Pozitif
D6	<i>Salmonella schwarzengrund</i>	SARB57	FAM	18.55	Pozitif
			HEX	33.24	Pozitif
D7	<i>Salmonella sendai</i>	SARB58	FAM	15.40	Pozitif
			HEX	33.39	Pozitif
D8	<i>Salmonella senftenberg</i>	SARB59	FAM	14.98	Pozitif
			HEX	33.31	Pozitif
D9	<i>Salmonella stanley</i>	SARB60	FAM	15.16	Pozitif
			HEX	33.30	Pozitif
D10	<i>Salmonella stanleyville</i>	SARB61	FAM	14.58	Pozitif
			HEX	33.58	Pozitif
D11	<i>Salmonella thompson</i>	SARB62	FAM	14.38	Pozitif
			HEX	33.85	Pozitif
D12	PCR Negatif Kontrol (dH2O)	PCR Negatif Kontrol (dH2O)	FAM	-	Negatif
			HEX	34.75	Pozitif
A2	<i>Salmonella typhisuis</i>	SARB69	FAM	13.78	Pozitif
			HEX	34.01	Pozitif
A3	<i>Salmonella vvien</i>	SARB71	FAM	14.48	Pozitif
			HEX	33.73	Pozitif
A4	<i>Salmonella typhimurium LT2</i>	Lt2	FAM	14.31	Pozitif
			HEX	33.58	Pozitif
A5	<i>Salmonella decatur</i>	SARB8	FAM	16.53	Pozitif
			HEX	33.90	Pozitif
A6	<i>Salmonella duisberg</i>	SARB15	FAM	14.22	Pozitif
			HEX	33.67	Pozitif
A7	<i>Salmonella emek</i>	SARB20	FAM	15.02	Pozitif
			HEX	33.14	Pozitif
A8	<i>Salmonella spp.</i>	K1229	FAM	15.56	Pozitif
			HEX	33.56	Pozitif
A9	<i>Salmonella spp.</i>	K950	FAM	14.02	Pozitif
			HEX	33.74	Pozitif
A10	<i>Salmonella spp.</i>	K887	FAM	14.23	Pozitif
			HEX	34.15	Pozitif
A11	<i>Salmonella spp.</i>	RKS1740	FAM	14.25	Pozitif
			HEX	34.03	Pozitif
A12	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2246	FAM	14.79	Pozitif
			HEX	34.05	Pozitif
B1	<i>Salmonella spp.</i>	RKS1280	FAM	14.78	Pozitif
			HEX	33.81	Pozitif
B2	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2986	FAM	14.60	Pozitif
			HEX	33.69	Pozitif
B3	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2987	FAM	16.66	Pozitif
			HEX	33.75	Pozitif
B4	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2988	FAM	14.96	Pozitif
			HEX	34.02	Pozitif

Çizelge 3.1 (devam) : *Salmonella bipA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
B5	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2982	FAM	15.19	Pozitif
			HEX	33.80	Pozitif
B6	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2984	FAM	15.49	Pozitif
			HEX	33.92	Pozitif
B7	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2975	FAM	14.51	Pozitif
			HEX	33.74	Pozitif
B8	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2976	FAM	17.17	Pozitif
			HEX	34.02	Pozitif
B9	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2977	FAM	14.85	Pozitif
			HEX	33.32	Pozitif
B10	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2978	FAM	15.30	Pozitif
			HEX	33.32	Pozitif
B11	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3009	FAM	17.24	Pozitif
			HEX	33.72	Pozitif
B12	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3010	FAM	14.69	Pozitif
			HEX	33.25	Pozitif
C1	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3036	FAM	14.38	Pozitif
			HEX	34.26	Pozitif
C2	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3038	FAM	14.39	Pozitif
			HEX	33.33	Pozitif
C3	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3039	FAM	15.14	Pozitif
			HEX	33.85	Pozitif
C4	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3040	FAM	14.91	Pozitif
			HEX	33.36	Pozitif
C5	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3042	FAM	14.49	Pozitif
			HEX	33.97	Pozitif
C6	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3052	FAM	15.15	Pozitif
			HEX	33.44	Pozitif
C7	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3053	FAM	14.88	Pozitif
			HEX	33.82	Pozitif
C8	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3055	FAM	14.94	Pozitif
			HEX	33.56	Pozitif
C9	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3013	FAM	14.42	Pozitif
			HEX	33.68	Pozitif
C10	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3014	FAM	15.06	Pozitif
			HEX	33.45	Pozitif
C11	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3803	FAM	17.02	Pozitif
			HEX	33.57	Pozitif
C12	<i>Salmonella typhimurium</i>	E-1	FAM	17.13	Pozitif
			HEX	33.88	Pozitif
D1	<i>Salmonella newport</i>	E-2	FAM	16.18	Pozitif
			HEX	34.66	Pozitif
D2	<i>Salmonella enteritidis</i>	E-3	FAM	14.69	Pozitif
			HEX	33.75	Pozitif
D3	<i>Salmonella poana</i>	E-4	FAM	15.45	Pozitif
			HEX	33.80	Pozitif
D4	<i>Salmonella pullorum</i>	E-5	FAM	15.40	Pozitif
			HEX	33.48	Pozitif
D5	<i>Salmonella paratyphiA</i>	E-6	FAM	15.01	Pozitif
			HEX	33.61	Pozitif

Çizelge 3.2 : *Salmonella invA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A1	Pozitif Kontrol (<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028)	ATCC 14028	FAM	15.85	Pozitif
			HEX	33.05	Pozitif
A3	<i>Salmonella typhisuis</i>	SARB69	FAM	13.12	Pozitif
			HEX	33.08	Pozitif
A2	<i>Salmonella minnesota</i>	mR5a	FAM	13.79	Pozitif
			HEX	32.90	Pozitif
A4	<i>Salmonella typhimurium</i>	SARA1	FAM	13.62	Pozitif
			HEX	32.77	Pozitif
A5	<i>Salmonella saintpaul</i>	SARA22	FAM	15.88	Pozitif
			HEX	33.15	Pozitif
A6	<i>Salmonella heidelberg</i>	SARA30	FAM	13.52	Pozitif
			HEX	32.82	Pozitif
A7	<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARA41	FAM	14.29	Pozitif
			HEX	32.33	Pozitif
A8	<i>Salmonella muenchen</i>	SARA63	FAM	14.92	Pozitif
			HEX	32.80	Pozitif
A9	<i>Salmonella enteritidis</i>	27655	FAM	13.30	Pozitif
			HEX	32.95	Pozitif
A10	<i>Salmonella paratyphi A</i>	SA4249	FAM	13.53	Pozitif
			HEX	33.30	Pozitif
A11	<i>Salmonella paratyphi A</i>	RKS2907	FAM	13.55	Pozitif
			HEX	33.17	Pozitif
A12	<i>Salmonella enteritidis</i>	RKS53	FAM	14.12	Pozitif
			HEX	33.26	Pozitif
B1	<i>Salmonella paratyphi A</i>	RKS4993	FAM	14.11	Pozitif
			HEX	33.05	Pozitif
B2	<i>Salmonella paratyphi C</i>	RKS4594	FAM	13.98	Pozitif
			HEX	32.83	Pozitif
B3	<i>Salmonella paratyphi C</i>	RKS4620	FAM	16.03	Pozitif
			HEX	33.05	Pozitif
B4	<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS4994	FAM	14.24	Pozitif
			HEX	33.16	Pozitif
B5	<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS5021	FAM	14.47	Pozitif
			HEX	33.01	Pozitif
B6	<i>Salmonella pullorum</i>	RKS5078	FAM	14.83	Pozitif
			HEX	33.12	Pozitif
B7	<i>Salmonella pullorum</i>	RKS2242	FAM	13.85	Pozitif
			HEX	32.89	Pozitif
B8	<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS5079	FAM	16.43	Pozitif
			HEX	33.23	Pozitif
B9	<i>Salmonella dublin</i>	RKS4699	FAM	14.17	Pozitif
			HEX	32.51	Pozitif
B10	<i>Salmonella dublin</i>	RKS4732	FAM	14.60	Pozitif
			HEX	32.53	Pozitif
B11	<i>Salmonella agona</i>	SARB1	FAM	16.55	Pozitif
			HEX	33.04	Pozitif
B12	<i>Salmonella derby</i>	SARB9	FAM	14.05	Pozitif
			HEX	32.43	Pozitif
C1	<i>Salmonella gallinarum</i>	SARB21	FAM	13.71	Pozitif
			HEX	33.37	Pozitif
C2	<i>Salmonella haifa</i>	SARB22	FAM	13.73	Pozitif
			HEX	32.49	Pozitif

Çizelge 3.2 (davam) : *Salmonella invA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
C3	<i>Salmonella heidelberg</i>	SARB23	FAM	14.42	Pozitif
			HEX	33.09	Pozitif
C4	<i>Salmonella indiana</i>	SARB25	FAM	14.22	Pozitif
			HEX	32.52	Pozitif
C5	<i>Salmonella infantis</i>	SARB26	FAM	13.84	Pozitif
			HEX	33.09	Pozitif
C6	<i>Salmonella miami</i>	SARB28	FAM	14.44	Pozitif
			HEX	32.66	Pozitif
C7	<i>Salmonella montevideo</i>	SARB31	FAM	14.19	Pozitif
			HEX	33.06	Pozitif
C8	<i>Salmonella newport</i>	SARB36	FAM	14.22	Pozitif
			HEX	32.76	Pozitif
C9	<i>Salmonella newport</i>	SARB37	FAM	13.75	Pozitif
			HEX	32.85	Pozitif
C10	<i>Salmonella newport</i>	SARB38	FAM	14.34	Pozitif
			HEX	32.64	Pozitif
C11	<i>Salmonella paratyphi A</i>	SARB42	FAM	16.22	Pozitif
			HEX	32.84	Pozitif
C12	<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARB43	FAM	16.34	Pozitif
			HEX	33.11	Pozitif
D1	<i>Salmonella paratyphi C</i>	SARB48	FAM	15.37	Pozitif
			HEX	33.87	Pozitif
D2	<i>Salmonella pullorum</i>	SARB51	FAM	14.05	Pozitif
			HEX	32.96	Pozitif
D3	<i>Salmonella reading</i>	SARB53	FAM	14.79	Pozitif
			HEX	33.04	Pozitif
D4	<i>Salmonella rubislaw</i>	SARB54	FAM	14.73	Pozitif
			HEX	32.70	Pozitif
D5	<i>Salmonella saintpaul</i>	SARB55	FAM	14.29	Pozitif
			HEX	32.77	Pozitif
D6	<i>Salmonella schwarzengrund</i>	SARB57	FAM	13.86	Pozitif
			HEX	32.82	Pozitif
D7	<i>Salmonella sendai</i>	SARB58	FAM	14.23	Pozitif
			HEX	33.07	Pozitif
D8	<i>Salmonella senftenberg</i>	SARB59	FAM	14.29	Pozitif
			HEX	32.68	Pozitif
D9	<i>Salmonella stanley</i>	SARB60	FAM	15.36	Pozitif
			HEX	33.04	Pozitif
D10	<i>Salmonella stanleyville</i>	SARB61	FAM	15.27	Pozitif
			HEX	32.77	Pozitif
D11	<i>Salmonella thompson</i>	SARB62	FAM	14.74	Pozitif
			HEX	32.88	Pozitif
D12	PCR Negatif Kontrol (dH2O)	PCR Negatif Kontrol (dH2O)	FAM	-	Negatif
			HEX	34.17	Pozitif
A4	<i>Salmonella wien</i>	SARB71	FAM	16.27	Pozitif
			HEX	34.30	Pozitif
A5	<i>Salmonella typhimurium LT2</i>	Lt2	FAM	15.61	Pozitif
			HEX	34.09	Pozitif
A6	<i>Salmonella decatur</i>	SARB8	FAM	14.28	Pozitif
			HEX	33.90	Pozitif
A7	<i>Salmonella duisberg</i>	SARB15	FAM	15.68	Pozitif
			HEX	34.35	Pozitif

Çizelge 3.2 (davam) : *Salmonella invA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A8	<i>Salmonella emek</i>	SARB20	FAM	14.66	Pozitif
			HEX	34.13	Pozitif
A9	<i>Salmonella spp.</i>	K1229	FAM	17.80	Pozitif
			HEX	34.18	Pozitif
A10	<i>Salmonella spp.</i>	K950	FAM	15.08	Pozitif
			HEX	34.57	Pozitif
A11	<i>Salmonella spp.</i>	K887	FAM	16.11	Pozitif
			HEX	34.54	Pozitif
A12	<i>Salmonella spp.</i>	RKS1740	FAM	15.82	Pozitif
			HEX	34.03	Pozitif
B1	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2246	FAM	15.46	Pozitif
			HEX	34.08	Pozitif
B2	<i>Salmonella spp.</i>	RKS1280	FAM	14.49	Pozitif
			HEX	33.81	Pozitif
B3	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2986	FAM	15.02	Pozitif
			HEX	34.06	Pozitif
B4	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2987	FAM	15.17	Pozitif
			HEX	34.01	Pozitif
B5	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2988	FAM	18.00	Pozitif
			HEX	34.65	Pozitif
B6	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2982	FAM	18.05	Pozitif
			HEX	34.69	Pozitif
B7	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2984	FAM	15.30	Pozitif
			HEX	34.03	Pozitif
B8	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2975	FAM	18.50	Pozitif
			HEX	34.44	Pozitif
B9	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2976	FAM	14.91	Pozitif
			HEX	34.04	Pozitif
B10	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2977	FAM	16.80	Pozitif
			HEX	34.18	Pozitif
B11	<i>Salmonella spp.</i>	RKS2978	FAM	15.32	Pozitif
			HEX	34.34	Pozitif
B12	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3009	FAM	14.90	Pozitif
			HEX	34.59	Pozitif
C1	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3010	FAM	15.44	Pozitif
			HEX	34.44	Pozitif
C2	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3036	FAM	15.94	Pozitif
			HEX	34.19	Pozitif
C3	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3038	FAM	15.58	Pozitif
			HEX	34.43	Pozitif
C4	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3039	FAM	16.02	Pozitif
			HEX	34.55	Pozitif
C5	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3040	FAM	15.38	Pozitif
			HEX	34.01	Pozitif
C6	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3042	FAM	15.79	Pozitif
			HEX	33.85	Pozitif
C7	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3052	FAM	14.61	Pozitif
			HEX	34.03	Pozitif
C8	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3053	FAM	18.40	Pozitif
			HEX	34.38	Pozitif
C9	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3055	FAM	15.01	Pozitif
			HEX	34.00	Pozitif

Çizelge 3.2 (davam) : *Salmonella invA* gen bölgesi için kapsama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
C10	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3013	FAM	15.13	Pozitif
			HEX	33.95	Pozitif
C11	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3014	FAM	15.37	Pozitif
			HEX	34.26	Pozitif
C12	<i>Salmonella spp.</i>	RKS3803	FAM	14.76	Pozitif
			HEX	34.03	Pozitif
D1	<i>Salmonella typhimurium</i>	E-1	FAM	15.24	Pozitif
			HEX	34.41	Pozitif
D2	<i>Salmonella newport</i>	E-2	FAM	15.24	Pozitif
			HEX	35.06	Pozitif
D3	<i>Salmonella enteritidis</i>	E-3	FAM	15.03	Pozitif
			HEX	34.20	Pozitif
D4	<i>Salmonella poana</i>	E-4	FAM	15.00	Pozitif
			HEX	34.24	Pozitif
D5	<i>Salmonella pullorum</i>	E-5	FAM	14.52	Pozitif
			HEX	34.22	Pozitif
D6	<i>Salmonella paratyphiA</i>	E-6	FAM	19.25	Pozitif
			HEX	33.95	Pozitif

Çizelge 3.3 : *bipA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A1	Pozitif Kontrol (<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028)	ATCC 14028	FAM	16.05	Pozitif
			HEX	34.36	Pozitif
A3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2807	FAM	-	Negatif
			HEX	34.36	Pozitif
A2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2808	FAM	-	Negatif
			HEX	34.62	Pozitif
A4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2809	FAM	-	Negatif
			HEX	33.79	Pozitif
A5	<i>Klebsiella ozaenae</i>	SA2810	FAM	-	Negatif
			HEX	34.47	Pozitif
A6	<i>Escherichia coli</i>	SA2811	FAM	-	Negatif
			HEX	34.92	Pozitif
A7	<i>Escherichia coli</i>	SA2812	FAM	-	Negatif
			HEX	34.23	Pozitif
A8	<i>Escherichia coli</i>	SA2813	FAM	-	Negatif
			HEX	35.04	Pozitif
A9	<i>Escherichia coli</i>	SA2814	FAM	-	Negatif
			HEX	35.30	Pozitif
A10	<i>Escherichia coli</i>	SA2815	FAM	-	Negatif
			HEX	35.19	Pozitif
A11	<i>Escherichia coli</i>	SA2816	FAM	-	Negatif
			HEX	34.99	Pozitif
A12	<i>Escherichia coli</i>	SA2817	FAM	-	Negatif
			HEX	34.40	Pozitif
B1	<i>Escherichia coli</i>	SA2819	FAM	-	Negatif
			HEX	33.44	Pozitif
B2	<i>Enterobacter cloacae</i>	EC1	FAM	-	Negatif
			HEX	34.78	Pozitif

Çizelge 3.3 (devam) : *bipA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
B3	<i>Citrobacter freundii</i>	EC26	FAM	-	Negatif
			HEX	34.93	Pozitif
B4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	EC5	FAM	-	Negatif
			HEX	34.80	Pozitif
B5	<i>Serratia marcescens</i>	EC79	FAM	-	Negatif
			HEX	34.39	Pozitif
B6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	EC78	FAM	-	Negatif
			HEX	34.84	Pozitif
B7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EC17	FAM	-	Negatif
			HEX	35.14	Pozitif
B8	<i>Hafnia alvei</i>	EC68	FAM	-	Negatif
			HEX	35.52	Pozitif
B9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	PL82450	FAM	-	Negatif
			HEX	34.42	Pozitif
B10	<i>Morganella morganii</i>	PL112028	FAM	-	Negatif
			HEX	34.09	Pozitif
B11	<i>Serratia marcescens</i>	920910 v	FAM	-	Negatif
			HEX	34.03	Pozitif
B12	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	FAM	-	Negatif
			HEX	34.03	Pozitif
C1	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022	FAM	-	Negatif
			HEX	34.54	Pozitif
C2	<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	FAM	-	Negatif
			HEX	34.92	Pozitif
C3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5590	FAM	-	Negatif
			HEX	34.35	Pozitif
C4	<i>Enterobacter cloacae</i>	SA5595	FAM	-	Negatif
			HEX	34.21	Pozitif
C5	<i>Morganella morganii</i>	SA5620	FAM	-	Negatif
			HEX	33.97	Pozitif
C6	<i>Serratia liquefaciens</i>	PL70291-2	FAM	-	Negatif
			HEX	34.12	Pozitif
C7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5632	FAM	-	Negatif
			HEX	34.05	Pozitif
C8	<i>Hafnia alvei</i>	PL70284-1	FAM	-	Negatif
			HEX	34.17	Pozitif
C9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i>	ATCC11296	FAM	-	Negatif
			HEX	34.59	Pozitif
C10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182	FAM	-	Negatif
			HEX	34.40	Pozitif
C11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	ATCC13883	FAM	-	Negatif
			HEX	34.96	Pozitif
C12	<i>Serratia marcescens</i>	M15	FAM	-	Negatif
			HEX	33.39	Pozitif
D1	<i>Shigella flexneri</i>	M16	FAM	-	Negatif
			HEX	34.44	Pozitif
D2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	M22	FAM	-	Negatif
			HEX	34.33	Pozitif
D3	<i>Escherichia coli K-12</i>	SAB3059	FAM	-	Negatif
			HEX	34.09	Pozitif
D4	<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC35469	FAM	-	Negatif
			HEX	34.02	Pozitif

Çizelge 3.3 (devam) : *bipA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
D5	<i>Escherichia coli</i> MM294	EC-2	FAM	-	Negatif
			HEX	33.80	Pozitif
D6	<i>Escherichia coli</i> b3	EC-3	FAM	-	Negatif
			HEX	34.25	Pozitif
D7	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	FAM	-	Negatif
			HEX	33.73	Pozitif
D8	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	FAM	-	Negatif
			HEX	34.97	Pozitif
D9	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	FAM	-	Negatif
			HEX	34.27	Pozitif
D10	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	FAM	-	Negatif
			HEX	34.92	Pozitif
D11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	FAM	-	Negatif
			HEX	34.26	Pozitif
D12	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	FAM	-	Negatif
			HEX	35.10	Pozitif
A2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715	FAM	-	Negatif
			HEX	34.89	Pozitif
A3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729	FAM	-	Negatif
			HEX	35.14	Pozitif
A4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	FAM	-	Negatif
			HEX	34.28	Pozitif
A5	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019	FAM	-	Negatif
			HEX	34.98	Pozitif
A6	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	FAM	-	Negatif
			HEX	35.27	Pozitif
A7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	O-1	FAM	-	Negatif
			HEX	34.71	Pozitif
A8	<i>Proteus vulgaris</i>	O-3	FAM	-	Negatif
			HEX	35.37	Pozitif
A9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	O-3	FAM	-	Negatif
			HEX	35.68	Pozitif
A10	<i>Serratia mercensens</i>	O-4	FAM	-	Negatif
			HEX	35.55	Pozitif
A11	<i>Escherichia coli</i> DH5	O-5	FAM	-	Negatif
			HEX	35.31	Pozitif
A12	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	FAM	-	Negatif
			HEX	34.76	Pozitif
B1	<i>Bacillus cereus</i>	O-8	FAM	-	Negatif
			HEX	33.88	Pozitif
B2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC 29213	FAM	-	Negatif
			HEX	35.16	Pozitif
B3	<i>Enterococcus faecium</i>	A-2	FAM	-	Negatif
			HEX	35.27	Pozitif
B4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	A-3	FAM	-	Negatif
			HEX	35.17	Pozitif
B5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A-4	FAM	-	Negatif
			HEX	34.96	Pozitif
B6	<i>Burkholderia</i> (<i>Pseudomonas</i>) <i>cepacia</i>	A-5	FAM	-	Negatif
			HEX	35.21	Pozitif
B7	<i>Morganella morganii</i>	A-6	FAM	-	Negatif
			HEX	35.50	Pozitif

Çizelge 3.3 (devam) : *bipA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
B8	<i>Proteus mirabilis</i>	A-7	FAM	-	Negatif
			HEX	35.95	Pozitif
B9	<i>Corynebacterium spp.</i>	A-8	FAM	-	Negatif
			HEX	34.84	Pozitif
B10	<i>Hafnia alvei</i>	A-9	FAM	-	Negatif
			HEX	34.54	Pozitif
B11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A-10	FAM	-	Negatif
			HEX	34.44	Pozitif
B12	<i>Staphylococcus epidermis</i>	A-11	FAM	-	Negatif
			HEX	34.46	Pozitif
C1	<i>Enterococcus faecalis</i>	A-12	FAM	-	Negatif
			HEX	35.04	Pozitif
C2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-13	FAM	-	Negatif
			HEX	35.35	Pozitif
C3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A-14	FAM	-	Negatif
			HEX	34.81	Pozitif
C4	<i>E. coli</i> ATCC 25922	A-15	FAM	-	Negatif
			HEX	34.67	Pozitif
C5	PCR Negatif Kontrol (dH ₂ O)		FAM	-	Negatif
			HEX	34.39	Pozitif

Çizelge 3.4 : *invA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A1	Pozitif Kontrol (<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028)	ATCC 14028	FAM	15.66	Pozitif
			HEX	33.96	Pozitif
A3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2807	FAM	-	Negatif
			HEX	33.50	Pozitif
A2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2808	FAM	-	Negatif
			HEX	33.21	Pozitif
A4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2809	FAM	-	Negatif
			HEX	33.03	Pozitif
A5	<i>Klebsiella ozaenae</i>	SA2810	FAM	-	Negatif
			HEX	33.00	Pozitif
A6	<i>Escherichia coli</i>	SA2811	FAM	-	Negatif
			HEX	33.20	Pozitif
A7	<i>Escherichia coli</i>	SA2812	FAM	-	Negatif
			HEX	33.49	Pozitif
A8	<i>Escherichia coli</i>	SA2813	FAM	-	Negatif
			HEX	33.47	Pozitif
A9	<i>Escherichia coli</i>	SA2814	FAM	-	Negatif
			HEX	33.16	Pozitif
A10	<i>Escherichia coli</i>	SA2815	FAM	-	Negatif
			HEX	33.14	Pozitif
A11	<i>Escherichia coli</i>	SA2816	FAM	-	Negatif
			HEX	32.30	Pozitif
A12	<i>Escherichia coli</i>	SA2817	FAM	-	Negatif
			HEX	33.07	Pozitif
B1	<i>Escherichia coli</i>	SA2819	FAM	-	Negatif
			HEX	33.08	Pozitif

Çizelge 3.4 (devam) : *invA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
B2	<i>Enterobacter cloacae</i>	EC1	FAM HEX	- 33.34	Negatif Pozitif
B3	<i>Citrobacter freundii</i>	EC26	FAM HEX	- 33.01	Negatif Pozitif
B4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	EC5	FAM HEX	- 32.02	Negatif Pozitif
B5	<i>Serratia marcescens</i>	EC79	FAM HEX	- 32.93	Negatif Pozitif
B6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	EC78	FAM HEX	- 33.14	Negatif Pozitif
B7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EC17	FAM HEX	- 33.21	Negatif Pozitif
B8	<i>Hafnia alvei</i>	EC68	FAM HEX	- 33.19	Negatif Pozitif
B9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	PL82450	FAM HEX	- 33.36	Negatif Pozitif
B10	<i>Morganella morganii</i>	PL112028	FAM HEX	- 33.65	Negatif Pozitif
B11	<i>Serratia marcescens</i>	920910 v	FAM HEX	- 33.30	Negatif Pozitif
B12	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	FAM HEX	- 33.26	Negatif Pozitif
C1	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022	FAM HEX	- 33.05	Negatif Pozitif
C2	<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	FAM HEX	- 33.35	Negatif Pozitif
C3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5590	FAM HEX	- 33.67	Negatif Pozitif
C4	<i>Enterobacter cloacae</i>	SA5595	FAM HEX	- 33.51	Negatif Pozitif
C5	<i>Morganella morganii</i>	SA5620	FAM HEX	- 33.14	Negatif Pozitif
C6	<i>Serratia liquefaciens</i>	PL70291-2	FAM HEX	- 33.34	Negatif Pozitif
C7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5632	FAM HEX	- 33.49	Negatif Pozitif
C8	<i>Hafnia alvei</i>	PL70284-1	FAM HEX	- 33.07	Negatif Pozitif
C9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i>	ATCC11296	FAM HEX	- 33.47	Negatif Pozitif
C10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182	FAM HEX	- 33.25	Negatif Pozitif
C11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	ATCC13883	FAM HEX	- 33.28	Negatif Pozitif
C12	<i>Serratia marcescens</i>	M15	FAM HEX	- 33.11	Negatif Pozitif
D1	<i>Shigella flexneri</i>	M16	FAM HEX	- 33.54	Negatif Pozitif
D2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	M22	FAM HEX	- 33.32	Negatif Pozitif
D3	<i>Escherichia coli</i> K-12	SAB3059	FAM HEX	- 33.26	Negatif Pozitif

Çizelge 3.4 (devam) : *invA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

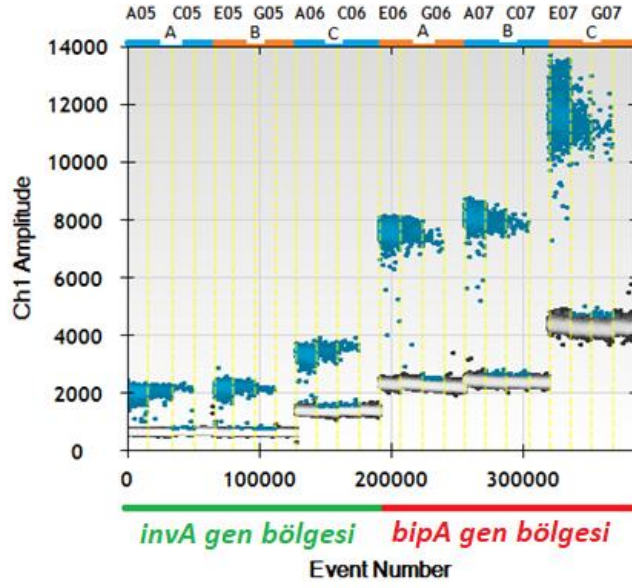
Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
D4	<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC35469	FAM	-	Negatif
			HEX	33.40	Pozitif
D5	<i>Escherichia coli</i> MM294	EC-2	FAM	-	Negatif
			HEX	33.49	Pozitif
D6	<i>Escherichia coli</i> b3	EC-3	FAM	-	Negatif
			HEX	33.44	Pozitif
D7	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	FAM	-	Negatif
			HEX	33.31	Pozitif
D8	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	FAM	42.92	Negatif
			HEX	33.37	Pozitif
D9	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	FAM	-	Negatif
			HEX	33.35	Pozitif
D10	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	FAM	-	Negatif
			HEX	34.70	Pozitif
D11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	FAM	-	Negatif
			HEX	33.37	Pozitif
D12	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	FAM	-	Negatif
			HEX	33.64	Pozitif
A2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715	FAM	-	Negatif
			HEX	34.20	Pozitif
A3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729	FAM	-	Negatif
			HEX	33.89	Pozitif
A4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	FAM	-	Negatif
			HEX	33.68	Pozitif
A5	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019	FAM	-	Negatif
			HEX	33.62	Pozitif
A6	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	FAM	-	Negatif
			HEX	33.88	Pozitif
A7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	O-1	FAM	-	Negatif
			HEX	34.18	Pozitif
A8	<i>Proteus vulgaris</i>	O-3	FAM	-	Negatif
			HEX	34.18	Pozitif
A9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	O-3	FAM	-	Negatif
			HEX	33.83	Pozitif
A10	<i>Serratia mercensens</i>	O-4	FAM	-	Negatif
			HEX	33.79	Pozitif
A11	<i>Escherichia coli</i> DH5	O-5	FAM	-	Negatif
			HEX	32.99	Pozitif
A12	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	FAM	-	Negatif
			HEX	33.69	Pozitif
B1	<i>Bacillus cereus</i>	O-8	FAM	-	Negatif
			HEX	33.82	Pozitif
B2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC 29213	FAM	-	Negatif
			HEX	34.05	Pozitif
B3	<i>Enterococcus faecium</i>	A-2	FAM	-	Negatif
			HEX	33.63	Pozitif
B4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	A-3	FAM	-	Negatif
			HEX	32.67	Pozitif
B5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A-4	FAM	-	Negatif
			HEX	33.55	Pozitif
B6	<i>Burkholderia</i> (<i>Pseudomonas</i>) <i>capeciae</i>	A-5	FAM	-	Negatif
			HEX	33.77	Pozitif

Çizelge 3.4 (devam) : *invA* gen bölgesi için dışlama deneyinde Real Time-PCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
B7	<i>Morganella morganii</i>	A-6	FAM	-	Negatif
			HEX	33.86	Pozitif
B8	<i>Proteus mirabilis</i>	A-7	FAM	-	Negatif
			HEX	33.85	Pozitif
B9	<i>Corynebacterium spp.</i>	A-8	FAM	-	Negatif
			HEX	34.05	Pozitif
B10	<i>Hafnia alvei</i>	A-9	FAM	-	Negatif
			HEX	34.32	Pozitif
B11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A-10	FAM	-	Negatif
			HEX	34.01	Pozitif
B12	<i>Staphylococcus epidermis</i>	A-11	FAM	-	Negatif
			HEX	33.93	Pozitif
C1	<i>Enterococcus faecalis</i>	A-12	FAM	-	Negatif
			HEX	33.65	Pozitif
C2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-13	FAM	-	Negatif
			HEX	34.05	Pozitif
C3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A-14	FAM	-	Negatif
			HEX	34.32	Pozitif
C4	<i>E. coli</i> ATCC 25922	A-15	FAM	-	Negatif
			HEX	34.20	Pozitif
C5	PCR Negatif Control (dH ₂ O)		FAM	-	Negatif
			HEX	33.77	Pozitif

Salmonella spp. için kapsama ve dışlama deneylerinde *bipA* ve *invA* gen bölgesinin her biri için özgüllük gösterildikten sonra ddPCR çalışmalarında ve yapılacak diğer Real Time-PCR deneylerinde bir bölge üzerinden deneylere devam etmeye karar verilmiştir. Bu karar için ddPCR çalışmasında en iyi ayrımı veren primer prob çiftinin seçilmesi yoluna gidilmiştir. Ön çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda hem *bipA* hem de *invA* gen bölgeleri için farklı konsantrasyona sahip primer prob karışımları ile karşılaştırma çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar 76 pg/μl, 7.6 pg/μl, 0.76 pg/μl konsantrasyona sahip *Salmonella typhimurium* ATCC 14028'e ait DNA dilüsyonları ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de karşılaştırmalı olarak çalışılan çeşitli konsantrasyonda primer prob miktarlarının denendiği PCR karışım sonuçları görülmektedir. En iyi ayrımı veren *bipA* gen bölgesi primerleri ile yapılan karışım 3 çalışmasındaki primer ve prob konsantrasyonları ddPCR deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Real Time-PCR çalışmalarına da yine *bipA* gen bölgesi üzerinden devam edilmiştir. Şekil 3.2'de Y eksenini "fluorescence amplitude" adı verilen ışıma genliğini göstermektedir. A, B, C harfleri sırasıyla PCR karışım 1, PCR karışım 2 ve PCR karışım 3 ile 76 pg/μl, 7.6 pg/μl, 0.76 pg/μl *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 DNA miktarları ile çalışma sonuçlarını göstermektedir. Sırasıyla PCR karışım

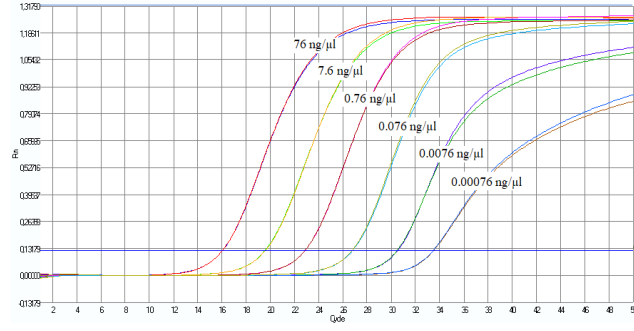
1, 1 ve 0.13 μ M, PCR karışım 2, 0.5 ve 0.13 μ M, PCR karışım 3 ise 1 and 0.25 μ M ileri geri primer ve prob konsantrasyonu içermektedir.



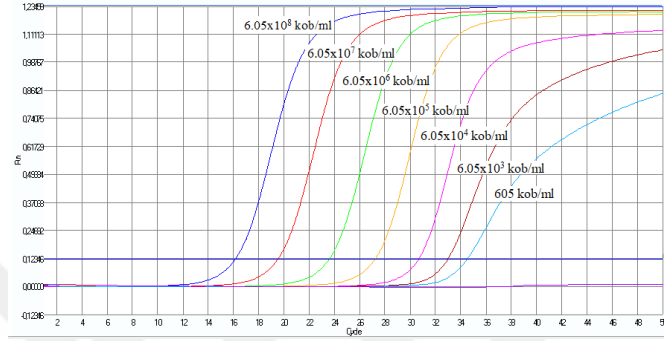
Şekil 3.2 : *invA* ve *bipA* gen bölgeleri için ddPCR karşılaştırma sonuçları 1D ekran görüntüsü (Öz ve diğ, 2020).

3.2 *Salmonella* spp. Doğrusallık Deney Sonuçları

Real Time-PCR çalışmalarında doğrusallığı belirlemek üzere stok bakteriden izole edilen DNA, 10 katlık farklılıklarla seri dilüsyon yapılarak hazırlanmıştır. Dilüsyonlar 76 ng/ μ l-76 fg/ μ l arasında hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlara denk gelen kültüre edilmiş bakteriden hazırlanan dilüsyonlardan da diğer yandan DNA izolatları hazırlanarak Real Time-PCR çalışması içerisinde karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır (Dilüsyonlar 6.05×10^8 kob/ml - 6.05×10^2 kob/ml arasında 10 katlık farkla hazırlanmıştır). Çalışmaya ait Real Time-PCR görüntüleri Şekil 3.3’de verilmiştir (Öz ve diğ, 2020).



(a)



(b)

Şekil 3.3 : *Salmonella* spp. Real Time-PCR doğrusallık çalışması sonuç grafikleri.

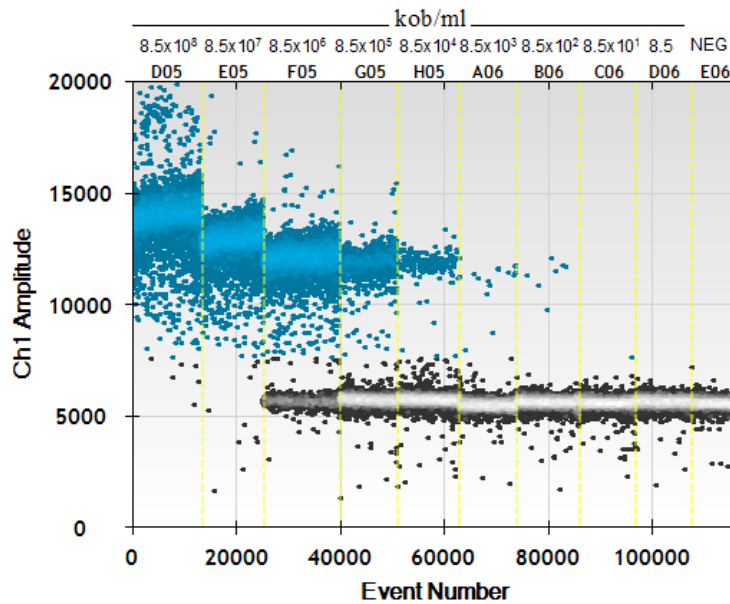
Şekil 3.3 (a) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028'den izole edilen DNA'nın 10 katlık farklarla elde edilen seri dilüsyonlarına ait artış eğrilerini, Şekil 3.3 (b) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 için 10 katlık farklarla yapılan bakteri dilüsyonlarının her birinden elde edilen DNA izolatlarına ait artış eğrilerini göstermektedir. Bu karşılaştırmadan elde edilen Ct değerleri Çizelge 3.5'de sunulmuştur.

Çizelge 3.5 : *Salmonella* için Real Time-PCR doğrusallık deneyinden elde edilen Ct değerleri.

DNA Dilüsyonları	76 ng/ul	7.6 ng/ul	0.76 ng/ul	0.076 ng/ul	0.0076 ng/ul	0.00076 ng/ul	76 fg/ul	7.6 fg/ul	0.76 fg/ul
Ct Değeri 1	15.69	19.49	22.82	26.49	30.62	33.44	Artış yok	39.07	Artış yok
Ct Değeri 2	16.02	19.48	22.77	26.75	30.45	33.61	44.18	Artış yok	Artış yok
Ortalama Ct değeri	15.86	19.49	22.8	26.62	30.54	33.53	-	-	Artış yok
Koloni Sayım Değeri (kob/ml)	6.05x10 ⁸ kob/ml	6.05x10 ⁷ kob/ml	6.05x10 ⁶ kob/ml	6.05x10 ⁵ kob/ml	6.05x10 ⁴ kob/ml	6.05x10 ³ kob/ml	605 kob/ml	60.5 kob/ml	6.05 kob/ml
Ct Değeri 1	16.49	18.76	22.19	27.35	30.18	32.27	35.86	Artış yok	Artış yok
Ct Değeri 2	16.12	19.44	23.51	27.17	30.58	32.96	34.46	44.34	Artış yok
Ortalama Ct değeri	16.31	19.1	22.85	27.26	30.38	32.62	35.16	-	Artış yok

Dinamik aralıktaki doğrusallık tekrarlı çalışmadaki, ortalama Ct değerleri üzerinden R^2 değerinin saptanması ile değerlendirilmiş olup 76 ng/μl - 76 fg/μl (76 fg/μl konsantrasyona sahip örnek için yapılan ikili çalışmadan birisinde artış elde edilmiştir) arasındaki DNA sulandırılmaları için bu değer 0.999 olarak belirlenmiştir. Bu aralıkta doğrusallık ideale yakın olarak çıkmıştır. Bakteri dilüsyonlarından 6.05×10^8 - 60.5×10^1 kob/ml arasındaki dilüsyonlardan elde edilen DNA izolatları için R^2 değeri 0.9896 olarak elde edilmiştir. Real Time-PCR çalışması için DNA dilüsyonları ve bakteri dilüsyonlarından elde edilen DNA izolatları arasında 95% güven aralığında (p-value=0.668>0.05) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Buradan DNA izolasyonu aşamasında önemli derecede DNA kaybının yaşanmadığı sonucu çıkartılabilir. Diğer yandan bu çalışmadan duyarlılık çalışması için ön bilgi elde edilmiştir. Bu çalışmaya göre en düşük hassasiyet limitinin 605 kob/ml veya 758 fg/μl değeri civarlarında olduğu söylenebilir.

ddPCR için doğrusallık deneyi *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 stok bakteri kültüründen elde edilen 10 katlık dilüsyonlardan hazırlanan DNA izolatlarının çalışılması ile elde edilmiş olup Şekil 3.4’de çalışma görüntüsü eklenmiştir (Öz ve diğ., 2020). ddPCR deney sonuçları Çizelge 3.6’da verilmiştir. 8.5×10^8 ve 8.5×10^7 kob/ml bakteri örneklerinden elde edilen DNA yüksek konsantrasyona sahip olması nedeniyle doygunluk (satürasyon) yaratmış ve ölçülebilir bir değer vermemiştir. R^2 değeri 8.5×10^6 and 850 kob/ml arasındaki değerler için 0.986 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.4 : *Salmonella* spp. ddPCR doğrusallık çalışması.

Çizelge 3.6 : *Salmonella spp.* için iki tekrarlı yapılan ddPCR doğrusallık deneyine ait sonuçlar.

Örnek	Konsantrasyon kopya/μl	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
Deney 1				
8.5x10 ⁸ kob/ml	8320	13616	7	13623
8.5x10 ⁷ kob/ml	7790	11928	10	11938
8.5x10 ⁶ kob/ml	2220	12680	1941	14621
8.5x10 ⁵ kob/ml	177	1655	9498	11153
8.5x10 ⁴ kob/ml	16.1	172	11665	11837
8.5x10 ³ kob/ml	1.41	14	10936	10950
8.5x10 ² kob/ml	0.634	7	12121	12128
85 kob/ml	0.1	1	10960	10961
8.5 kob/ml	0	0	10686	10686
dH ₂ O	0	0	8738	8738
Deney 2				
8.5x10 ⁸ kob/ml	7710	13346	12	13358
8.5x10 ⁷ kob/ml	1000000	13188	0	13188
8.5x10 ⁶ kob/ml	1190	8373	4312	12685
8.5x10 ⁵ kob/ml	91.9	1193	13673	14866
8.5x10 ⁴ kob/ml	7.76	94	13258	13352
8.5x10 ³ kob/ml	0.832	10	13199	13209
8.5x10 ² kob/ml	0.0775	1	14177	14178
dH ₂ O	0	0	15215	15215

Her iki deney sonucundan elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7 : Doğrusallık 1 ve doğrusallık 2 deneyi için ortalama değerlerin belirlenmesi.

Koloni sayım değeri (kob/ml)	*8.5x10 ⁸	*8.5x10 ⁷	8.5x10 ⁶	8.5x10 ⁵	8.5x10 ⁴	8.5x10 ³	850	85	8.5
Deney 1 (kopya/μl)	Satüre	Satüre	2220	177	16.4	1.51	0.634	0	0
Deney 2 (kopya/μl)	Satüre	Satüre	1190	91.9	7.76	0.832	0.0775	0	0
Ortalama			1705	134.45	12.08	1.171	0.35575	0	0

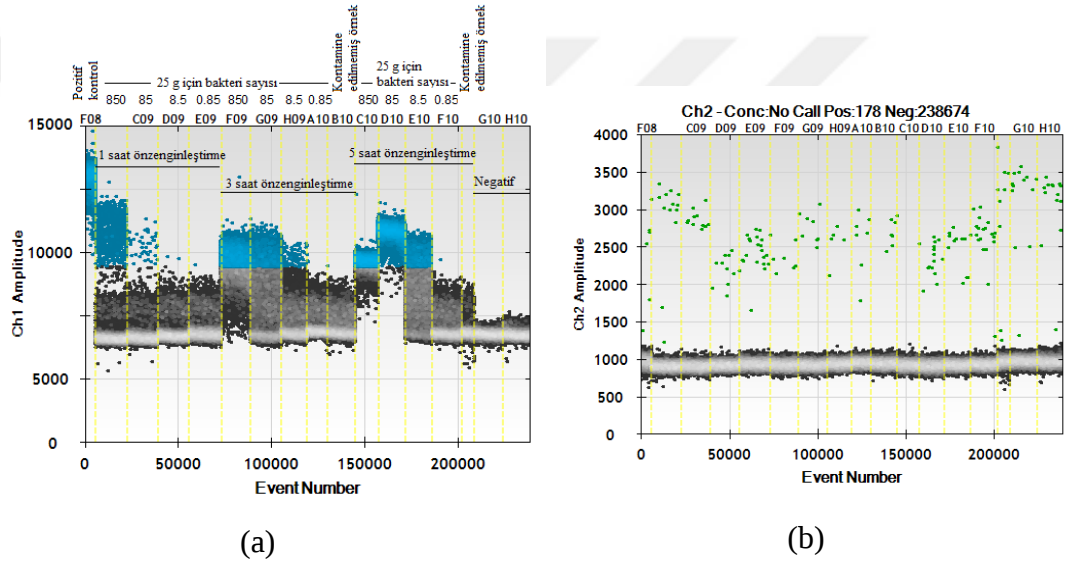
* 8.5x10⁸ kob/ml, 8.5x10⁷ kob/ml konsantrasyona sahip örnek yüksek konsantrasyondan dolayı satüre olmuştur.

Bu çalışmanın ana amaçlarından biri *Salmonella* tanısını mümkün olan en hassas seviyede yapabilmektir. Doğrusallık çalışması, ideal hedefimiz olan 25 g kıyma örneğinde 1 kopya *Salmonella spp.* tanısı yapabilmenin mümkün olmadığını göstermiştir. Real Time-PCR için 605 kob/ml, ddPCR için ise 850 kob/ml örnekten daha aşağıdaki dilüsyonların tespit edilemeyebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmanın hassasiyetini arttırmak üzere mümkün olabilecek en kısa süreye sahip kısa bir ön zenginleştirme aşamasının çalışmaya dahil edilmesine karar verilmiştir. Hassasiyet çalışması bu karar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu kararla birlikte ölü bakterilerden gelen DNA tanınmasının engellenip engellenmediği şüphesi ortadan kalkacaktır.

3.3 *Salmonella* spp. Hassasiyet Deney Sonuçları

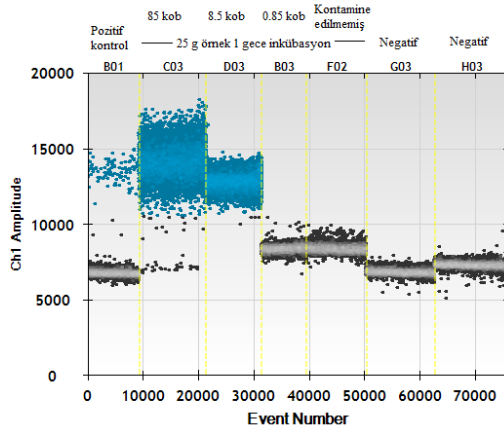
Ön hassasiyet deneyi için tek koloniden *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu ile yapılan bir gece ön ekim sonrası seri dilüsyonlar hazırlanarak $1/10^6$ - $1/10^7$ - $1/10^8$ - $1/10^9$ dilüsyonlarının her birinden 1 ml alınarak 25 g kıyma örneği kontamine edilmiştir. İnkübasyon sonrası 1., 3. ve 5. saatlerde 5 ml numune alınarak bakteriler çöktürülerek DNA izolasyonu yapılmıştır ve izole edilen DNA' dan 5 µl reaksiyon için kullanılarak ddPCR'ın ön kültürlenme süresine bağlı olarak tanıma yeteneği kontrol edilmiştir. Ayrıca bu örneklerin pozitiflikleri bir gece büyümeye bırakılarak kontrol edilmiştir. Taze olarak büyütülen bakterilerle hazırlanan dilüsyonlardan hemen kontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda 10^7 - 10^9 arası dilüsyonların 1 kopya bakteri içerme olasılığı gözetilerek bu dilüsyonlarla deney gerçekleştirilmiştir. Yapılan dilüsyonlardan agar üzerine yapılan 3'lü ekimlerin 37°C 'ta inkübasyonu ile bir sonraki gün bakteri sayısı belirlenmiş ve ddPCR deneyi buna göre değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada belirtilen dilüsyonlara denk gelen bakteri sayısı 850, 85, 8.5 ve 0.85 kob/ml olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.5 ilgili çalışmaya ait ddPCR görüntüsünü içermektedir (Öz ve diğ, 2020). Şekil 3.5 (a) *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu ile kontamine edilerek 1-3-5 saat ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş 25 g kıyma örneğinden izole edilen DNA örneklerinin sonuçları göstermektedir. 8.5×10^7 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kontamine edilmemiş örnekten elde edilen DNA ile de kontamine edilmiş örneklerin pozitifliği doğrulanmıştır. Bunlara ek olarak izolasyon işlemine tabi tutulmuş dH₂O ile de reaksiyonun negatifliği kontrol edilmiştir. Görüntüler FAM kanalından alınmıştır. Şekil 3.5 (b)'de HEX kanalı ile internal kontrol amplifikasyonu kontrol edilmiştir. Yeşil noktalar internal kontrolden elde edilen sinyallere aittir. Çizelge 3.8 ddPCR çalışma sonuçlarını içermektedir (Öz ve diğ, 2020). Diğer yandan kontamine edilmiş örnekler için inkübasyon devam ettirilerek bir gece büyümeye bırakılmış daha sonra pozitiflikleri tekrar kontrol edilmiştir. 0.85 kob/25 g örnekte bir pozitiflik saptanamamıştır. Bu durum ddPCR çalışması ile de doğrulanmıştır. Şekil 3.6'da çalışmaya ait görüntü sunulmuştur (Öz ve diğ, 2020). Şekil 3.6 (a) 85, 8.5, 0.85 kob/ml bakteri ile kontamine edilmiş ve bir gece büyümeye bırakılmış örneklerin ddPCR sonuçları ile birlikte kontamine edilmeden bir gece büyütülen kontamine edilmemiş örneğin ddPCR sonucunu, Şekil 3.6 (b) çalışmaya ait HEX kanalından alınan ve internal kontrol artışına ait ddPCR sonucunu

göstermektedir. Çizelge 3.9’da ddPCR çalışmasından elde edilen sonuçlar sunulmuştur (Öz ve diğ, 2020). Çalışmada florasın ışıma yoğunluğunda artış olmasına rağmen pozitif ve negatif dropletler arasındaki ayırım belirsiz gözükmemektedir. Özellikle 8.5 kob bakteri içeren ve 3 ve de 5 saatlik ön zenginleştirmeye tabi tutulmuş örnekler için net olarak ayırım elde edilememiştir. 1 saat inkübe edilmiş örnekte bahsedilen ayırımın daha iyi gözlemlenmesine rağmen, deneyin hassas olması ayırım gücünün daha önünde bir seçenek olarak değerlendirilmiştir. 8.5 kob bakteri içeren örnekten gelen bilgilere dayanarak kontamine kıyma örnekleri için 3 veya 5 saat inkübasyonun çalışma için yüksek hassasiyeti sağlayabileceği üzerinde durularak mümkün olan minimum gerekli sürenin 3 saat olduğu kanısına varılmıştır.

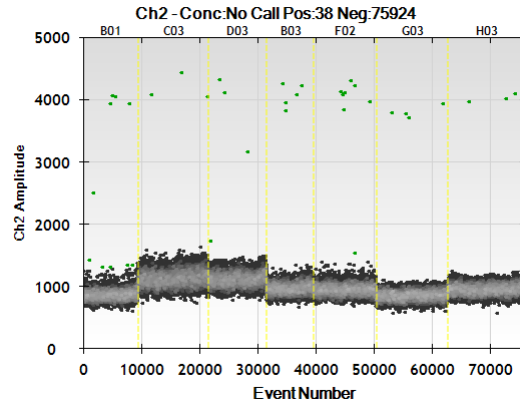


Şekil 3.5 : *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu ile kontamine edilen 25 g kıyma örneğinden 1-3-5 saat inkübasyon ile ddPCR sonuçları.

Pozitif ve negatif dropletler arasındaki ayırımın zorluğundan dolayı eşik çizgisi negatif dropletlerin daha yukarısına ayarlanmıştır. Ayırımı iyileştirmek adına başka bir deney planlanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 3.6 : Bir gece inkübasyona devam eden *Salmonella* ile kontamine örneklerin ddPCR sonuçları.

Çizelge 3.8 : 1-3-5 saat ön inkübasyona tabi tutulan örneklerin ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
*8.5x10 ⁷ kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA (Pozitif Kontrol)	1000000	6130	0	6130
850 kob bakteri ile kontamine 1 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	58.1	864	15901	16765
85 kob bakteri ile kontamine 1 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	2.97	45	16636	16681
8.5 kob bakteri ile kontamine 1 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.133	2	16567	16569
0.85 kob bakteri ile kontamine 1 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.0634	1	17344	17345
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	962	9121	6519	15640
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	207	2863	13822	16685
8.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	7.77	97	13668	13765
0.85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.0992	1	11076	11077
Kontamine edilmemiş örneğin 3 saat ön zenginleştirilmesi ile elde edilen DNA	0.0745	1	14752	14753
850 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	1890	10108	2195	12303
85 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	6560	14446	37	14483

Çizelge 3.8 (devam) : 1-3-5 saat ön inkübasyona tabi tutulan örneklerin ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
8.5 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	229	2722	11744	14466
0.85 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.0699	1	15715	15716
Kontamine edilmemiş 25 g örneğin 5 saat ön zenginleştirilmesi ile elde edilen DNA	0	0	6886	6886
dH ₂ O	0	0	15382	15382
dH ₂ O	0	0	14206	14206

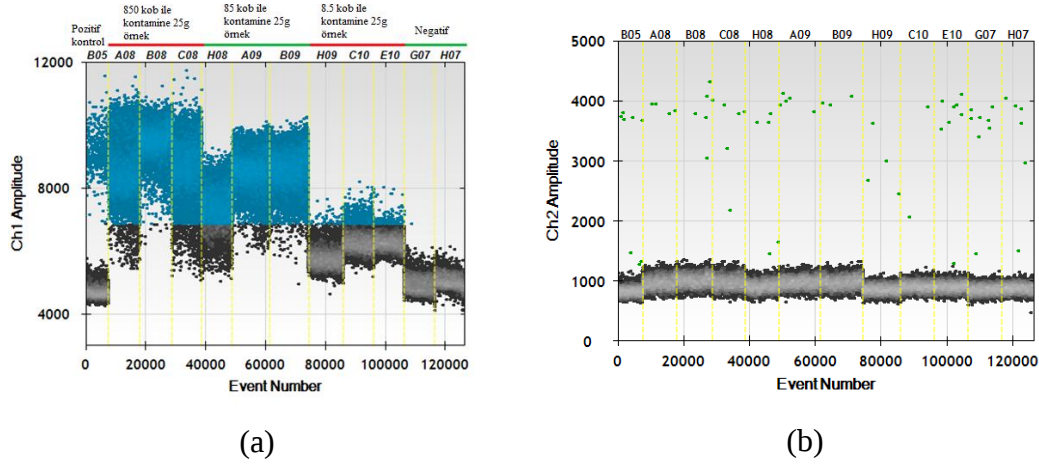
* Bu örnek sonucu droplet sayısı nedeniyle kabul edilmemiştir.

Çizelge 3.9 : Şekil 3.6'ya ait ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
8.5x 10 ⁴ kob bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA (Pozitif Kontrol)	12.6	108	9346	9454
85 kob bakteri ile kontamine edilerek bir gece inkübe edilmiş 25 g örnekten elde edilen DNA	6220	12011	42	12053
8.5 kob bakteri ile kontamine edilerek bir gece inkübe edilmiş 25 g örnekten elde edilen DNA	8610	10089	4	10093
0.85 kob bakteri ile kontamine edilerek bir gece inkübe edilmiş 25 g örnekten elde edilen DNA	0	0	8034	8034
dH ₂ O	0	0	12370	12370
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0	0	13133	13133

İkinci ön hassasiyet deneyinde küçük miktarları belirlemek ve duyarlılığı arttırmak üzere izole edilen ve 50 μl de geri alınan DNA'nın tamamını kullanabilmek üzere DNA'nın liyofilize edilerek 5 μl moleküler grade su içerisinde çözündürülmesi bu çözeltinin tamamının reaksiyonda kullanılması planlanmıştır. Bunun için 850, 85 ve 8.5 kob/ml bakteri içeren dilüsyonlarla kontamine edilen 25 g kıyma örneği 3 saat inkübe edilerek üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Aşağıda ilgili çalışmaya ait görüntü Şekil 3.7'de verilmiştir (Öz ve diğ., 2020). Deney sonucunda negatif dropletlerin pozitiflerden ayrımının daha da zor olduğu görülmüştür. 8.5x10⁵ kob/ml bakteri dilüsyonu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Fakat droplet sayısı nedeniyle değerlendirme diğer sonuçlarla birlikte yapılmıştır. Çalışmaya reaksiyon negatif kontrolü olarak izole dH₂O örneği eklenmiştir. Şekil 3.7 (a) bu çalışmaya ait görüntüyü

gösterirken Şekil 3.7 (b) çalışmaya ait internal kontrol artışlarını göstermektedir. Bu çalışmaya ait ddPCR sonuçları Çizelge 3.10’da sunulmuştur (Öz ve diğ., 2020).



Şekil 3.7 : *Salmonella* ile kontamine edilen örneklerden 3 saat inkübasyon sonrası elde edilen DNA’nın liyofilize edilerek kullanılması.

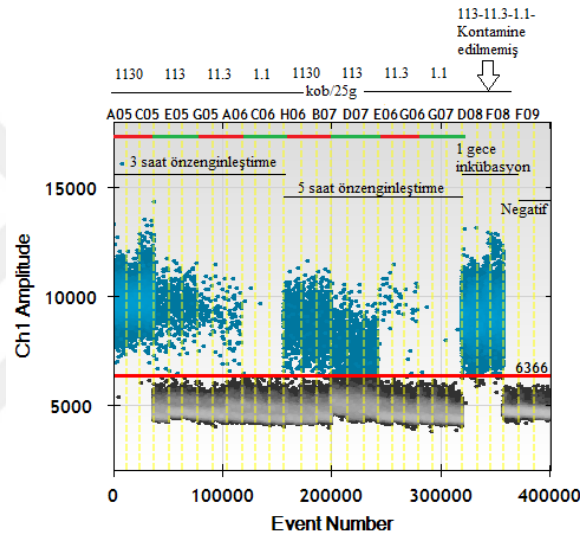
Çizelge 3.10 : 850, 85 ve 8.5 kob/ml bakteri içeren dilüsyonlarla kontamine edilen 25 g kıyma örneğinin 3 saat inkübe edilerek elde edilen DNA’nın liyofilizasyon ile tamamının kullanılması.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
*8.5x 10 ⁵ kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA (Pozitif Kontrol)	52.5	365	7466	7831
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	4150	10101	236	10337
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	7690	10960	10	10970
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	3630	9462	360	9822
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	1660	7956	2253	10209
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	5050	12397	127	12524
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	5550	12918	83	13001
8.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	4.39	46	11493	11539
8.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	23	212	10011	10223
8.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	4.68	43	10080	10123
dH ₂ O	0.107	1	10239	10240
dH ₂ O	0	0	9766	9766

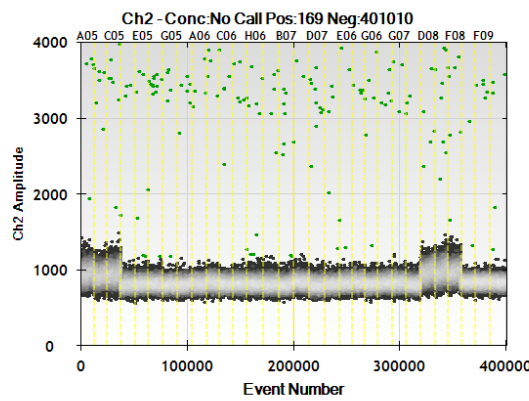
*Pozitif kontrol’ün toplam droplet sayısı kabul kriterlerinin dışında çıkmıştır. Bu deney için pozitif ve negatif dropletlerin ayrımı önemli olduğundan diğer sonuçlar da gözönüne alınarak bir değerlendirme yapılmıştır.

Deneyde elde edilen sonuçlar için negatif ve pozitif dropletlerin birbirinden ayrılma zorluğu nedeniyle yeni planlanacak deneyden liyofilize edilen DNA’nın 15 μl dH₂O ile dilüe edilmesine ve bu DNA’nın tamamının 3’lü olarak çalışılmasına karar verilmiştir. 1130, 113, 11 ve 1.1 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyonlarla kontamine

edilen 25 g kıyma örneği 3 ve 5 saat inkübasyona tabi tutularak çalışma yapılmıştır. Kontamine edilmeden bir gece büyütülen örnekten elde edilen DNA da reaksiyona eklenmiştir. İzolasyona tabi tutulan dH₂O örneği reaksiyon negatif kontrolü olarak reaksiyona dahil edilmiştir. Çalışmaya ait görüntü Şekil 3.8 (a)'da verilmiştir (Öz ve diğ, 2020). Şekil 3.8 (b) bu çalışmaya ait internal kontrol artışlarını göstermektedir. ddPCR sonuçları ise Çizelge 3.11'de sıralanmıştır (Öz ve diğ, 2020). Çalışma sonucunda kabul edilebilir bir ayırım elde edilmiştir. 5 saatlik inkübasyon ile bu ayırım biraz daha zor gözükmeyle birlikte göz ardı edilebilir. Bu ayırım zorluğunun kültürlenmeye bağlı olarak bakteri kütesinin artmasıyla ortamda biriken inhibitörlerle ilişkili olma ihtimali vardır (Rossen ve diğ, 1992; Wilson, 1997; Dingle ve diğ, 2013).



(a)



(b)

Şekil 3.8 : 3 ve 5 saat inkübe edilen örneklerden elde edilen DNA'nın 15 µl dH₂O ile sulandırılarak üç kuyucukta çalışılması.

Çizelge 3.11 : 1130-113-11.3 ve 1.1 kob/ml bakteri ile kontamine edilen 25 g kıyma örneğinin 3 ve 5 saat ön inkübasyondan sonra elde edilen ddPCR sonuçları.

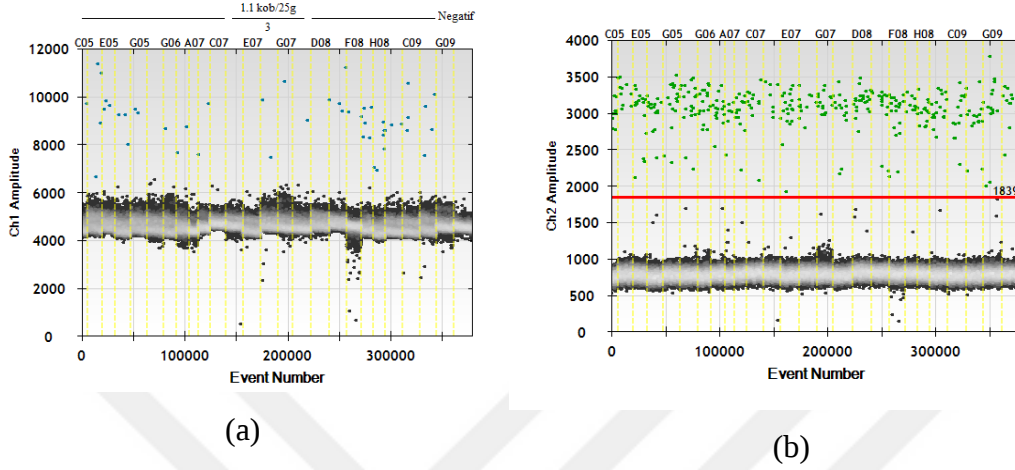
Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
1130 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	10400	12652	1	12653
1130 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	1000000	12303	0	12303
1130 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	9220	13161	3	13164
113 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	15	178	12959	13137
113 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	16	180	12239	12419
113 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	15.1	192	13902	14094
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	4.41	55	13663	13718
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	3.85	47	13409	13456
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	4.09	51	13679	13730
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.535	6	12328	12334
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.179	2	12283	12285
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.0828	1	13273	13274
1130 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	37.2	531	15440	15971
1130 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	44.4	554	13441	13995
1130 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	45.6	569	13417	13986
113 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	33.3	448	14540	14988
113 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	27.8	357	13958	14315
113 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	31.4	386	13327	13713

Çizelge 3.11 (devam) : 1130-113-11.3 ve 1.1 kob/ml bakteri ile kontamine edilen 25 g kıyma örneğinin 3 ve 5 saat ön inkübasyondan sonra elde edilen ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
11.3 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	1.82	21	12697	12718
11.3 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	1.27	13	11228	11241
11.3 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	1.31	15	12540	12555
1.1 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.166	2	13242	13244
1.1 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.0833	1	13189	13190
1.1 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA	0.0784	1	14025	14026
113 kob bakteri ile kontamine edilerek bir gece inkübe edilmiş 25 g örnekten elde edilen DNA	8670	13391	5	13396
11.3 kob bakteri ile kontamine edilerek bir gece inkübe edilmiş 25 g örnekten elde edilen DNA	8040	12083	8	12091
1.1 kob bakteri ile kontamine edilerek bir gece inkübe edilmiş 25 g örnekten elde edilen DNA	8850	12589	4	12593
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0	0	13418	13418
dH ₂ O	0	0	13993	13993
dH ₂ O	0	0	15179	15179

Yapılan çalışma sonucunda 3 saatlik inkübasyonun ön zenginleştirme için en uygun seçenek olduğu kanısına varılarak hassasiyet çalışması yapılmıştır. 1.1 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyon ile çoklu deney planlanmıştır. Bu bakteri dilüsyonu ile kontamine edilen örnekten 8 liyofilize numune alınarak 15 μl dH₂O'da çözündürülmüş ve her reaksiyon için 5 μl DNA kullanılarak DNA'nın tamamı 3'lü çalışma için harcanmıştır. Her 3'lü çalışmadaki herhangi bir pozitifliğin var olup olmadığı araştırılmıştır. Bütün örnekler pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif droplete sahip örnekler belirlenmiştir. Çalışmaya ait ddPCR görüntüsü Şekil 3.9 (a)'da verilmiştir. Çalışılan 9 örneğin 8'i ddPCR çalışma sonucu kabul kriterlerine uygun sonuç vermiştir. Çalışmaya ait HEX kanalından alınan internal kontrol artışını gösteren ddPCR sonuçları ise Şekil 3.9 (b)'de verilmiştir. Çizelge 3.12 ise ddPCR çalışmasına

ait sonuçları içermektedir. Hassasiyeti belirlemek üzere 850, 85 ve 11 kob/ml bakteri dölüsyonları ile kontamine edilmiş ve 3 saat inkübe edilmiş örneklerden gelen ddPCR sonuçları da probit analizi için eklenmiştir. Çizelge 3.13 de bu sonuçlar topluca gösterilmiştir. Çizelge 3.14 ise çalışmaya ait probit analiz sonucunu göstermektedir.



Şekil 3.9 : 1.1 kob/ml bakteri dölüsyonu ile kontamine örneklerin 3 saatlik inkübasyonundan sonra DNA'nın ddPCR'da üç reaksiyonda çalışılması (Öz ve diğ, 2020).

Çizelge 3.12 : Duyarlılık deneyine ait ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/µl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	0	0	6100	6100
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	0.385	5	14254	14259
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	0.267	3	12328	12331
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	0.211	3	15592	15595
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	0.143	2	15368	15370
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	0	0	16399	16399
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	0.0895	1	12279	12280
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	0.171	2	12871	12873
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	0.126	1	8712	8713

Çizelge 3.12 (devam) : Duyarlılık deneyine ait ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	0.0983	1	11175	11176
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	0	0	15693	15693
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	0	0	16100	16100
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	0	0	17652	17652
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	0.134	2	16422	16424
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	0.0753	1	14602	14603
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	0.0615	1	17863	17864
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	0.0626	1	17559	17560
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	0.196	3	16783	16786
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	0.0763	1	14396	14397
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	0.573	6	11499	11505
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	0.676	7	11377	11384
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	0.129	2	16981	16983
1.1 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	0.195	3	16940	16943
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0.278	4	15828	15832
dH ₂ O	0	0	16851	16851
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0	0	17690	17690

Çizelge 3.13 : Probit analizi için 850, 85 and 11 kob/ml bakteri ile kontamine edilerek 3 saat inkübe edilen örneklerden elde edilen ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
*8.5x 10 ⁵ kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA (Pozitif Kontrol)	52.2	370	7604	7974
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	3880	10235	310	10545
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	4760	12629	168	12797
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	7430	11239	13	11252
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	5160	13072	121	13193
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	3430	9627	444	10071
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	5030	11373	118	11491
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	3120	9355	581	9936
850 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	10000	9043	1	9044
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	1110	6318	3599	9917
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	1810	6692	1598	8290
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	857	7109	6015	13124
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	5180	10422	94	10516
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	1590	8293	2553	10846
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	5290	9516	78	9594
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	1380	7486	2965	10451
85 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	6010	9676	41	9717
dH ₂ O	0	0	10327	10327
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0	0	9887	9887

Çizelge 3.13 (devam) : Probit analizi için 850, 85 and 11 kob/ml bakteri ile kontamine edilerek 3 saat inkübe edilen örneklerden elde edilen ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	4.32	55	13968	14023
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	3.61	45	13675	13720
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	3.87	49	13892	13941
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	1.8	21	12775	12796
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	1.37	14	11211	11225
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	1.11	13	12810	12823
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0	0	10310	10310
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	1.55	18	12736	12754
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	2.23	26	12781	12807
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	1.9	26	15064	15090
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-10	1.19	11	10183	10194
11.3 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-11	0.283	4	15510	15514
dH ₂ O	0	0	16415	16415
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 g örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0	0	17293	17293

*Pozitif kontrol'ün toplam droplet sayısı kabul kriterlerinin dışında çıkmıştır. Bu deney için pozitif ve negatif dropletlerin ayrımı önemli olduğundan diğer pozitif sonuçlar da gözönüne alınarak bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 3.14 : ddPCR çalışmasında hassasiyet deneyine ait probit analiz sonucu.

Gözlem	25 g Örnek için Konsantrasyon	Test Edilen Örnek Sayısı	Pozitif Bulunan Örnek Sayısı
1	850 kob	8	8
2	85 kob	8	8
3	11 kob	11	11
4	1.1 kob	9	8

Çizelge 3.14 (devam) : ddPCR çalışmasında hassasiyet deneyine ait probit analiz sonucu.

Olasılık	Konsantrasyon
0.01	0.1516
0.05	0.2219
0.10	0.2718
0.20	0.3476
0.30	0.4150
0.40	0.4828
0.50	0.5562
0.60	0.6408
0.70	0.7455
0.80	0.8901
0.90	1.1381
0.95	1.3942
0.99	2.0401

25 g çiğ kıyma örneğinde ddPCR çalışması için %95 güvenilir aralıkta saptanan hassasiyet değeri 1.39 kob olarak bulunmuştur. Materyal metot kısmında bahsi geçen kabul kriterleri çerçevesinde sonuçlar değerlendirilmiştir.

Real Time-PCR çalışması için 25 g kıyma örneği 605, 60.5, 6.05 kob/ml örnek ile kontamine edilerek 3 saatlik inkübasyona tabi tutulmuş ve izole edilen DNA 8’li tekrar halinde çalışılmıştır. Hassasiyet probit analizi ile hesaplanmıştır. 25 g kıyma örneği için %95 güven aralığı ile Real Time-PCR çalışmasında hassasiyet 130 kob olarak bulunmuştur. Çalışma sonucu Çizelge 3.15’te verilmiştir (Öz ve diğ, 2020). Probit analizi Çizelge 3.16’da verilmiştir (Öz ve diğ, 2020).

Çizelge 3.15 : Real Time-PCR çalışması için hassasiyet çalışması.

Kuyucuk	Örnek	Fluorescence	Ct Değeri	Test Sonucu
A3	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	FAM HEX	33.11 33.27	Pozitif Pozitif
C9	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	FAM HEX	32.91 33.34	Pozitif Pozitif
C10	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	FAM HEX	32.80 33.61	Pozitif Pozitif
C11	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	FAM HEX	33.07 33.22	Pozitif Pozitif
A5	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	FAM HEX	35.96 32.95	Pozitif Pozitif
A6	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	FAM HEX	36.18 34.04	Pozitif Pozitif
A7	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	FAM HEX	38.01 33.80	Pozitif Pozitif

Çizelge 3.15 (devam): Real Time-PCR çalışması için hassasiyet çalışması.

Kuyucuk	Örnek	Fluorescence	Ct Değeri	Test Sonucu
A8	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	FAM	37.21	Pozitif
A9	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	HEX	33.90	Pozitif
A10	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	FAM	-	Negatif
A11	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	HEX	34.01	Pozitif
A12	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	FAM	-	Negatif
B3	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	HEX	34.24	Pozitif
B4	60.5 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-10	FAM	-	Negatif
C4	Negatif Kontrol	HEX	34.07	Pozitif
C5	Negatif Kontrol	FAM	-	Negatif
A3	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	HEX	34.02	Pozitif
C5	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	FAM	-	Negatif
C6	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	HEX	34.55	Pozitif
C7	605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	FAM	32.03	Pozitif
C3	Negatif Kontrol	HEX	32.93	Pozitif
C4	Negatif Kontrol	FAM	32.43	Pozitif
A1	Pozitif Kontrol	HEX	32.97	Pozitif
A4	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	FAM	32.28	Pozitif
A5	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	HEX	32.75	Pozitif
A6	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	FAM	33.48	Pozitif
A7	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	HEX	33.02	Pozitif
A8	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	FAM	-	Negatif
A10	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	HEX	33.31	Pozitif
A11	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	FAM	-	Negatif
A12	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	HEX	33.41	Pozitif
B11	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	FAM	32.76	Pozitif
B12	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-10	HEX	32.57	Pozitif
C3	Negatif Kontrol	FAM	42.62	Negatif
C4	Negatif Kontrol	HEX	32.73	Pozitif
A1	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	FAM	-	Negatif
A2	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	HEX	33.15	Pozitif
A3	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	FAM	44.64	Negatif
A4	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	HEX	32.95	Pozitif
A5	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	FAM	-	Negatif
A6	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	HEX	33.02	Pozitif
A7	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	FAM	44.52	Negatif
A8	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	HEX	32.87	Pozitif
A9	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	FAM	-	Negatif
A10	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-10	HEX	33	Pozitif
A11	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-11	FAM	-	Negatif
A12	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-12	HEX	32.93	Pozitif
B1	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	FAM	-	Negatif
B2	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	HEX	32.87	Pozitif
B3	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	FAM	-	Negatif
B4	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	HEX	32.87	Pozitif
B5	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	FAM	-	Negatif
B6	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	HEX	33.14	Pozitif
B7	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	FAM	-	Negatif
B8	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	HEX	32.67	Pozitif
B9	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	FAM	-	Negatif
B10	6.05 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-10	HEX	33.08	Pozitif
C1	Negatif Kontrol	FAM	-	Negatif
C2	Negatif Kontrol	HEX	32.98	Pozitif

Çizelge 3.16 : *Salmonella* Real Time-PCR çalışması için probit analizi.

Gözlem	Konsantrasyon	Test Edilen Örnek Sayısı	Pozitif Bulunan Örnek Sayısı
1	605 kob	8	8
2	60.5 kob	10	4
3	6.05 kob	10	0

Olasılık	Konsantrasyon
0.01	26.0427
0.05	34.3582
0.10	39.8277
0.20	47.6291
0.30	54.1864
0.40	60.5000
0.50	67.0647
0.60	74.3417
0.70	83.0037
0.80	94.4311
0.90	112.9282
0.95	130.9054
0.99	172.7040

3.4 *Salmonella* spp. Tekrarlanabilirlik Deney Sonuçları

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneyleri için optimize edilmiş miktar primer ve prob karışımları ile 3 farklı zamanda primer prob dilüsyonları hazırlanmıştır. LotA, LotB, LotC olarak etiketlenen bu dilüsyonlardan LotA etiketine sahip dilüsyon için 3 farklı kişi tarafından en az 3 tekrarlı çalışma gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan aynı kişi ile üç farklı lota sahip dilüsyonlarla farklı zamanlarda tekrarlı çalışma yapmıştır. Çalışma içi farklılığı belirlemek üzere ise 7 tekrarlı bir deney gerçekleştirilmiştir. Real Time-PCR çalışmaları için 605 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyonla 25 g kıyma örneği kontamine edilmiş ve 3 saat ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş örnekten elde edilen DNA kullanılmıştır. Benzer çalışma ddPCR çalışması için gerçekleştirilmiş olup 6050 kob/ml *Salmonella* spp. içeren örnekten elde edilen ddPCR sonuçları değerlendirilmiştir. Çizelge 3.17’de Real Time-PCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinde elde edilen Ct değerleri sunulmuştur. Çizelge 3.18’de ise çalışmaya ait varyasyon katsayısı hesaplanarak belirlenmiştir. Çizelge 3.19 ve Çizelge 3.20’de ddPCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen değerler sunulmuştur. Çizelge 3.21’de ise bu çalışmaya ait varyasyon katsayısı hesaplanarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.17 : Real Time-PCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinde elde edilen Ct değerleri (Öz ve diğ, 2020).

Örnek	Ct Değeri	Ortalama	Standart Sapma
Çalışma Günü: 1 - Kişi No: 1 - Parti: A			
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	30.84	31.3475	0.74625
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	30.58		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	31.91		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	32.06		
Çalışma Günü: 2 - Kişi No: 2 - Parti: A			
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	29.27	29.71	0.40233
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	29.47		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	30.01		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	30.09		
Çalışma Günü: 3 - Kişi No: 1 - Parti: C			
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	30.21	30.5875	0.38038
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	30.4		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	31.09		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	30.65		
Çalışma Günü: 4 - Kişi No: 3 - Parti: A			
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	29.02	29.125	0.12793
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	29.02		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	29.28		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	29.18		
Çalışma Günü: 5 - Kişi No: 1 - Parti: B			
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	28.86	28.89	0.28542
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	29.14		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	29.06		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	28.5		
Çalışma Günü: 5 (Çalışma içi dahil) - Kişi No: 1 - Parti: B			
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	29.14	28.7071	0.38274
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	29.06		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	28.5		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	28.55		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	28.04		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	28.72		
605 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	28.94		

Çizelge 3.18 : Real Time-PCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen değerler (Öz ve diğ, 2020).

<i>Salmonella</i>	Çalışma İçi Değişkenlik N=7	Lotlar Arası Değişkenlik N=3	Uygulayıcılar Arası Değişkenlik N=3	Toplam Çalışmalar Arası Değişkenlik N=5
Standart Sapma	0.38	1.17	1.08	1.02
Değişim Katsayısı [%]	1.33	3.86	3.59	3.41

Çizelge 3.19 : ddPCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen ddPCR sonuçları(Öz ve diğ, 2020).

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
Tekrarlanabilirlik Testi 1				
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	3500	13555	585	14140
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	3630	12625	482	13107
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	2590	13039	1369	14408
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0	0	5032	5032
Tekrarlanabilirlik Testi 2				
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	10100	10166	1	10167
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	7810	11019	9	11028
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	9050	7561	2	7563
Tekrarlanabilirlik Testi 3				
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	4840	9553	118	9671
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	9440	10733	2	10735
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	4360	7954	154	8108
Tekrarlanabilirlik Testi 4				
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	9160	12553	3	12556
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	1000000	12520	0	12520
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	8920	13459	4	13463

Çizelge 3.19 (devam) : ddPCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
Tekrarlanabilirlik Testi 5 + Çalışma içi değişkenlik				
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	4930	10426	119	10545
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	9490	11250	2	11252
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	4510	9905	166	10071
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	4020	9681	255	9936
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	3190	7836	454	8290
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	6330	10483	33	10516
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	6730	9573	21	9594
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	3140	9850	601	10451
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	6650	12767	30	12797

Çizelge 3.20 : ddPCR çalışması için Çizelge 3.19'a ait ek bilgiler.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Log Ortalama	Standart Sapma
Çalışma Günü: 1 - Kişi No: 1 - Parti: A			
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	3500		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	3630	3.506	0.081
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	2590		
Çalışma Günü: 2 - Kişi No: 2 - Parti: A			
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	10100		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	7810	3.951	0.056
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	9050		
Çalışma Günü: 3 - Kişi No: 1 - Parti: C			
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	4840		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	9440	3.766	0.182
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	4360		

Çizelge 3.20 (devam) : ddPCR çalışması için Çizelge 3.19'a ait ek bilgiler.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Log Ortalama	Standart Sapma
Çalışma Günü: 4 - Kişi No: 3 - Parti: A			
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	9160	3.956	0.008
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	8920		
Çalışma Günü: 5 - Kişi No: 1 - Parti: B			
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	4930	3.775	0.176
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	9490		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	4510		
Çalışma Günü: 5 (intraassay dahil) - Kişi No: 1 - Parti: B			
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-1	4930	3.711	0.161
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-2	9490		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-3	4510		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-4	4020		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-5	3190		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-6	6330		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-7	6730		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-8	3140		
6050 kob bakteri ile kontamine 3 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 g örnekten elde edilen DNA-9	6650		

Çizelge 3.21 : ddPCR çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen değişkenlik katsayıları.

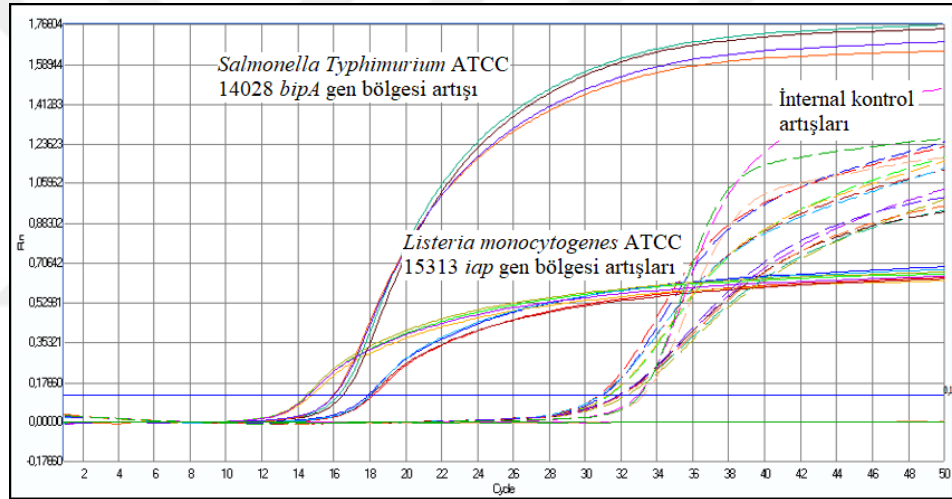
<i>Salmonella</i>	Çalışma İçi Değişkenlik N=9	Lotlar Arası Değişkenlik N=3	Uygulayıcılar Arası Değişkenlik N=3	Toplam Çalışmalar Arası Değişkenlik N=5
Standart Sapma	0.16	0.19	0.24	0.20
Değişim Katsayısı [%]	4.36	5.10	6.24	5.30

Çizelge 3.21'de yer alan değişim katsayılarına göre, en az değişkenliğin olduğu çalışma içi varyasyon olduğu görülmektedir. En fazla değişkenlik ise operatörler (uygulayıcılar) arası çalışmada görülmektedir.

3.5 *Listeria monocytogenes* için Primer-Prob Özgüllüğü

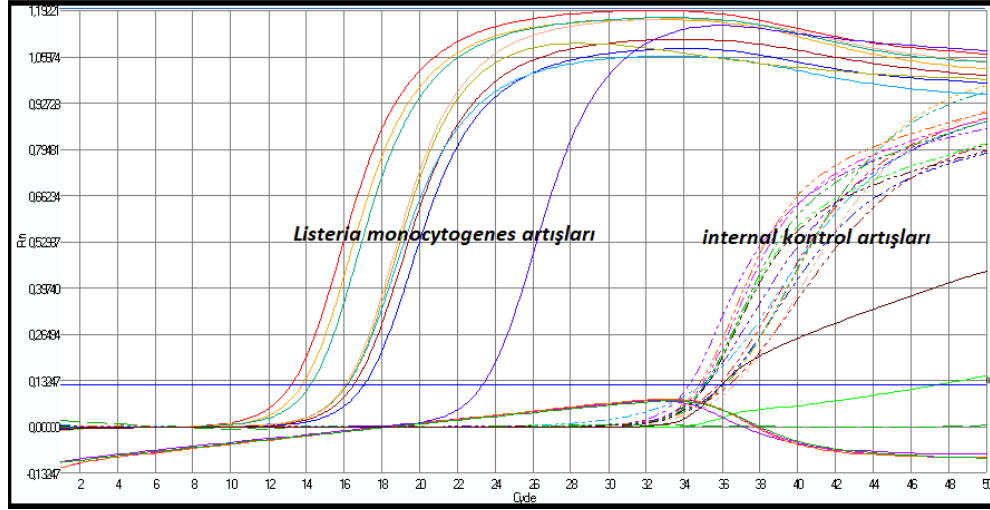
Dizayn aşamasında BLAST analizi ile *in silico* olarak yapılan analizler için çapraz reaktivite yaratabilecek herhangi bir homoloji ile karşılaşılmamıştır. *Listeria*

monoytogenes tanısı için belirlenen iki primer prob bölgesi için ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Real Time-PCR çalışmasında *iap* bölgesi için optimizasyon çalışmaları sırasında diğer bölge çalışmalarına göre artış eğrilerinde zayıflık tespit edilmiştir. Şekil 3.10'da *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşu için *iap* gen bölgesi artış eğrileri ile *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 suşunun *bipA* bölgesi artış eğrileri karşılaştırma çalışması gösterilmiştir. Şekil 3.10'da düz çizgiler *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşu ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu ile ilgili artışları gösterirken kesikli çizgiler internal kontrol artışlarını göstermektedir. *Listeria monocytogenes* için 60 ve 6 ng/μl, *Salmonella* için 60 ng/μl DNA kullanılmıştır. Primer prob konsantrasyonları ile yapılan farklı çalışmalarda bu zayıflık düzeltilememiştir. Bu nedenle *Listeria* çalışmaları için *inlA* gen bölgesi için belirlenen optimize reaksiyon şartları ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 3.10 : *Salmonella spp. bipA* ve *Listeria monocytogenes iap* gen bölgesi Real Time-PCR artış eğrilerinin karşılaştırılması.

Tür içi çapraz reaktivite testi için 14 *Listeria spp.* türü için DNA izolatları denenmiştir. Bunlardan 10 tanesi *Listeria monocytogenes* olup 4 tanesi *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* ve alt türü bilinmeyen *Listeria spp.* örneklerine ait DNA'lardır. Çalışma sonucunda sadece *Listeria monocytogenes* türünde artış eğrisi elde edilmiştir. Diğer örneklerde internal kontrol artışları elde edilmesine rağmen FAM kanalından herhangi bir sinyal alınmamıştır. Şekil 3.11'de topluca tür içi çapraz reaktivite sonuçları gösterilmiş olup düz çizgiler *Listeria monocytogenes* artışlarını göstermekte ve kesikli çizgiler internal kontrol artışını göstermektedir. Çizelge 3.22'de örneklerin Ct değerleri ve örnek isimlerine yer verilmiştir.



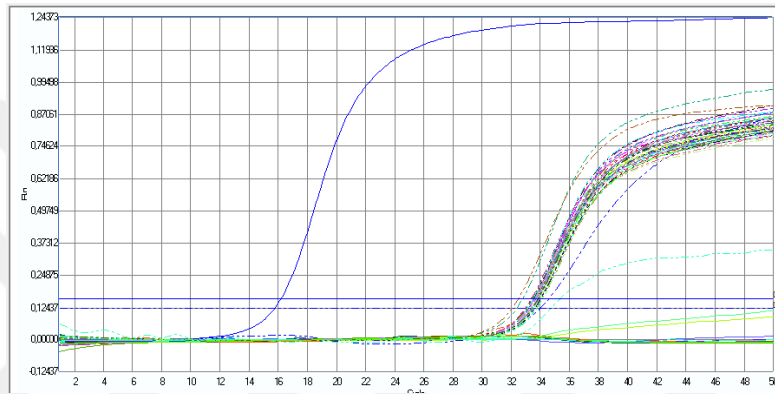
Şekil 3.11 : *Listeria* tür içi çapraz reaktivite çalışması.

Çizelge 3.22 : *Listeria monocytogenes* için Real Time-PCR tür içi çapraz reaktivite çalışma sonuçları.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
B1	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	ATCC 15313	FAM	17.03	Pozitif
			HEX	36.01	Pozitif
B2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7677	ATCC 7677	FAM	13.15	Pozitif
			HEX	35.78	Pozitif
B3	<i>Listeria innouca</i>	L-1	FAM	39.47	Negatif
			HEX	35.11	Pozitif
B4	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-3	FAM	13.71	Pozitif
			HEX	36.20	Pozitif
B5	<i>Listeria welshimeri</i>	L-2	FAM	-	Negatif
			HEX	34.91	Pozitif
B6	<i>Listeria monocytogenes</i>	RSSK 0813	FAM	16.42	Pozitif
			HEX	36.36	Pozitif
B7	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-4	FAM	16.12	Pozitif
			HEX	34.95	Pozitif
B8	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-5	FAM	16.11	Pozitif
			HEX	24.34	Pozitif
B9	<i>Listeria welshimeri</i>	RSSK 5009	FAM	-	Negatif
			HEX	34.22	Pozitif
B10	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-6	FAM	16.04	Pozitif
			HEX	36.65	Pozitif
B11	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-7	FAM	14.16	Pozitif
			HEX	36.11	Pozitif
B12	<i>Listeria spp.</i>	L-10	FAM	-	Negatif
			HEX	34.73	Pozitif
C1	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-8	FAM	35.69	Pozitif
			HEX	35.15	Pozitif
C2	<i>Listeria monocytogenes</i>	L-9	FAM	23.27	Pozitif
			HEX	35.12	Pozitif
C3	dH ₂ O		FAM	-	Negatif
			HEX	35.06	Pozitif

Türler dışı çapraz reaktivite deneyinde pozitif kontrol olarak *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 DNA örneği kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak internal kontrol ile

izole edilmiş dH₂O reaksiyona eklenmiştir. Deney için 132 adet *Listeria monocytogenes* dışı suş kullanılmıştır. Real Time-PCR çalışması yapılmış olup pozitif kontrol dışında herhangi bir artış saptanmamıştır. Negatif örneklerin hepsinde internal kontrol artışı görülmüş olup negatifliğin PCR ya da izolasyondaki herhangi bir sorunla ilişkili olmadığı kanıtlanmıştır. Şekil 3.12’de türler arası bir çapraz reaktivite çalışmasına ait sonuç örnek olarak gösterilmiş olup düz çizgi artışı pozitif kontrol olan *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 örneğine aittir. Kesikli çizgiler internal kontrol artışlarını göstermektedir. Yapılmış üç ayrı tür dışı çalışmaya ait Real Time-PCR çalışma sonuçları Ek B’de gösterilmektedir.

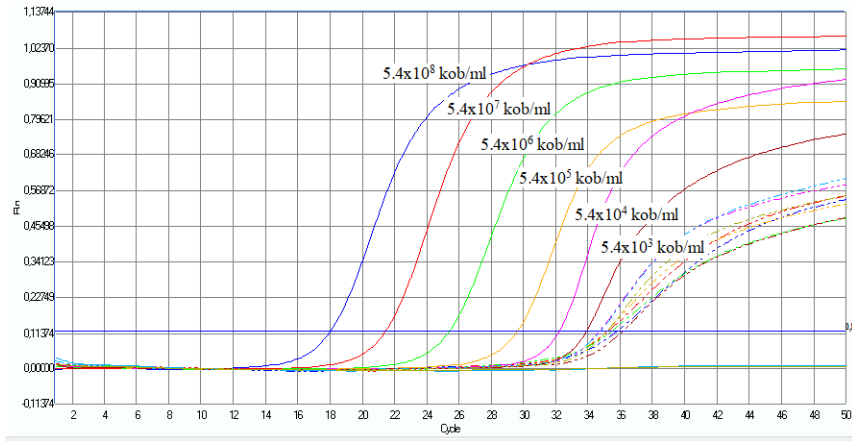


Şekil 3.12 : *Listeria monocytogenes* için Real Time-PCR türler arası çapraz reaktivite testi için örnek gösterim.

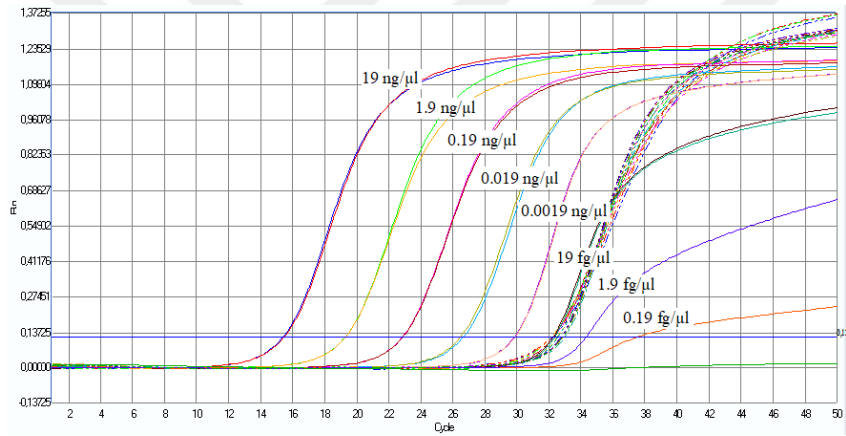
3.6 *Listeria monocytogenes* Doğrusallık Deney Sonuçları

Listeria monocytogenes için Real Time-PCR çalışmasında doğrusallığı belirlemek üzere hem kültürlenmiş bakteriden izole edilen ve 10 katlık farklarla sulandırma serisi hazırlanan DNALAR, hem de kültüre edilmiş bakterinin 10 katlık farklarla hazırlanan sulandırma serilerinden izole edilen DNA’lar iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Çalışılan DNA konsantrasyonları ve bunlara karşılık gelen bakteri sayıları Çizelge 3.23’de belirtilmiş olup Real Time-PCR sonucunda elde edilen Ct sonuçları gösterilmiştir. Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’de belirtilen çalışmalara ait Real Time-PCR çalışma sonuçları gösterilmiştir. Şekil 3.13’de her bir sulandırmaya ait bakteri miktarı şekil üzerinde gösterilmiştir. Düz çizgiler ilgili artışları gösterirken kesikli çizgiler internal kontrol artışını göstermektedir. Şekil 3.14’de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşu ile yapılan bir gecelik kültürlenmeden sonra elde edilen DNA örneğinin doğrusallık deneyi için 10 katlık farklarla sulandırılarak Real Time-PCR’da çalışılması sonrası elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Her bir dilüsyona ait konsantrasyon şekil üzerinde

gösterilmiştir. Düz çizgiler ilgili artışları gösterirken kesikli çizgiler internal kontrol artışını göstermektedir



Şekil 3.13 : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşuna ait kültür örneğinden elde edilen Real Time-PCR doğrusallık deneyi.

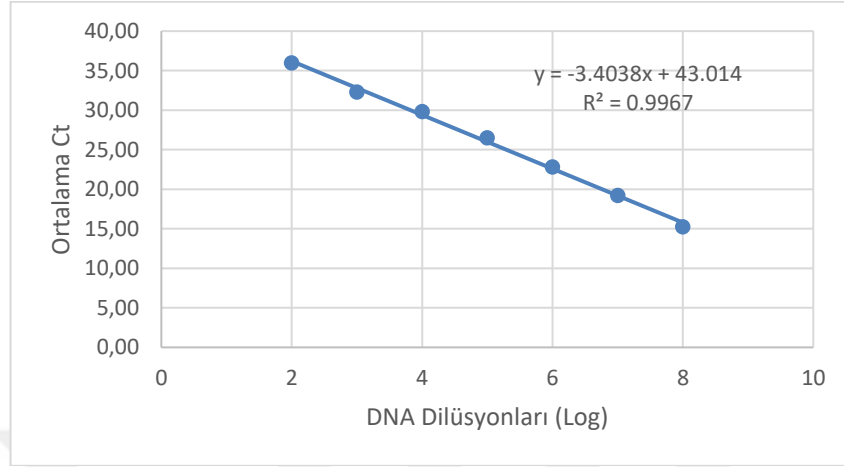


Şekil 3.14 : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşuna ait DNA örneğinden elde edilen Real Time-PCR doğrusallık deneyi.

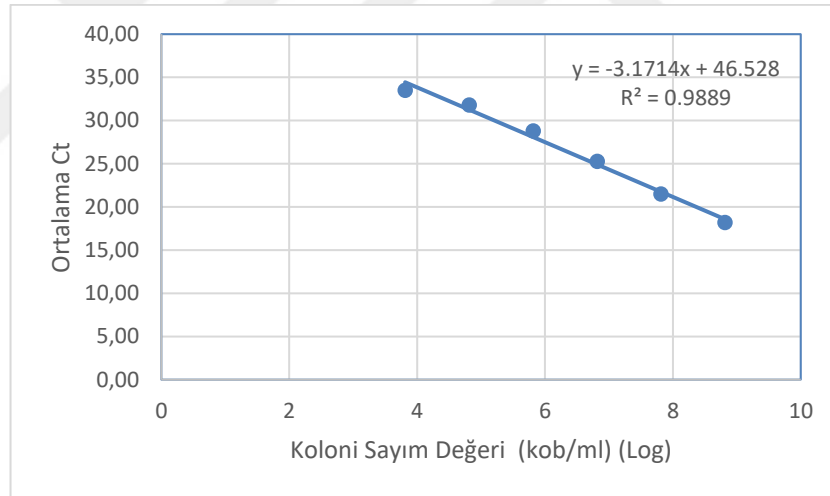
Çizelge 3.23 : *Listeria monoytogenes* doğrusallık çalışması için Real Time-PCR çalışmasına ait Ct değerleri.

DNA Dilüsyonları	19 ng/µl	1.9 ng/ µl	0.19 ng/ µl	0.19 ng/ µl	0.019 ng/ µl	0.00019 ng/ µl	19 fg/ µl	1.9 fg/ µl	0.19 fg/ µl
Ct Değeri1	15.13	19.23	22.82	26.6	29.81	32.39	37.59	-	-
Ct Değeri2	15.40	19.25	22.84	26.41	29.85	32.22	-	-	-
Ct Ortalama	15.265	19.24	22.83	26.505	29.83	32.305	-	-	-
Koloni Sayım Değeri (kob/ml)	5.4×10^9	5.4×10^8	5.4×10^7	5.4×10^6	5.4×10^5	5.4×10^4	5.4×10^3	540	54
Ct Değeri1	-	18.33	21.62	25.21	28	31.42	33.11	35.27	-
Ct Değeri2	-	18.02	21.38	25.34	29.56	32.17	33.88	-	-
Ct Ortalama	-	18.175	21.5	25.275	28.78	31.795	33.495	-	-

Çalışma sonuçlarında korelasyon R^2 değeri belirlenmiş olup 19 ng/μl-19 fg/μl aralığındaki DNA konsantrasyonu için 0.9967 (Şekil 3.15), 5.4×10^8 -5400 kob/ml aralığındaki bakteri sayısı için 0.9889 (Şekil 3.16) olarak bulunmuştur.



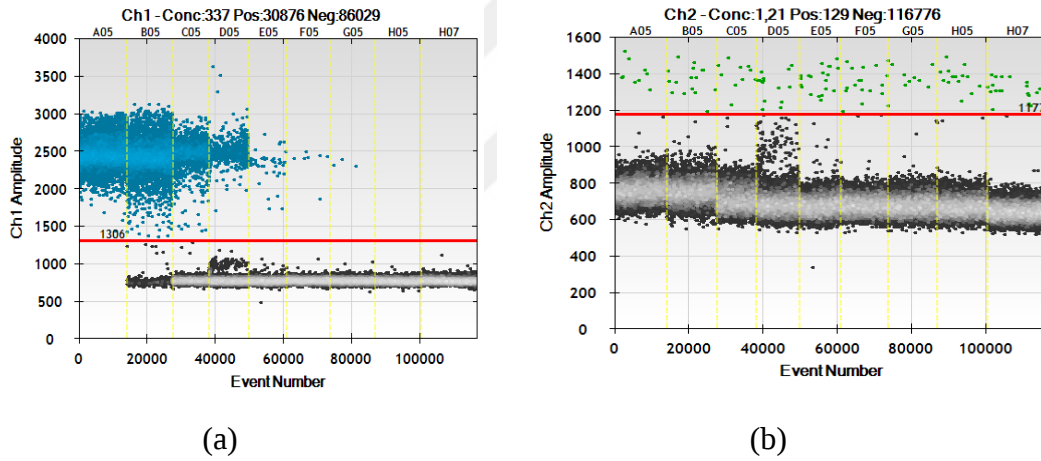
Şekil 3.15 : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313'e ait DNA dilüsyonu ile Real Time-PCR doğrusallık grafiği.



Şekil 3.16 : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313'e ait kültür dilüsyonu ile Real Time-PCR doğrusallık grafiği.

Bakteri ve DNA dilüsyonları arasında Real Time-PCR sonuçları karşılaştırılmış olup %95 güven aralığında tutarlı bulunmuştur ($p=0.668>0.05$). İzolasyon aşamasında daha düşük konsantrasyonda bakteri ile çalışıldığında önemli derecede DNA kaybı olmadığı sonucuna varılmıştır. Real Time-PCR doğrusallık çalışması aynı zamanda çalışmanın hassasiyeti hakkında ön bilgi vermiş olup hassasiyet çalışmaları için 19 fg/μl veya buna karşılık gelen 5400 kob/ml çevresinde denemelerin yapılabileceği bilgisi elde edilmiştir.

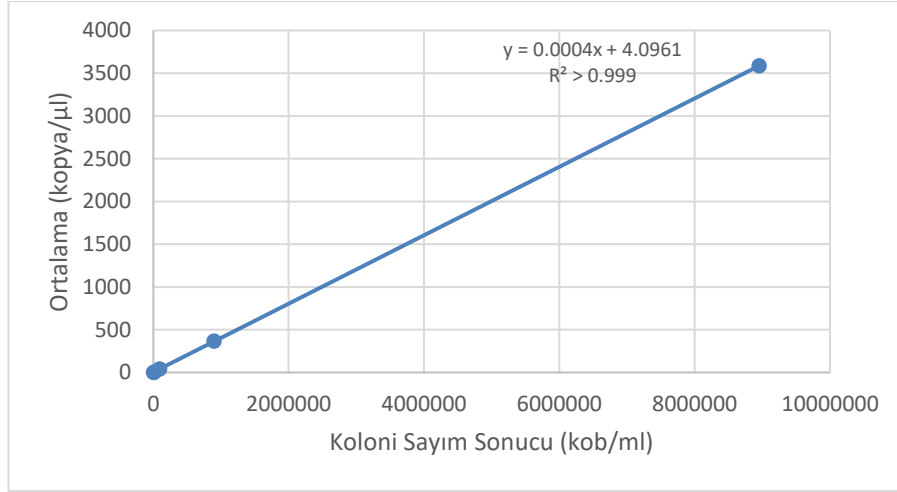
ddPCR *Listeria monocytogenes* çalışması için doğrusallık aralığını belirlemek üzere kültüre edilmiş bakteriden 10 kat farklılıklarla elde edilen dilüsyon serisi kullanılmıştır. İki tekrarlı olarak yapılan çalışma sonucunda yüksek konsantrasyondaki örneklerde satürasyondan dolayı bir ölçüm alınamamıştır. Şekil 3.17 (a) ddPCR çalışma sonucunu göstermektedir. Şekil 3.17 (b) bu çalışmaya ait internal kontrol artışını göstermektedir. Çalışmaya ait ddPCR sonuçları Çizelge 3.24’de verilmiştir. Satüre olmuş örnekler doğrusallık hesaplaması dışında bırakılarak 8.95×10^6 -895 kob/ml arasındaki ölçümler için Şekil 3.18’de verildiği gibi R^2 değeri 1’e yakın olarak ölçülmüştür. Doğrusallık çalışması için 89.5 kob/ml örnek için yapılan iki çalışmadan birinde artış gözlenmiş daha alt sulandırma için ise pozitif bir artış elde edilememiştir. Bu sonuçlar bize ddPCR’ın hassasiyeti hakkında ön fikir vermekte olup hassasiyetin en azından 25 ml örnek için 1 kob/ml olamayacağı bilgisine işaret etmektedir. Sonuçlar 1 ml lik bakteri dilüsyonlarından elde edilmiştir.



Şekil 3.17 : *Listeria monocytogenes* ddPCR doğrusallık çalışmasına ait örnek görüntü.

Çizelge 3.24 : *Listeria monocytogenes* ddPCR doğrusallık çalışma sonuçları.

Koloni Sayım Sonucu (kob/ml)		8.95×10^7	8.95×10^6	8.95×10^5	8.95×10^4	8.95×10^3	8.95×10^2	89.5	8.95	0.895
Deney 1 (kopya/ μ l)	Satüre		3870	354	49.6	4.91	0.607	0.249	0	0
Deney 2 (kopya/ μ l)	Satüre		3300	382	33.5	4.23	0.906	0	0	0
Ortalama	-		3585	368	41.55	4.57	0.7565	-	0	0



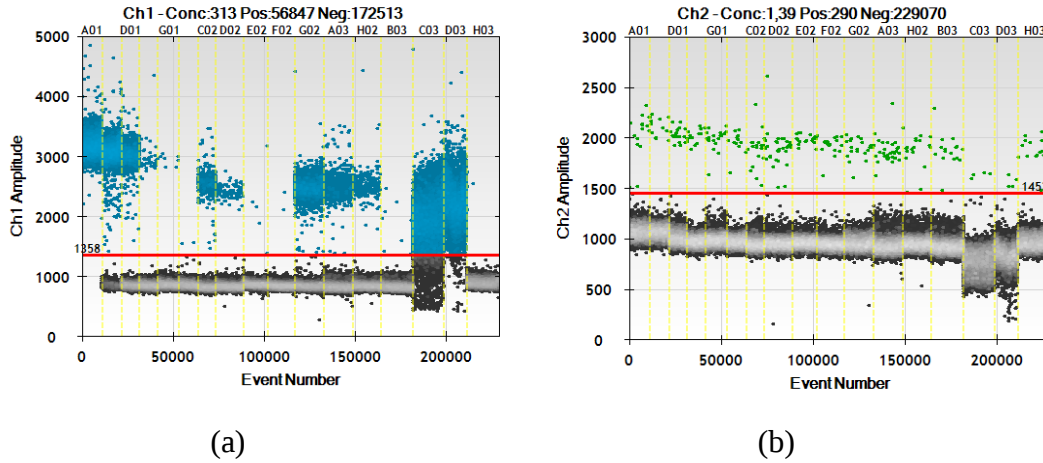
Şekil 3.18 : *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 suşu ile gerçekleştirilen ddPCR doğrusallık grafiği.

3.7 *Listeria monocytogenes* Hassasiyet Deney Sonuçları

Doğrusallık çalışmasından elde edilen ön bilgilere dayanılarak ddPCR çalışması için hassasiyet belirleme çalışmaları planlanmıştır. ddPCR çalışmasında saf kültür ve bu kültürden elde edilen dilüsyonlarda, en düşük 895 kob/ml dilüsyonuna ve bu dilüsyondan 10 kat daha düşük bakteri sayısına sahip örnekten (89.5 kob/ml) elde edilen DNA örnekleri civarında bir artış elde edilmiştir. Daha alt dilüsyonlardan sinyal alınmamıştır. Bu sonuçlar hedefimiz olan 25 ml örnekteki 1 kob veya bu değere oldukça yakın en düşük kontaminasyonu saptama hedefimizden uzaktır. Bu nedenle *Salmonella spp.* çalışmasında olduğu gibi kısa bir ön zenginleştirme aşamasının çalışmaya eklenmesi saptama ile ilgili hassasiyeti arttırabileceği ve canlı-ölü hücre ayrımı ile ilgili karışıklığı ortadan kaldırarak daha güvenilir sonuçlar vereceği kanısını ortaya çıkarmıştır.

Ön zenginleştirme aşamasının 25 ml örnekte olabilecek en düşük seviye olan 1 kopyayı tanıyabilecek uzunlukta bir süre olması ve bu hassasiyeti yakalayabilecek en kısa süre olması öncelikli hedef olarak belirlenmiştir. Bu süreyi belirlemek adına 1.14×10^3 kob/ml, 1.14×10^2 kob/ml, 1.14×10^1 kob/ml ve 1.14 kob/ml bakteri dilüsyonları ile yapay olarak kontamine edilmiş süt örneklerinden 4. ve 5. satte elde edilen DNA izolatları karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Çalışmada seri olarak dilüe edilmiş bakteri örneklerinden 5 ml alınarak çöktürülmüş ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 50 µl DNA izolatından 5 µl örnek alınarak ddPCR çalışmasında sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 3.19). Şekil 3.19 (a)'da gösterilen

ilk 6 örnek direk bakteri dilüsyonlarından elde edilen DNA izolatlarına ait sonuçlardır. Örnekler sırasıyla 1.14×10^8 , 1.14×10^6 , 1.14×10^5 , 1.14×10^3 , 1.14×10^2 , 1.14×10^1 kob/ml dilüsyonlardan elde edilen DNA örnekleri ile çalışılmıştır. Takip eden 4 örnek sırasıyla 1.14×10^3 kob/ml, 1.14×10^2 kob/ml, 1.14×10^1 kob/ml ve 1.14 kob/ml bakteri ile yapay olarak kontamine edilmiş ve 4 saatlik ön zenginleştirme sonucunda 5 ml örnek alınarak çalışılmış örneklerle ait sonuçları göstermektedir. Sonraki 4 örnek yine sırasıyla 1.14×10^3 kob/ml, 1.14×10^2 kob/ml, 1.14×10^1 kob/ml ve 1.14 kob/ml bakteri ile yapay olarak kontamine edilmiş ve 5 saatlik ön zenginleştirme sonucunda 5 ml örnek alınarak çalışılmış örneklerle ait sonuçları göstermektedir. Çalışmada ayrıca pozitifliği göstermek adına her bir dilüsyon derecesi ile kontamine edilen örnekler büyüme işlemine bir gece daha devam ettirilerek ertesi gün DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve diğer örneklerle birlikte çalışılmıştır. Bir gece büyütülen örneklerden 1.14×10^1 kob/ml ve 1.14 kob/ml bakteri ile kontamine edilmiş örneklerle ait çalışmada analiz edilebilecek kadar droplet elde edilemediğinden fiğüre eklenmemiştir. Bu örneklerin pozitifliği direk DNA izolasyonu ve Real Time-PCR çalışması ile doğrulanmıştır. Çalışmaya ayrıca reaksiyon negatif olarak su örneği eklenmiştir. Şekil 3.19 (b) çalışmaya ait internal kontrol artışlarını göstermektedir. Bu çalışmaya ait ddPCR değerleri Çizelge 3.25’de gösterilmiştir.



Şekil 3.19 : *Listeria moocytozenes* ile kontamine edilen örnekleri için ön zenginleştirme süresinin belirlenmesi.

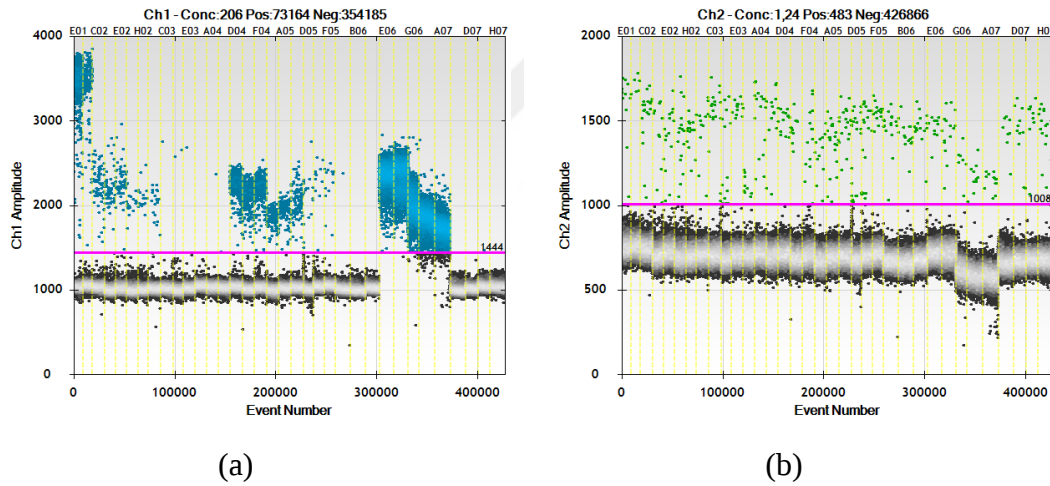
Çizelge 3.25 : *Listeria monocytogenes* için ön zenginleştirme süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan ddPCR çalışma sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
*1.14x10 ⁸ kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	1000000	11391	0	11391
1.14x10 ⁶ kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	2610	9689	994	10683
1.14x10 ⁵ kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	358	2672	6928	9600
1140 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	4.53	43	10420	10463
114 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	0.666	7	11555	11562
11.4 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	0.212	2	10346	10348
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	79.3	693	9257	9950
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	7.08	97	15002	15099
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	0.404	5	13593	13598
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	0.152	2	14423	14425
1140 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	282	3603	12322	15925
114 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	47.7	683	15407	16090
11.4 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	17.9	248	15091	15339
1.14 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	0.559	9	17674	17683
1140 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	2530	15512	1728	17240
114 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	5590	12190	76	12266
Negatif Kontrol (Kontamine edilmemiş 25 ml örneğin bir gece inkübasyonundan sonra elde edilen DNA)	0.0621	1	17697	17698

* Örnek sature olmuştur.

Çalışma 4. saatte artışların elde edilebildiğini ve artışların 5. saatte de devam ettiğini ve 4. saatten itibaren özellikle 1.14 kob/ml bakteri ile kontamine edilen örneğin pozitifliğinin saptanabildiğini göstermektedir. Saptama olasılığını arttırmak üzere 4. ve 5. saate kadar büyütülen örnekler ile yeni bir deney planlanmıştır. Bunun için

sırasıyla 640, 64, 6.4, 0.64 kob/ml bakteri sayısına sahip 1ml örnek ile süt örnekleri yapay olarak kontamine edilerek 4. ve 5. saatlerde örnekleme yapılmıştır. Elde edilen DNA örneği bu çalışmada liyofilize edilerek ve 15 µl dH₂O ile çözündürülmüş ve her bir kuyucukta 5 µl örnek kullanılmak üzere bütün DNA *Salmonella spp.* tanısında olduğu gibi 3 kuyucukta paylaştırılarak çalışılmıştır. Çalışma sonucu Şekil 3.20’de gösterilmektedir. Şekil 3.20 (a) üzerinde sırasıyla kültüre edilen *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 sulandırılması ile elde edilen DNA izolatları pozitif kontrol olarak ilk iki kuyucukta yer almaktadır (6.4×10^3 kob/ml, 6.4×10^2 kob/ml). Takip eden kuyucuklarda 4. saatte alınan örneklemeden elde edilen DNA’ların ve 5. saatte alınan örneklemeden elde edilen DNA’ların 15 µl de çözülmesi ve 3 kuyucuğa paylaştırılması sonucu elde edilen ddPCR sonuçları ve sonrasında bir gece büyümeye devam eden örneklerin sonuçları bulunmaktadır. Şekil 3.20 (b) bu çalışmaya ait internal kontrol artışlarını göstermektedir. Bu çalışmaya ait ddPCR sonuçları Çizelge 3.26’da verilmiştir.



Şekil 3.20 : Kültüre edilen *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 örneklerinden elde edilen DNA’nın liyofilize edilerek üç kuyucukta çalışılması.

Çizelge 3.26 : *Listeria monocytogenes* çalışmasına ait DNA örneklerinin liyofilize edilerek 3 kuyucukta çalışılması ile elde edilen ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/µl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
6.4×10^3 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA (Pozitif Kontrol)	130	1072	8549	9621
6.4×10^2 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA (Pozitif Kontrol)	20.1	176	9522	9698
6.4×10^2 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	6.88	75	11945	12020
6.4×10^2 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	5.35	52	10658	10710

Çizelge 3.26 (devam) : *Listeria monocytogenes* çalışmasına ait DNA örneklerinin liyofilize edilerek 3 kuyucukta çalışılması ile elde edilen ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/µl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
6.4x10 ² kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	6.3	64	11124	11188
64 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	1.78	18	11098	11116
64 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	1.78	16	9895	9911
64 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	2.13	24	12356	12380
6.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0.0891	1	12329	12330
6.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0.216	2	10162	10164
6.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	0.0922	1	11922	11923
0.64 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0.102	1	10782	10783
0.64 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0.092	1	11947	11948
0.64 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	0.0945	1	11633	11634
6.4x10 ² kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	39	425	11774	12199
6.4x10 ² kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	39.7	427	11596	12023
6.4x10 ² kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	41	437	11493	11930
64 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	9.77	107	11982	12089
64 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	9.61	102	11607	11709
64 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	8.17	96	12867	12963
6.4 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	1.74	15	9439	9454
6.4 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	1.1	11	10971	10982

Çizelge 3.26 (devam) : *Listeria monocytogenes* çalışmasına ait DNA örneklerinin liyofilize edilerek 3 kuyucukta çalışılması ile elde edilen ddPCR sonuçları.

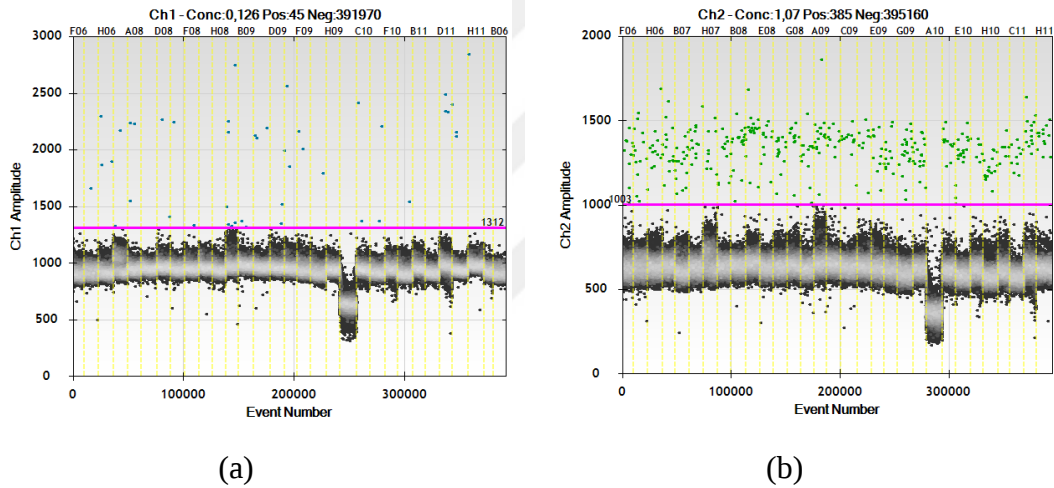
Örnek	Konsantrasyon (kopya/ μ l)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
6.4 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	1.43	14	10760	10774
0.64 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0.0751	1	14624	14625
0.64 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0	0	15530	15530
0.64 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	0	0	13870	13870
6.4x10 ² kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA*-1	1000000	13623	0	13623
6.4x10 ² kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	10500	14667	1	14668
64 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	7860	10180	8	10188
64 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	6380	15596	47	15643
6.4 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	5590	15958	99	16057
0.64 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0	0	12357	12357
0.64 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0	0	14875	14875
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0.0912	1	12050	12051
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0	0	14398	14398

* Örnek sature olmuştur.

6.4 kob/ml kontaminasyona sahip ve bir gece büyümeye bırakılan örneğin ikili çalışmasından birisi için yeteri miktarda droplet oluşmadığından tek çalışma sonucu sunulmuştur. 0.64 kob/ml dilüsyonuna denk gelen sulandırmanın bakteri içermediği, bir gece büyütüldükten sonra pozitif sonuç vermemesi ile kanıtlanmıştır. Çalışma içerisinde en düşük bakteri sayısına sahip bakteri sulandırması (6.4 kob/ml) ile kontamine edilmiş örneğin 4. saatine ait 3'lü çalışmanın birinde pozitiflik elde edilmiştir. Dolayısı ile çalışmada pozitiflik saptanabilmiştir. Aynı örneğin 5. saat çalışmasında ise yine pozitiflik daha fazla pozitif droplet sayısı ile saptanmıştır.

Hassasiyet çalışmasında ölçüm limitini belirlemek üzere 1.14 kob/ml bakteri sulandırması ile kontamine edilen 25 ml süt örneği materyal metot bölümünde

anlatıldığı şekilde kontamine edilerek 4 saat inkübasyonun ardından örnekleme yapılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örneği liyafilizatörde kurutularak 15 µl dH₂O da çözündürülmüş ve 3 ayrı kuyucukta ve her kuyucukta 5 µl olmak üzere tüm DNA kullanılarak ddPCR çalışması gerçekleştirilmiştir. 3 kuyucukta çalışılan DNA'nın herhangi birinde elde edilen pozitiflik o örneğin pozitifliği olarak kabul edilmiştir. Hassasiyet limiti probit analizi ile belirlenmiş bunun için 1.14 kob üzeri örneklerin tekrarlı çalışmaları analize katılmıştır (1140,114,11.4 ve 1.14 kob/ml ile kontamine). Analiz edilen örneklerin ddPCR çalışma sonuçları Ek C'de verilmiştir. Şekil 3.21 (a), 1.14 kob/ml bakteri ile kontamine edilen örneklerin 4 saat inkübe edilmesi ve bu örneklerden elde edilen DNA'nın tekrarlı çalışması sonucu elde edilmiştir. Şekil 3.21 (b) bu çalışmaya ait internal kontrol artışlarını göstermektedir.



Şekil 3.21 : 1.14 kob/ml bakteri ile kontamine örneklerden 4 saat inkübasyon sonrası elde edilen ddPCR çalışması 1D görüntüsü.

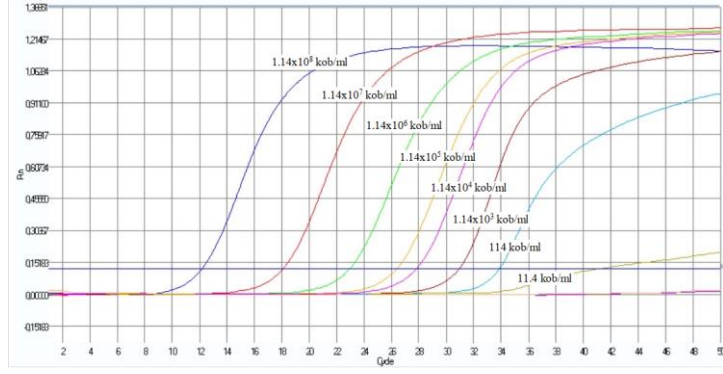
Çizelge 3.27 hassasiyeti belirlemek üzere sayısı belli bakteriler ile yapılan tekrarlı çalışma sayılarını pozitif ve negatiflik miktarlarını ve buna bağlı olarak yapılan probit analizi sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 3.27 : Probit Analizi için tekrarlı çalışmalardan elde edilen sonuçlar.

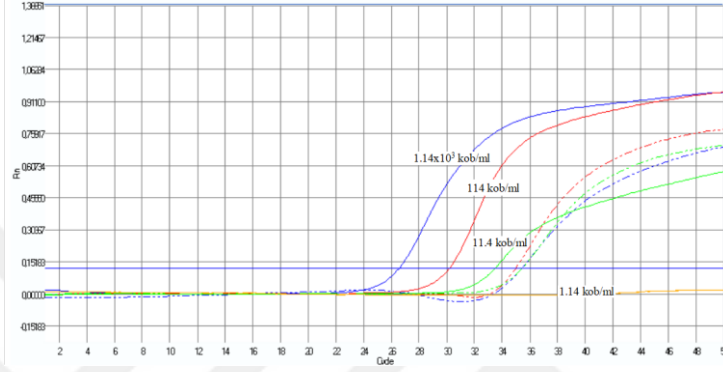
Gözlem	Konsantrasyon (kob)	Test Edilen Örnek Sayısı	Pozitif Bulunan Örnek Sayısı
1	1140	9	9
2	114	8	8
3	11.4	14	14
4	1.14	17	16

Real Time-PCR ve ddPCR çalışması için hassasiyeti karşılaştırmak amaçlı ddPCR'da çalışılan örnekler Real Time-PCR'da çalışılmıştır. ddPCR hassasiyet çalışmasında analiz edilen 1140, 114, 11.4 ve 1.14 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyon ile

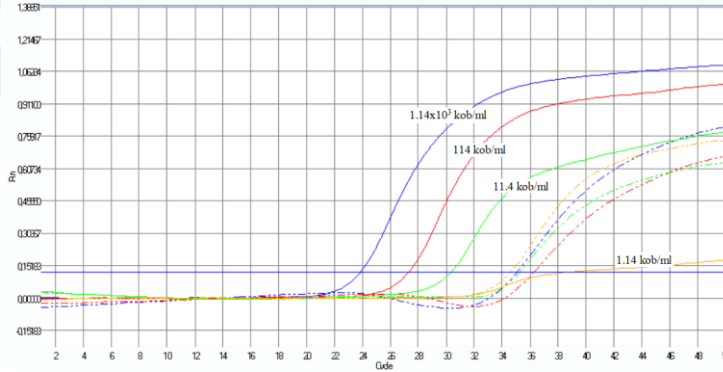
kontamine edilen süt örneklerinin 4. saat ve 5. saat örneklemleri karşılaştırma amaçlı çalışılmıştır. Çalışma için bakteri seri dilüsyonlarından elde edilen DNA'lar da değerlendirmeye alınmıştır. Şekil 3.22 üzerinde çalışma görüntüleri ve izelge 3.28'de çalışmanın Ct değerleri gösterilmiştir. Şekil 3.22 (a) 10 katlık farklarla hazırlanan kültür seri dilüsyon rneklelerinden elde edilen DNA'lara ait olup en düşük artış 114 kob/ml bakteri sayısına ait dilüsyondan elde edilmiştir. 10 kat daha düşük dilüsyondaki (11.4 kob/ml) artış 40. döngüden sonra elde edildiğinden kabul edilebilir aralığın dışında kalmıştır ve artış olarak değerlendirilmemiştir. Şekil 3.22 (b) Yapay olarak kontamine edilmiş ve 4 saat n zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş örnekler için yapılan çalışmaya ait olup 1140, 114, 11.4 kob/ml bakteri sayısına sahip örneklerden artış sinyali alınırken 1.14 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyonla kontamine edilen örneklerden artış sinyali alınamamıştır. Şekil 3.22 (c) 5 saate kadar büyütülmeye devam eden örneklerden elde edilen çalışmaya ait olup beklendiği gibi 4. saate göre daha nde çıkan Ct değerleri ile birlikte 1.14 kob/ml bakteri sayısına sahip örnekle kontamine edilmiş süt örnekleri dahil bütün kontaminasyon seviyelerinde artış sinyali elde edilmiştir. Ancak 1.14 kob/ml ile kontamine edilen örneklerdeki artış çok zayıf olarak tespit edilmiş olup Ct değeri oldukça ileridedir. Çizelge 3.28'den çalışmaya ait Ct değerleri kontrol edilebilir. Çalışmaya bir gece büyütülen örnekler de dahil edilmiştir. Kontaminasyonda kullanılan örneklerin pozitifliği bu örneklerle hem ddPCR hem de Real Time-PCR alıması için doğrulanmıştır.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.22 : *Listeria monocytogenes* için Real Time-PCR hassasiyet çalışması.

Çizelge 3.28 : Hassasiyet karşılaştırma çalışması için Real Time-PCR sonuçları.

Kuyucuk	Örnek Adı	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A1	1.14x10 ⁸ kob/ml bakteri	FAM	12.12	Pozitif
	dilüsyonundan elde edilen DNA	HEX	37.47	Pozitif
A2	1.14x10 ⁷ kob/ml bakteri	FAM	18.05	Pozitif
	dilüsyonundan elde edilen DNA	HEX	35.31	Pozitif
A3	1.14x10 ⁶ kob/ml bakteri	FAM	22.91	Pozitif
	dilüsyonundan elde edilen DNA	HEX	35.06	Pozitif
A4	1.14x10 ⁵ kob/ml bakteri	FAM	26.31	Pozitif
	dilüsyonundan elde edilen DNA	HEX	34.82	Pozitif
A5	1.14x10 ⁴ kob/ml bakteri	FAM	27.75	Pozitif
	dilüsyonundan elde edilen DNA	HEX	36.75	Pozitif
A6	1.14x10 ³ kob/ml bakteri	FAM	30.90	Pozitif
	dilüsyonundan elde edilen DNA	HEX	36.82	Pozitif

Çizelge 3.28 (devam) : Hassasiyet karşılaştırma çalışması için Real Time-PCR sonuçları.

Kuyucuk	Örnek Adı	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A7	1.14x10 ² kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	FAM	33.81	Pozitif
		HEX	35.42	Pozitif
A8	11.4 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	FAM	41.06	Negatif
		HEX	34.76	Pozitif
A9	1.14 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	FAM	-	Negatif
		HEX	34.96	Pozitif
A10	0.14 kob/ml bakteri dilüsyonundan elde edilen DNA	FAM	-	Negatif
		HEX	33.67	Pozitif
A11	1.14x10 ³ kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	26.48	Pozitif
		HEX	35.39	Pozitif
A12	1.14x10 ² kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	30.14	Pozitif
		HEX	34.95	Pozitif
B1	11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	33.43	Pozitif
		HEX	35.39	Pozitif
B2	1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	-	Negatif
		HEX	-	Negatif
B3	1.14x10 ³ kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	23.80	Pozitif
		HEX	35.04	Pozitif
B4	1.14x10 ² kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	27.25	Pozitif
		HEX	36.25	Pozitif
B5	11.4 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	30.27	Pozitif
		HEX	35.22	Pozitif
B6	1.14 kob bakteri ile kontamine 5 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	38.62	Negatif
		HEX	34.56	Pozitif
B7	1.14x10 ³ kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	Ara.63	Pozitif
		HEX	35.45	Pozitif
B8	1.14x10 ² kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	11.39	Pozitif
		HEX	45.31	Negatif
B9	11.4 kob bakteri ile kontamine bir gece ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA	FAM	12.49	Pozitif
		HEX	46.94	Negatif
D9	Negatif Kontrol (dH ₂ O)	FAM	-	Negatif
		HEX	35.52	Pozitif

3.8 *Listeria monocytogenes* Tekrarlanabilirlik Deney Sonuçları

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneyleri için optimize edilmiş miktarlar için 3 farklı zamanda primer prob dilüsyonları hazırlanmıştır. LotA, LotB, LotC olarak etiketlenen bu dilüsyonlardan LotA etiketine sahip dilüsyon için 3 farklı kişi tarafından en az 4 tekrarlı çalışma gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan aynı kişi ile üç farklı lota

sahip dilüsyonlarla farklı zamanlarda yine 4'lü çalışma yapmıştır. Çalışma içi farklılığı belirlemek üzere ise 8 tekrarlı bir deney gerçekleştirilmiştir. Real Time-PCR çalışmaları için 156 kob/ml bakteri sayısına sahip dilüsyonla 25 ml süt örneği kontamine edilmiş ve 4 saat ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş örnekten elde edilen DNA kullanılmıştır.

Çizelge 3.29 : *Listeria monocytogenes* için Real Time-PCR tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen Ct değerleri.

Örnek	Ct Değeri	Ortalama	Standart Sapma
Çalışma Günü: 1 - Kişi No: 1 - Parti: A			
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	30.05	30.16	0.151
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	30.37		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	30.17		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	30.05		
Çalışma Günü: 2 - Kişi No: 2 - Parti: A			
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	30.01	29.95	0.121
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	30.07		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	29.79		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	29.94		
Çalışma Günü: 3 - Kişi No: 1 - Parti: C			
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	29.27	29.72	0.359
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	30.04		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	29.6		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	29.98		
Çalışma Günü: 4 - Kişi No: 3 - Parti: A			
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	29.43	29.83	0.283
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	30.07		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	29.82		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	29.98		
Çalışma Günü: 5 - Kişi No: 1 - Parti: B			
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	29.3	30.47	1.385
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	30.27		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	32.46		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	29.85		

Çizelge 3.29 (devam) : *Listeria monocytogenes* için Real Time-PCR tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde edilen Ct değerleri.

Örnek	Ct Değeri	Ortalama	Standart Sapma
Çalışma Günü: 5 (Çalışma içi dahil) - Kişi No: 1 - Parti: B			
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	29.3		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	32.52		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	30.27		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	32.46		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	29.85	31.18	1.429
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	32.92		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	30.13		
156 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	31.95		

Çizelge 3.29’da Real Time-PCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinde elde edilen Ct değerleri sunulmuştur. Çizelge 3.30’da verildiği gibi varyasyon katsayısı hesaplanarak belirlenmiştir. Değişkenlik en düşük uygulayıcılar arası iken en yüksek çalışma içi olarak görülmüştür.

Çizelge 3.30 : *Listeria monocytogenes* Real Time-PCR için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için değişkenlik katsayıları.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Çalışma İçi Değişkenlik N=8	Lotlar Arası Değişkenlik N=3	Uygulayıcılar Arası Değişkenlik N=3	Toplam Çalışmalar Arası Değişkenlik N=5
Standart Sapma	1.51	0.82	0.23	0.65
Değişim Katsayısı [%]	4.85	2.71	0.77	2.15

Benzer çalışma ddPCR çalışması için gerçekleştirilmiş olup 1500 kopya/ml *Listeria monocytogenes* ile kontamine örnekten elde edilen ddPCR sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışma içi ve çalışmalar arası farklılıklar Çizelge 3.31 ve Çizelge 3.32’de verildiği gibi varyasyon katsayısı hesaplanarak belirlenmiştir. Çizelge 3.32’ye göre değişkenlik en düşük partiler arası çalışmada görülürken en yüksek çalışma içi olarak görülmüştür.

Çizelge 3.31 : *Listeria monocytogenes* ddPCR çalışmasında tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneylerinden elde konsantrasyon değerleri.

Örnek	Konsantrasyon (kob/ μ l)	Log Ortalama	Standart Sapma
Çalışma Günü: 1 - Kişi No: 1 - Parti: A			
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	2410		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	1330	3.51	0.081
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	4390		
Çalışma Günü: 2 - Kişi No: 2 - Parti: A			
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	2130		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	4150	3.95	0.056
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	2780		
Çalışma Günü: 3 - Kişi No: 1 - Parti: C			
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	2040		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	3710	3.77	0.182
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	1510		
Çalışma Günü: 4 - Kişi No: 3 - Parti: A			
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	3340		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	4890	4.29	0.574
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	1030		
Çalışma Günü: 5 - Kişi No: 1 - Parti: B			
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	4930		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	9490	3.77	0.176
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	4510		
Çalışma Günü: 5 (Çalışma içi dahil) - Kişi No: 1 - Parti: B			
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	5040		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	1190		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	2950		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	3770		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	1360	3.69	0.162
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	1460		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	3650		
1500 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	1020		

Çizelge 3.32 : *Listeria monocytogenes* ddPCR için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için değişkenlik katsayıları.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Çalışma İçi Değişkenlik N=8	Lotlar Arası Değişkenlik N=3	Uygulayıcılar Arası Değişkenlik N=3	Toplam Çalışmalar Arası Değişkenlik N=5
Standart Sapma	0.16	0.19	0.24	0.20
Değişim Katsayısı [%]	4.36	0.005	0.01	0.01

4. TARTIŞMA

Real Time-PCR *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve diğer patojenlerin tespitinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte bu sistemin inhibe edici ajanlara karşı daha duyarlı olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Wang ve diğ, 2018; Sedlak ve diğ, 2014; Levin, 2015). ddPCR teknik olarak reaksiyon içerisindeki bir kopyayı saptayabilecek özellikle olması ve inhibitörlere karşı daha dayanıklı olması gibi özellikleri, gıda patojenlerinin hassas olarak tespiti konusunda avantaj yaratabileceği fikrini test etmek bu çalışmanın ana amacını oluşturmuştur. Çalışmada ddPCR'ın maksimum hassasiyetle tanıma yeteneği, olabilecek en kısa ön zenginleştirme aşamasının eklenmesiyle ölçülmeye çalışılmıştır. Bu aşama aynı zamanda canlı ölü bakteri ayrımı konusuyla ilgili problemi de ortadan kaldırmaktadır.

Çalışmada belirtilen yöntem ile başarılı sonuçlar elde edilmiş ve Real Time-PCR yöntemine kıyasla daha hassas sonuçlara ulaşılmıştır.

Salmonella'ya bağlı enfeksiyon ve salgınların önlenmesi toplumsal sağlık ve ekonomi açısından önem arz etmektedir. Besin üretim sürecinin her evresinde *Salmonella* kontaminasyonu olabilir. Bu kontaminasyon genellikle düşük seviyede olur ve de oldukça yaygındır (Malorny ve diğ, 2008). Bu bulaşların olabilecek en düşük seviyede tespiti zor olmakla birlikte kritiktir (McEntire ve diğ, 2014). *Salmonella* spp.'nin yasal olarak 1 kopya/25 g hassasiyette tespit etmek şimdiye kadar var olan direk teknolojilerin hiçbirisi ile mümkün olamamıştır. Bu zorunluluk *Salmonella* tanısı için hassas proseslerin kullanılması zorunluluğunu beraberinde getirmektedir ve mutlaka bir zenginleştirme aşaması gereksinimi oluşmuştur (Fachmann ve diğ, 2017). Zenginleştirme aşamasını kısaltmak için yapılan çalışmalar mevcut olmakla birlikte bu sürenin et numuneleri için en az 8 saat olduğu fakat 3 saatlik inkübasyonun yüksek oranda *Salmonella* tespitinde başarılı olduğu bildirilmiştir (Fachmann ve diğ, 2017). Optimize ettiğimiz yöntemde *Salmonella* tanısında kullanılabilecek 2 gen üzerine Taqman prob prensibine dayanan dizaynlar yapılmış ve bu dizaynların özgüllüğü hem deneysel olarak hem de *in silico* olarak %100 olarak gösterilmiştir. Deneysel olarak çalışmalarda *Salmonella* spp. türüne ait 86 farklı izolat kullanılırken *Salmonella* spp. dışı 74 izolat ile çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda ddPCR çalışmaları için daha uygun olduğu belirlenen *bipA* gen bölgesi üzerinden deneylere devam edilmiştir. Bütün çalışmalarda sisteme internal kontrolün dahil edilmesiyle her çalışmanın izolasyon ve PCR aşaması aynı zamanda kontrol edilmiştir.

ddPCR doğrusallık aralığı daha dar olmakla birlikte Real Time-PCR ve ddPCR çalışmalarından elde edilen R^2 değerleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Doğrusallık çalışmasından elde edilen ön hassasiyet tahmini sistemin istediğimiz hassasiyette sonuçlar veremeyeceğini gösterdiğinden bir ön zenginleştirme aşamasının eklenmesine karar verilmiştir. Ön zenginleştirme süresine bağlı olarak sistemin hassasiyet yeteneği ölçülmüş *Salmonella* için 3 saatlik ön zenginleştirmenin yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu kazanım toplam test süresinin oldukça kısaltılması açısından önemlidir. Hassasiyetin artması için doğrudan 50 µl izolattan 5 µl DNA kullanmak yerine DNA liyofilize edilerek tamamı kullanılmıştır. Fakat bu kullanım ile pozitif ve negatif droplet ayrımı zorlaşmıştır. Aynı çalışma için 5. saatte alınan örneklerde pozitif dropletlerin ayrımı yapılabilmekle beraber negatif dropletlerden keskin bir şekilde ayırım elde edilememiştir. Bu da besiyerinde bakteri sayısının artmasına bağlı olarak ortamda biriken hücre dışı maddeler gibi inhibitörlerin varlığını akıllara getirmektedir (Rossen ve diğ, 1992; Wilson, 1997). Bu görüşü test etmek için liyofilize edilen DNA 5 µl yerine 15 µl de dilüe edilerek hepsi kullanılacak şekilde farklı kuyucuklarda aynı örnek için 3 çalışma yapılmış ve sonuç olarak keskin ve kabul edilebilir bir ayırım ile 25 g örnekte hassasiyetin 1.39 kob'a kadar inebileceği gösterilmiştir. Bu hassasiyet sıfır tolerans zorunluluğu ile eşleşmektedir.

Listeria monocytogenes, hayatı tehdit eden gıda kaynaklı listeriozis hastalığının sebebidir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority – EFSA)'nin 2021 yılında yayınlanan verilerine göre listeriozis 1876 vaka ile 2020 yılında en çok rastlanan 5. zoonoz hastalığı olmuştur ve 64 yaş civarı kişileri etkilemektedir. Bu verilere göre *Listeria monocytogenes* ve West Nile virüs enfeksiyonları yüksek ölüm oranları nedeniyle en ciddi hastalık statüsünde yer almıştır (URL-4). *Listeria monocytogenes*'e bağlı salgınların önlenmesi ekonomik ve toplumsal anlamda yüksek derecede önemlidir. Yasal gereklilikler ülkelere göre değişmekte olup *Listeria monocytogenes* için 25 g örnekte var yok testi uygulanarak sıfır tolerans politikası kabul edilir. Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu tarafından ele alınan *Listeria monocytogenes* kriterlerinde tüketime hazır gıdalarla ilgili olarak şartlar belirlenmiş olup bebekler ve tıbbi amaçlara yönelik hazır gıdalar için 25 g örnekte *Listeria monocytogenes* bulunmaması istenirken tüketime hazır diğer gıdalar için bu sayı <100 kob/g olmalıdır. Üretim alanında bırakıldığı zaman bakteri gelişmesine uygun ürünler için 25 g örnekte sıfır tolerans şartı geçerlidir (Malorny ve diğ, 2003).

Listeria monocytogenes tanısı için *iap* ve *inlA* gen bölgeleri için Taqman prob prensibine dayanan dizaynlar yapılmıştır. Her iki bölge için *in silico* olarak %100 özgüllük gösterilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda artış yüksekliği istenen seviyede çıkan *inlA* gen bölgesi ile deneylere devam edilmiştir. Bu bölge için deneysel olarak *Listeria monocytogenes* türü 10 izolat ile çalışılırken 4 adet farklı *Listeria* türü denenmiş ve sadece *Listeria monocytogenes* türü ile ilgili örneklerden artış elde edilmiştir. Tür dışı çapraz reaktivite çalışması için *Listeria monocytogenes* dışı 132 farklı izolat kullanılmış olup internal kontrol dışında herhangi bir artış elde edilmemiştir.

ddPCR doğrusalık aralığı daha dar olmakla birlikte Real Time-PCR ve ddPCR çalışmalarından elde edilen R^2 değerleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Doğrusalık çalışmasından hassasiyet hakkında elde edilen ön bilgi *Salmonella spp.* tanısında olduğu gibi sistemin istediğimiz hassasiyette sonuçlar veremeyeceğini gösterdiğinden bir ön zenginleştirme aşamasının eklenmesi bu çalışma için de uygun görülmüştür. Ön zenginleştirme aşaması yapılan deneyler sonucunda 4 saat olarak belirlenmiş olup hassasiyet deneyleri *Salmonella spp.* tanısında çalışıldığı gibi üç kuyucukta toplam DNA'nın tamamı kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda hassasiyet 1.35 kob/25 ml olarak bulunmuştur.

Gıda örneklerinde patojen tespiti ile yapılan birkaç çalışma mevcut olup bu çalışmalarda Real Time-PCR'a kıyasla ddPCR'da daha hassas sonuçlar elde edilmiştir (Cremonesi ve diğ, 2016; Wang ve diğ, 2018). *S. thymophilum* ile yapılan benzer bir çalışmada hassasiyet 10^2 kob/ml olarak bulunurken yumuşak peynir örneklerinde ön zenginleştirmesiz olarak 4×10^3 kob/g hassasiyet elde edilmiştir (Cremonesi ve diğ, 2016; Wang ve diğ, 2018). Yumuşak peynir örneklerinde *Listeria spp.* için yapılan ön zenginleştirmesiz ddPCR çalışmasında ise 10^2 kob/g hassasiyette sonuç elde edilmiştir (Cremonesi ve diğ, 2016). Çalışmamızda ise daha yüksek miktardaki örnekten elde edilen tüm DNA'nın kullanılması ile yüksek hassasiyette sonuç alınmıştır. Diğer yandan belirtilen çalışmalar bu tez kapsamında yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında ön zenginleştirme aşamasının hassasiyet anlamında önemli fark yarattığı sonucunu öne çıkarmaktadır. İçme suyunda *E. coli* O157 and *Listeria monocytogenes* tanısı için ön zenginleştirmesiz yapılan multipleks mikrofluidik dijital PCR çalışmasında her iki patojen 10^2 kob/ml hassasiyette sonuçlar elde edilmiştir (Bian ve diğ, 2015). Diğer bir gıda patojeni olan *Yersinia enterocolitica* ile yapılan ddPCR çalışmasında marul örnekleri için Real Time-PCR ve ddPCR çalışma sonuçları

karşılaştırılmıştır. 11 gün boyunca farklı sıcaklıklarda tutulan farklı sayıda bulaşa sahip örneklerde ddPCR düşük sayıda kontaminasyonları tespit edebilmiştir (Cristiano ve diğ., 2021). Bu sonuç ddPCR'ın yüksek hassasiyette sonuç vermesi ile ilişkilendirilebilir. Kim ve diğ. (2022), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thompson (*S. thompson*)'ın yumurta örneklerinde tespiti için ddPCR ve Real Time-PCR karşılaştırması yapmışlar ve saf kültür ile sırasıyla 10^1 ve 10^2 kob/ml hassasiyet limiti elde etmişlerdir, yapay olarak kontamine ettikleri yumurta örneklerinde ise 150 dakikalık ön zenginleştirme aşamasından sonra ddPCR için 1 kob/25 g hassasiyete ulaşmışlardır. Bu çalışma, Öz ve diğ. (2020) çalışması ile örtüşmektedir ve çalışmamızı doğrular nitelikte bir çalışma olarak karşımıza çıkmıştır. Bu tez kapsamında gıda örneği olarak seçilen çiğ kıyma örnekleri yerine kullanılan yumurta örnekleri için 2.5 saatlik ön zenginleştirme aşaması 25 g örnek için 225 ml “Buffered Peptone Water” ile gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında zengin besiyeri kullanılmış olup 25 g örnek için 100 ml oranı belirlenmiştir. İki çalışma arasındaki yarım saatlik ön zenginleştirme süresi farkı bu farklılıklarla ilişkili olabileceği gibi kullanılan serovar farkı, gıda farkı veya ara aşamalarda kullanılan DNA izolasyon sistemi farklılıklarına veya kullanılan gen bölgesi farklılığına dayanıyor olabilir. Çalışmamızda sistemi kontrol etmek için kullandığımız internal kontrol ile yapılan multipleks PCR'da saptama olasılığını arttırmak için zaman farkı etkisi de ortaya çıkmış olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi kısa ön zenginleştirme aşamasının sisteme eklenmesi hassasiyeti istenen seviyelere getirmede önemli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar dijital PCR ile yapılan nükleik asit amplifikasyon testleri içerisinde oldukça hassas bir yöntem olarak yerini almıştır (Xiang ve diğ., 2022).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Real time-PCR gıda patojen tespitinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir sistem olmakla birlikte kültüre dayalı yöntemlerle kombinasyonunda toplam sonuç alma süresinin uzun olması birçok açıdan dezavantaj yaratmaktadır. Bu çalışmada *Salmonella* için çiğ kıyma ve *Listeria monocytogenes* için süt örnekleri kullanılarak kısa bir ön zenginleştirme aşaması ile ddPCR yöntemine dayalı aynı gün içerisinde sonuç verme yeteneğine sahip 25 g ve 25 ml örnekte sırasıyla 1.39 ve 1.35 kob gibi oldukça hassas bir şekilde tanıma yapan bir sistem elde edilmiştir. Sistemin tespit yeteneği minimum gereksinimli çeşitli deneylerle kontrol edilmiştir. Kullanılan primer ve probaların özgüllüğü dışlama ve kapsama çalışmaları ile deneysel olarak test edilmiş ve %100 olarak bulunmuştur. Özgüllük çalışmaları, bilgisayar ortamında yapılan homoloji araştırması ile de kontrol edilmiştir. Doğrusallık, hassasiyet çalışmaları ile sistemin performansı test edilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik deneyleri ile de çalışmalar arası ve çalışma içi ve üretimler arası farklılıklar test edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar dPCR'ın patojen tanısında etkili bir şekilde kullanılabileceği konusunda kanıtlar sunmaktadır. Çalışmada 25 g ve 25 ml örnek için 1 gün içinde sonuç verebilecek hassas bir yöntem elde edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar ileride yapılabilecek daha etkin çalışmalar için bir başlangıç noktası olarak kabul edilebilir. Bu tez kapsamında yapılan hassasiyet çalışması daha fazla örnekleme yapılması ile genişletilebilir. Daha etkin veya daha büyük bir örnekleme ile geliştirilebilecek olan izolasyon sistemi ile ön zenginleştirme süresi daha da kısaltılabilir. PCR'ı daha verimli hale getirebilecek ve inhibitörlerin etkisini azaltacak fiziksel, biyokimyasal, immünolojik numune hazırlama sistemleri geliştirilebilir. Örneğin spesifik antikorlarla kaplı magnetik boncukların kullanıldığı immuno-capture yöntemi ve benzeri yöntemlerle veya etkin numune filtrasyon yöntemlerinin optimize edilmesiyle izolasyon aşaması daha da etkin hale getirilerek ortamdan gelebilecek inhibitör benzeri yabancı maddelerin ayrışma olasılığı arttırılabilir. Özellikle et örnekleri için enzimler kullanarak proteinlerin parçalanması yoluyla daha saf DNA izolatları elde edilebilir. Çalışmada kullanılan besiyerleri özelleştirilebilir. Tanımlanmak istenen patojenin besiyeri içerisinde ön plana çıkmasını ve çoğalmasını teşvik edici besiyeri katkıları araştırılabilir veya selektif besiyerlerinin kullanılması ile

daha etkin sonuçlar elde edilebilir. Bu yaklaşımın tam tersi olarak multipleks çalışmalar için tespit edilmek istenen patojenlerin birlikte çoğalmasını teşvik edici ya da birlikte çoğalmaya uygun besiyeri araştırması yapılabilir. Bu çalışmalardan elde edilecek bilgilerle ve farklı besiyerleri ile patojen organizmalar için elde edilebilecek hassasiyet bilgileri karşılaştırılabilir. *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella spp.* ön zenginleştirme aşamasında bu patojenlerle birlikte çoğalabilecek diğer bakterilerin tanıma yeteneğini ne yönde etkilediği veya inhibitörlerin etkisi üzerine yapılabilecek daha ince çalışmalar ile sistemi süre ve hassasiyet anlamında iyileştirme çalışmaları yapılabilir. Diğer yandan doğal kontamine örneklerle karşılaştırma çalışmaları gibi gerekli diğer validasyon çalışmalarının tamamlanması ile test rutin çalışmalar için kullanılabilir hale getirilebilir fakat her gıda çeşidi için testlerin tamamlanması gerekmektedir.

Belirtilen çalışmalar doğrultusunda belirlenen ön zenginleştirme aşamasının yaralı ve stres altındaki hücreler için etkinliği ölçülebilir. Bu hücreler için hassasiyet çalışmaları planlanabilir.

Bu çalışmalardan elde edilebilecek verilerle başka patojenler için tanımlama sistemlerinin geliştirilmesi için potansiyel yüksektir.

Çalışmalarda tanımlama için kullanılan gen bölgeleri ile karşılaştırmalı sonuçlarla daha sağlıklı veriler elde edilebilir.

Günümüzde ddPCR çalışmaları Real Time-PCR çalışmalarından daha maliyetlidir. Maliyet konusundaki iyileştirmeler ile ddPCR ın patojen tespiti de dahil birçok alanda daha avantajlı hale geleceği aşikardır. Yine tek patojen tespiti yerine multipleks çalışmaların yapılması maliyet anlamında önemli iyileştirmeler getirecektir. Bu da testin rutinde kullanılabilir olma olasılığı üzerine olumlu sonuç yaratabilir. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte kullanılan cihazların üst versiyonları hızla kullanıcıların onayına sunulmaktadır. Bu çalışmada iki kanal üzerinden okuma yapan Biorad QX200 Droplet Digital PCR cihazı kullanılmıştır. QX600 Droplet Digital PCR cihazı gibi 6 kanaldan okuma alabilen ve bir tüpte 12 hedefi ölçebilen bir sistemin veya benzer platformda başka sistemlerin kullanılması ile geliştirilecek yöntemler maliyeti azaltma konusunda daha da etkili olabilir. Bu açıdan bakıldığında bu tez çalışması ileride geliştirilebilecek yöntemlerin ön çalışması niteliğinde değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Almeida, P. F. D., & Almeida, R. C. D. C.** (2000). A PCR protocol using *inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 11(2), 97-101.
- Andino, A., & Hanning, I.** (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Besser, J. M.** (2018). *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food microbiology*, 71, 55-59.
- Bhunia, A. K.** (2014). One day to one hour: how quickly can foodborne pathogens be detected?. *Future microbiology*, 9(8), 935-946.
- Bian, X., Jing, F., Li, G., Fan, X., Jia, C., Zhou, H., ... & Zhao, J.** (2015). A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 770-777.
- Bolton, F. J., Fritz, E., Poynton, S., & Jensen, T.** (2000). Rapid enzyme-linked immunoassay for detection of *Salmonella* in food and feed products: performance testing program. *Journal of AOAC International*, 83(2), 299-304.
- Calvó, L., Martínez-Planells, A., Pardos-Bosch, J., & Garcia-Gil, L. J.** (2008). A new real-time PCR assay for the specific detection of *Salmonella* spp. targeting the *bipA* gene. *Food Analytical Methods*, 1(4), 236-242.
- Chen, J. Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z.** (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39-59.
- Cremonesi, P., Cortimiglia, C., Picozzi, C., Minozzi, G., Malvisi, M., Luini, M., & Castiglioni, B.** (2016). Development of a droplet digital polymerase chain reaction for rapid and simultaneous identification of common foodborne pathogens in soft cheese. *Frontiers in microbiology*, 7, 1725.
- Cristiano, D., Peruzy, M. F., Aponte, M., Mancusi, A., Proroga, Y. T. R., Capuano, F., & Murru, N.** (2021). Comparison of droplet digital PCR vs real-time PCR for *Yersinia enterocolitica* detection in vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 354, 109321.
- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M.** (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical microbiology reviews*, 28(4), 901-937.

- Datta, A. R., & Burall, L. S.** (2018). Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. *Food microbiology*, 75, 18-27.
- de Freitas Neto, O. C., Penha Filho, R. A. C., Barrow, P., & Berchieri Junior, A.** (2010). Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 12, 01-11.
- de W Blackburn, C., & McClure, P. J.** (Eds.). (2009). *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control*. Elsevier.
- den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., ... & Wiedmann, M.** (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC genomics*, 11(1), 1-20.
- Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R.** (2013). Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*, 59(11), 1670-1672.
- Dreo, T., Pirc, M., Ramšak, Ž., Pavšič, J., Milavec, M., Žel, J., & Gruden, K.** (2014). Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(26), 6513-6528.
- 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.
- El-Gazzar, F. E., & Marth, E. H.** (1992). Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: a review. *Journal of dairy science*, 75(9), 2327-2343.
- Fachmann, M. S. R., Löfström, C., Hoorfar, J., Hansen, F., Christensen, J., Mansdal, S., & Josefsen, M. H.** (2017). Detection of *Salmonella enterica* in meat in less than 5 hours by a low-cost and noncomplex sample preparation method. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5), e03151-16.
- Galán, J. E., & Curtiss 3rd, R.** (1991). Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and immunity*, 59(9), 2901-2908.
- Galán, J. E., Pace, J., & Hayman, M. J.** (1992). Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature*, 357(6379), 588-589.
- Gasnov, U., Hughes, D., & Hansbro, P. M.** (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 851-875.
- Gilmour, M. W., Graham, M., Van Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., Trout-Yakel, K. M., ... & Nadon, C.** (2010). High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC genomics*, 11(1), 1-15.

- González-Escalona, N., Brown, E. W., & Zhang, G.** (2012). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *trrRSBCA* locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. in fresh produce and eggs. *Food Research International*, 48(1), 202-208.
- Grimont, P. A., & Weill, F. X.** (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., ... & Lecuit, M.** (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 136.
- Hansen, T.** (2013). *Molecular diagnostics of foodborne pathogens*. National Food Institute, Technical University of Denmark.
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., & Ikeda, M.** (2005). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS microbiology letters*, 253(1), 155-161.
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., ... & World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group.** (2015). World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS medicine*, 12(12), e1001923.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E., & Wagner, M.** (2001). Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Research in Microbiology*, 152(1), 37-46.
- Henri, C., Leekitcharoenphon, P., Carleton, H. A., Radomski, N., Kaas, R. S., Mariet, J. F., ... & Hendriksen, R. S.** (2017). An assessment of different genomic approaches for inferring phylogeny of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in microbiology*, 2351.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... & Colston, B. W.** (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, 83(22), 8604-8610.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51-59.
- Huggett, J. F., Cowen, S., & Foy, C. A.** (2015). Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical chemistry*, 61(1), 79-88.
- ISO, International Organization for Standardization** (2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella*. ISO 6579-1:2017, Geneva, Switzerland.
- Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son, R., Farinazleen, M. G., & Cheah, Y. K.** (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, 17(1), 1-11.

- Josefsen, M. H.** (2009). Molecular detection of foodborne pathogens. Frederiksberg: Samfundslitteratur.
- Keskin, T.** (2022). Sucuk, salam, sosis ve pastırmalarda salmonella spp. ve listeria monocytogenes varlığı ile kimyasal kriterlerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı. Konya
- Kevenk, T. O.** (2014). Süt ve ürünlerinde listeria monocytogenes'in insidensi, serotiplendirilmesi ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi / Detection, serotyping and antimicrobial diversity of listeria monocytogenes in raw milk and dairy products. Ondokuz Mayıs Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı. Samsun.
- Kim, E., Choi, C. H., Yang, S. M., Shin, M. K., & Kim, H. Y.** (2022). Rapid identification and absolute quantitation of zero tolerance-Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson using droplet digital polymerase chain reaction. *LWT*, 114333.
- Kothary, M. H., & Babu, U. S.** (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of food safety*, 21(1), 49-68.
- Kumar, V., Chen, Y., Ero, R., Ahmed, T., Tan, J., Li, Z., ... & Gao, Y. G.** (2015). Structure of BipA in GTP form bound to the ratcheted ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10944-10949.
- Langridge, G. C., Wain, J., & Nair, S.** (2012). Invasive salmonellosis in humans. *EcoSal Plus*, 5(1).
- 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.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H.** (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of Listeria monocytogenes in food. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1227.
- Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J.** (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food control*, 47, 264-276.
- Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J.** (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food control*, 47, 264-276.
- Lee, S., Ward, T. J., Graves, L. M., Wolf, L. A., Sperry, K., Siletzky, R. M., & Kathariou, S.** (2012). Atypical Listeria monocytogenes serotype 4b strains harboring a lineage II-specific gene cassette. *Applied and environmental microbiology*, 78(3), 660-667.
- Levin, R. E.** (2015). Recent developments in molecular detection of food-borne disease bacteria and GMOs. *Food Biotechnology*, 29(1), 69-116.

- Lim, H., Lee, K. H., Hong, C. H., Bahk, G. J., & Choi, W. S.** (2005). Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *International journal of food microbiology*, 105(3), 411-418.
- Liu, D.** (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of medical microbiology*, 55(6), 645-659.
- Liu, H., Lu, L., Pan, Y., Sun, X., Hwang, C. A., Zhao, Y., & Wu, V. C.** (2015). Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, 52, 78-84.
- 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.
- Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N., & Hoorfar, J.** (2008). Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and environmental microbiology*, 74(5), 1299-1304.
- 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.
- McEntire, J., Acheson, D., Siemens, A., Eilert, S., & Robach, M.** (2014). The public health value of reducing *Salmonella* levels in raw meat and poultry. *Food Protection Trends*, 34(6), 386-392.
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M.** (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M.** (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2), 79-96.
- Öz, Y. Y., Sönmez, Ö. İ., Karaman, S., Öz, E., Unal, C. B., & Karataş, A. Y.** (2020). Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. in raw minced meat samples using droplet digital PCR. *European Food Research and Technology*, 246(10), 1895-1907.
- Pecoraro, S., Berben, G., Burns, M., Corbisier, P., De Giacomo, M., De Loose, M., Dagand, E., Dobnik, D., Eriksson, R., Holst-Jensen, A., Kagkli, D. M., Kreysa, J., Lievens, A., Mäde, D., Mazzara, M., Paternò, A., Peterseil, V., Savini, C., Sovová, T., Sowa, S., & Spilsberg, B.** (2019). Overview and recommendations for the application of digital PCR. EUR 29673 EN. Publications Ofce of the European Union, Luxembourg. <https://doi.org/10.2760/192883>. ISBN 978-92-7600180-5

- Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R.** (2012). Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical chemistry*, 84(2), 1003-1011.
- Priyanka, B., Patil, R. K., & Dwarakanath, S.** (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *The Indian journal of medical research*, 144(3), 327.
- Rački, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., & Ravnkar, M.** (2014). Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant methods*, 10(1), 1-10.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., & Brisse, S.** (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 4(9), e1000146.
- Rasheed, M. J.** (2022). Isolation and molecular identification of *Listeria monocytogenes* from local and imported cheese in Duhok province, Iraq. Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa. Harran University Graduate School of Applied and Natural Science
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F.** (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology*, 17(1), 37-45.
- Rothrock Jr, M. J., Davis, M. L., Locatelli, A., Bodie, A., McIntosh, T. G., Donaldson, J. R., & Ricke, S. C.** (2017). *Listeria* occurrence in poultry flocks: detection and potential implications. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 125.
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G.** (2011). *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel medicine and infectious disease*, 9(6), 263-277.
- Sedlak, R. H., & Jerome, K. R.** (2013). Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(1), 1-4.
- Sedlak, R. H., Kuypers, J., & Jerome, K. R.** (2014). A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 80(4), 285-286.
- Shanmugasamy, M., Velayutham, T., & Rajeswar, J.** (2011). Inv A gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. *Veterinary World*, 4(12), 562.
- Takahashi, K., Yan, I. K., Kim, C., Kim, J., & Patel, T.** (2014). Analysis of extracellular RNA by digital PCR. *Frontiers in oncology*, 4, 129.
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., ... & Olsen, J. E.** (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection*, 125(2), 229-255.

- Välimaa, A. L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E.** (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—a review. *Food Control*, 55, 103-114.
- Wagner, A. O., Malin, C., Knapp, B. A., & Illmer, P.** (2008). Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2537-2539.
- Wang, M., Yang, J., Gai, Z., Huo, S., Zhu, J., Li, J., ... & Zhang, L.** (2018). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *International journal of food microbiology*, 266, 251-256.
- Wang, Y., & Salazar, J. K.** (2016). Culture-independent rapid detection methods for bacterial pathogens and toxins in food matrices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 183-205.
- Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A. M., Schikora, A., & Velge, P.** (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in microbiology*, 5, 791.
- Wilson, I. G.** (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741-3751.
- Wolffs, P. F. G., Glencross, K., Thibaudeau, R., & Griffiths, M. W.** (2006). Direct quantitation and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3896-3900.
- Wray, C., & Wray, A.** (Eds.). (2000). *Salmonella in domestic animals*.
- Xiang, X., Shang, Y., Zhang, J., Ding, Y., & Wu, Q.** (2022). Advances in improvement strategies of digital nucleic acid amplification for pathogen detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116568.
- Yildirim, S., Elhanafi, D., Lin, W., Hitchins, A. D., Siletzky, R. M., & Kathariou, S.** (2010). Conservation of genomic localization and sequence content of Sau3AI-like restriction-modification gene cassettes among *Listeria monocytogenes* epidemic clone I and selected strains of serotype 1/2a. *Applied and environmental microbiology*, 76(16), 5577-5584.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H.** (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(3), 297-312.
- URL-1.** <<https://www.cdc.gov/salmonella/>>, erişim tarihi: 10.12.2022.
- URL-2.** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>, erişim tarihi: 15.02.2020.
- URL-3.** <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>, erişim tarihi: 15.02.2020.
- URL-4.** <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6971>>, erişim tarihi: 10.12.2022.



EKLER

Ek A : Çalışma kapsamında kullanılan tür listesi.

Ek B : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Ek C : *Listeria monocytogenes* hassasiyet çalışması için ddPCR sonuçları.





Ek A : Çalışma kapsamında kullanılan tür listesi.

Tür	Tür Kodu	Sağlanan Kurum*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2807	SGSC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2808	SGSC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2809	SGSC
<i>Klebsiella ozaenae</i>	SA2810	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2811	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2812	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2813	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2814	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2815	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2816	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2817	SGSC
<i>Escherichia coli</i>	SA2819	SGSC
<i>Enterobacter cloacae</i>	EC1	SGSC
<i>Citrobacter freundii</i>	EC26	SGSC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EC5	SGSC
<i>Serratia marcescens</i>	EC79	SGSC
<i>Klebsiella oxytoca</i>	EC78	SGSC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EC17	SGSC
<i>Hafnia alvei</i>	EC68	SGSC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	PL82450	SGSC
<i>Morganella morganii</i>	PL112028	SGSC
<i>Serratia marcescens</i>	920910 v	SGSC
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	SGSC
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022	SGSC
<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	SGSC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5590	SGSC
<i>Enterobacter cloacae</i>	SA5595	SGSC
<i>Morganella morganii</i>	SA5620	SGSC
<i>Serratia liquefaciens</i>	PL70291-2	SGSC
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5632	SGSC
<i>Hafnia alvei</i>	PL70284-1	SGSC
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae</i>	ATCC11296	SGSC
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182	SGSC
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	ATCC13883	SGSC
<i>Serratia marcescens</i>	M15	SGSC
<i>Shigella flexneri</i>	M16	SGSC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	M22	SGSC
<i>Escherichia coli K-12</i>	SAB3059	SGSC
<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC35469	SGSC
<i>S. Panama</i>	SARB41	SGSC
<i>S. paratyphi C</i>	SARB48	SGSC

Ek A (devam) : Çalışma kapsamında kullanılan tür listesi.

Tür	Tür Kodu	Sağlanan Kurum*
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	YÜ
<i>Escherichia coli</i> MM294	EC-2	YÜ
<i>Escherichia coli</i> b3	EC-3	YÜ
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	YÜ
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	YÜ
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	YÜ
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	YÜ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	YÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	YÜ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715	YÜ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729	YÜ
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019	YÜ
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	YÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	YÜ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0-1	ODTÜ
<i>Salmonella anatum</i>	o-2	ODTÜ
<i>Proteus vulgaris</i>	O-3	ODTÜ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0-4	ODTÜ
<i>Serratia mercensens</i>	0-5	ODTÜ
<i>Escherichia coli</i> DH5	0-6	ODTÜ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	ODTÜ
<i>Bacillus cereus</i>	0-8	ODTÜ
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC 29213	AL
<i>Enterococcus faecium</i>	A-2	AL
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	A-3	AL
<i>Acinetobacter baumannii</i>	A-4	AL
<i>Burkholderia (Pseudomonas) capeciae</i>	A-5	AL
<i>Morganella morganii</i>	A-6	AL
<i>Proteus mirabilis</i>	A-7	AL
<i>Corynebacterium</i> spp.	A-8	AL
<i>Hafnia alvei</i>	A-9	AL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A-10	AL
<i>Staphylococcus epidermis</i>	A-11	AL
<i>Enterococcus faecalis</i>	A-12	AL
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-13	AL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A-14	AL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	A-15	AL
<i>Salmonella minnesota</i>	mR5a	SGSC
<i>Salmonella typhimurium</i>	SARA1	SGSC
<i>Salmonella saintpaul</i>	SARA22	SGSC
<i>Salmonella heidelberg</i>	SARA30	SGSC

Ek A (devam) : Çalışma kapsamında kullanılan tür listesi.

Tür	Tür Kodu	Sağlanan Kurum*
<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARA41	SGSC
<i>Salmonella muenchen</i>	SARA63	SGSC
<i>Salmonella enteritidis</i>	27655	SGSC
<i>Salmonella paratyphi A</i>	SA4249	SGSC
<i>Salmonella paratyphi A</i>	RKS2907	SGSC
<i>Salmonella enteritidis</i>	RKS53	SGSC
<i>Salmonella paratyphi A</i>	RKS4993	SGSC
<i>Salmonella paratyphi C</i>	RKS4594	SGSC
<i>Salmonella paratyphi C</i>	RKS4620	SGSC
<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS4994	SGSC
<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS5021	SGSC
<i>Salmonella pullorum</i>	RKS5078	SGSC
<i>Salmonella pullorum</i>	RKS2242	SGSC
<i>Salmonella gallinarum</i>	RKS5079	SGSC
<i>Salmonella dublin</i>	RKS4699	SGSC
<i>Salmonella dublin</i>	RKS4732	SGSC
<i>Salmonella agona</i>	SARB1	SGSC
<i>Salmonella derby</i>	SARB9	SGSC
<i>Salmonella gallinarum</i>	SARB21	SGSC
<i>Salmonella haifa</i>	SARB22	SGSC
<i>Salmonella heidelberg</i>	SARB23	SGSC
<i>Salmonella indiana</i>	SARB25	SGSC
<i>Salmonella infantis</i>	SARB26	SGSC
<i>Salmonella miami</i>	SARB28	SGSC
<i>Salmonella montevideo</i>	SARB31	SGSC
<i>Salmonella newport</i>	SARB36	SGSC
<i>Salmonella newport</i>	SARB37	SGSC
<i>Salmonella newport</i>	SARB38	SGSC
<i>Salmonella paratyphi A</i>	SARB42	SGSC
<i>Salmonella paratyphi B</i>	SARB43	SGSC
<i>Salmonella paratyphi C</i>	SARB48	SGSC
<i>Salmonella pullorum</i>	SARB51	SGSC
<i>Salmonella reading</i>	SARB53	SGSC
<i>Salmonella rubislaw</i>	SARB54	SGSC
<i>Salmonella saintpaul</i>	SARB55	SGSC
<i>Salmonella schwarzengrund</i>	SARB57	SGSC
<i>Salmonella sendai</i>	SARB58	SGSC
<i>Salmonella senftenberg</i>	SARB59	SGSC
<i>Salmonella stanley</i>	SARB60	SGSC
<i>Salmonella stanleyville</i>	SARB61	SGSC
<i>Salmonella thompson</i>	SARB62	SGSC

Ek A (devam) : Çalışma kapsamında kullanılan tür listesi.

Tür	Tür Kodu	Sağlanan Kurum*
<i>Salmonella typhisuis</i>	SARB69	SGSC
<i>Salmonella wien</i>	SARB71	SGSC
<i>Salmonella typhimurium LT2</i>	Lt2	SGSC
<i>Salmonella decatur</i>	SARB8	SGSC
<i>Salmonella duisberg</i>	SARB15	SGSC
<i>Salmonella emek</i>	SARB20	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	K1229	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	K950	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	K887	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS1740	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2246	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS1280	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2986	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2987	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2988	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2982	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2984	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2975	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2976	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2977	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS2978	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3009	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3010	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3036	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3038	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3039	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3040	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3042	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3052	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3053	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3055	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3013	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3014	SGSC
<i>Salmonella spp.</i>	RKS3803	SGSC
<i>Salmonella typhimurium</i>	E-1	İTÜ
<i>Salmonella newport</i>	E-2	İTÜ
<i>Salmonella enteritidis</i>	E-3	İTÜ
<i>Salmonella poana</i>	E-4	İTÜ
<i>Salmonella pullorum</i>	E-5	İTÜ
<i>Salmonella paratyphiA</i>	E-6	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7677	UÜ

Ek A (devam) : Çalışma kapsamında kullanılan tür listesi.

Tür	Tür Kodu	Sağlanan Kurum*
<i>Listeria innocua</i>	L-1	Bioexen A.Ş.
<i>Listeria welshimeri</i>	L-2	Bioexen A.Ş.
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-3	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-4	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-5	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-6	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-7	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-8	İTÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	L-9	İTÜ
<i>Listeria spp.</i>	L-10	İTÜ
<i>Listeria welshimeri</i>	5009	RSSK
<i>Listeria monoytogenes</i>	813	RSSK

SGSC: Salmonella Genetik Stok Merkezi (Salmonella Genetic Stock Center) Calgary Üniversitesi, Kanada

YÜ: Yeditepe Üniversitesi, Türkiye

ODTÜ: Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Türkiye

AL: Acıbadem Labmed, Türkiye

İTÜ: İstanbul Teknik Üniversitesi, Türkiye

RSSK: Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK) Laboratuvarı, Türkiye

UÜ: Uludağ Üniversitesi, Türkiye



Ek B : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
Dışlama Deneyi 1					
A1	Pozitif Control (<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313)	ATCC 14028	FAM HEX	16.17 33.96	Pozitif Pozitif
A2	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	FAM HEX	- 33.50	Negatif Pozitif
A3	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	FAM HEX	- 33.21	Negatif Pozitif
A4	<i>Escherichia coli</i> b3	EC-3	FAM HEX	- 33.03	Negatif Pozitif
A5	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	FAM HEX	- 33.00	Negatif Pozitif
A6	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	FAM HEX	- 33.20	Negatif Pozitif
A7	<i>Escherichia coli</i> MM294	EC-2	FAM HEX	- 33.49	Negatif Pozitif
A8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	FAM HEX	- 33.47	Negatif Pozitif
A9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715	FAM HEX	- 33.16	Negatif Pozitif
A10	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 27729	FAM HEX	- 33.14	Negatif Pozitif
A11	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 33019	FAM HEX	- 32.30	Negatif Pozitif
A12	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	FAM HEX	- 33.07	Negatif Pozitif
B1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	O-1	FAM HEX	- 33.08	Negatif Pozitif
B2	<i>Salmonella anatum</i>	O-2	FAM HEX	- 33.34	Negatif Pozitif
B3	<i>Proteus vulgaris</i>	O-3	FAM HEX	- 33.01	Negatif Pozitif
B4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	O-4	FAM HEX	- 32.02	Negatif Pozitif
B5	<i>Serratia mercersens</i>	O-5	FAM HEX	- 32.93	Negatif Pozitif
B6	<i>Escherichia coli</i> DH5	O-6	FAM HEX	- 33.14	Negatif Pozitif
B7	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	FAM HEX	- 33.21	Negatif Pozitif
B8	<i>Bacillus cereus</i>	O-8	FAM HEX	- 33.19	Negatif Pozitif
B9	<i>Salmonella typhimurium</i>	E-1	FAM HEX	- 33.36	Negatif Pozitif
B10	<i>Salmonella newport</i>	E-2	FAM HEX	- 33.65	Negatif Pozitif
B11	<i>Salmonella enteritidis</i>	E-3	FAM HEX	- 33.30	Negatif Pozitif
B12	<i>Salmonella poana</i>	E-4	FAM HEX	- 33.26	Negatif Pozitif
C1	<i>Salmonella pullorum</i>	E-5	FAM HEX	- 33.05	Negatif Pozitif

Ek B (devam) : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
C2	<i>Salmonella paratyphiA</i>	E-6	FAM HEX	- 33.35	Negatif Pozitif
C3	<i>Sataphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	FAM HEX	- 33.67	Negatif Pozitif
C4	<i>Enterococcus faecium</i>	A-2	FAM HEX	- 33.51	Negatif Pozitif
C5	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	A-3	FAM HEX	- 33.14	Negatif Pozitif
C6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A-4	FAM HEX	- 33.34	Negatif Pozitif
C7	<i>Burcholderia (Pseudomonas) capecia</i>	A-5	FAM HEX	- 33.49	Negatif Pozitif
C8	<i>Morganella morganii</i>	A-6	FAM HEX	- 33.07	Negatif Pozitif
C9	<i>Proteus mirabilis</i>	A-7	FAM HEX	- 33.47	Negatif Pozitif
C10	<i>Corynebacterium spp.</i>	A-8	FAM HEX	- 33.25	Negatif Pozitif
C11	<i>Hafnia alvei</i>	A-9	FAM HEX	- 33.28	Negatif Pozitif
C12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A-10	FAM HEX	- 33.11	Negatif Pozitif
D1	<i>Staphylococcus epidermis</i>	A-11	FAM HEX	- 33.54	Negatif Pozitif
D2	<i>Enterococcus faecalis</i>	A-12	FAM HEX	- 33.32	Negatif Pozitif
D3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A-13	FAM HEX	- 33.26	Negatif Pozitif
D4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A-14	FAM HEX	- 33.40	Negatif Pozitif
D5	<i>E. coli</i> ATCC 25922	A-15	FAM HEX	- 33.49	Negatif Pozitif
D6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2807	FAM HEX	- 33.44	Negatif Pozitif
D7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2808	FAM HEX	- 33.31	Negatif Pozitif
D8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SA2809	FAM HEX	- 33.37	Negatif Pozitif
D9	<i>Klebsiella ozaenae</i>	SA2810	FAM HEX	- 33.35	Negatif Pozitif
D10	<i>Escherichia coli</i>	SA2811	FAM HEX	- 34.70	Negatif Pozitif
D11	<i>Escherichia coli</i>	SA2812	FAM HEX	- 33.37	Negatif Pozitif
D12	dH ₂ O		FAM HEX	- 33.64	Negatif Pozitif
Dışlama Deneyi 2					
A1	Pozitif Kontrol (<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313)	ATCC 14028	FAM HEX	15.56 23.59	Pozitif Pozitif
A2	<i>Escherichia coli</i>	SA2814	FAM HEX	- 33.74	Negatif Pozitif

Ek B (devam) : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A3	<i>Escherichia coli</i>	SA2815	FAM	-	Negatif
			HEX	33.35	Pozitif
A4	<i>Escherichia coli</i>	SA2816	FAM	-	Negatif
			HEX	33.71	Pozitif
A5	<i>Escherichia coli</i>	SA2817	FAM	-	Negatif
			HEX	33.74	Pozitif
A6	<i>Escherichia coli</i>	SA2819	FAM	-	Negatif
			HEX	33.35	Pozitif
A7	<i>Enterobacter cloacae</i>	EC1	FAM	-	Negatif
			HEX	33.43	Pozitif
A8	<i>Citrobacter freundii</i>	EC26	FAM	-	Negatif
			HEX	33.08	Pozitif
A9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	EC5	FAM	-	Negatif
			HEX	33.71	Pozitif
A10	<i>Serratia marcescens</i>	EC79	FAM	-	Negatif
			HEX	34.21	Pozitif
A11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	EC78	FAM	-	Negatif
			HEX	33.58	Pozitif
A12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EC17	FAM	-	Negatif
			HEX	34.01	Pozitif
B1	<i>Hafnia alvei</i>	EC68	FAM	-	Negatif
			HEX	33.59	Pozitif
B2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	PL82450	FAM	-	Negatif
			HEX	33.91	Pozitif
B3	<i>Morganella morganii</i>	PL112028	FAM	-	Negatif
			HEX	33.99	Pozitif
B4	<i>Serratia marcescens</i>	920910 v	FAM	-	Negatif
			HEX	33.34	Pozitif
B5	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	FAM	-	Negatif
			HEX	33.47	Pozitif
B6	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022	FAM	-	Negatif
			HEX	33.79	Pozitif
B7	<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	FAM	-	Negatif
			HEX	33.40	Pozitif
B8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5590	FAM	-	Negatif
			HEX	33.86	Pozitif
B9	<i>Enterobacter cloacae</i>	SA5595	FAM	-	Negatif
			HEX	33.67	Pozitif
B10	<i>Morganella morganii</i>	SA5620	FAM	-	Negatif
			HEX	33.14	Pozitif
B11	<i>Serratia liquefaciens</i>	PL70291-2	FAM	-	Negatif
			HEX	33.39	Pozitif
B12	<i>Enterobacter aerogenes</i>	SA5632	FAM	-	Negatif
			HEX	33.68	Pozitif
C1	<i>Hafnia alvei</i>	PL70284-1	FAM	-	Negatif
			HEX	33.63	Pozitif
C2	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae</i>	ATCC11296	FAM	-	Negatif
			HEX	33.62	Pozitif
C3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182	FAM	-	Negatif
			HEX	33.71	Pozitif

Ek B (devam) : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
C4	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Pneumoniae</i>	ATCC13883	FAM HEX	- 33.37	Negatif Pozitif
C5	<i>S. minnesota</i>	mR5a	FAM HEX	- 33.34	Negatif Pozitif
C6	<i>S. typhimurium</i>	SARA1	FAM HEX	- 33.58	Negatif Pozitif
C7	<i>S. saintpaul</i>	SARA22	FAM HEX	- 33.44	Negatif Pozitif
C8	<i>S. heidelberg</i>	SARA30	FAM HEX	- 34.33	Negatif Pozitif
C9	<i>S. paratyphi B</i>	SARA41	FAM HEX	- 33.24	Negatif Pozitif
C10	<i>S. muenchen</i>	SARA63	FAM HEX	- 33.35	Negatif Pozitif
C11	<i>S. enteritidis</i>	27655	FAM HEX	- 33.55	Negatif Pozitif
C12	<i>S. paratyphi A</i>	SA4249	FAM HEX	- 33.85	Negatif Pozitif
D1	<i>S. paratyphi A</i>	RKS2907	FAM HEX	- 33.26	Negatif Pozitif
D2	<i>S. enteritidis</i>	RKS53	FAM HEX	- 33.49	Negatif Pozitif
D3	<i>S. paratyphi A</i>	RKS4993	FAM HEX	- 33.54	Negatif Pozitif
D5	<i>S. paratyphi A</i>	RKS4994	FAM HEX	- 33.54	Negatif Pozitif
D6	<i>S. paratyphi C</i>	RKS4620	FAM HEX	- 33.56	Negatif Pozitif
D7	<i>S. gallinarum</i>	RKS4994	FAM HEX	- 33.68	Negatif Pozitif
D8	<i>S. gallinarum</i>	RKS5021	FAM HEX	- 33.77	Negatif Pozitif
D9	<i>S. pullorum</i>	RKS5078	FAM HEX	- 33.53	Negatif Pozitif
D10	<i>S. pullorum</i>	RKS2242	FAM HEX	- 33.38	Negatif Pozitif
D11	<i>S. gallinarum</i>	RKS5079	FAM HEX	- 34.07	Negatif Pozitif
D12	dH ₂ O		FAM HEX	- 33.75	Negatif Pozitif
Dışlama Deneyi 3					
A1	Pozitif Kontrol (<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313)	ATCC 14028	FAM HEX	15.61 33.54	Pozitif Pozitif
A2	<i>S. dublin</i>	RKS4732	FAM HEX	- 33.46	Negatif Pozitif
A3	<i>S. dublin</i>	RKS4699	FAM HEX	- 33.59	Negatif Pozitif
A4	<i>S. agona</i>	SARB1	FAM HEX	- 33.59	Negatif Pozitif
A5	<i>S. derby</i>	SARB9	FAM HEX	- 33.36	Negatif Pozitif

Ek B (devam) : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
A6	<i>S. gallinarum</i>	SARB21	FAM HEX	- 33.57	Negatif Pozitif
A7	<i>S. haifa</i>	SARB22	FAM HEX	- 33.04	Negatif Pozitif
A8	<i>S. heidelberg</i>	SARB23	FAM HEX	- 33.98	Negatif Pozitif
A9	<i>S. indiana</i>	SARB25	FAM HEX	- 33.61	Negatif Pozitif
A10	<i>S. infantis</i>	SARB26	FAM HEX	- 33.09	Negatif Pozitif
A11	<i>S. miami</i>	SARB28	FAM HEX	- 33.54	Negatif Pozitif
A12	<i>S. montevideo</i>	SARB31	FAM HEX	- 33.40	Negatif Pozitif
B1	<i>S. newport</i>	SARB36	FAM HEX	- 33.22	Negatif Pozitif
B2	<i>S. newport</i>	SARB37	FAM HEX	- 33.21	Negatif Pozitif
B3	<i>S. newport</i>	SARB38	FAM HEX	- 33.26	Negatif Pozitif
B4	<i>S. panama</i>	SARB41	FAM HEX	- 33.36	Negatif Pozitif
B5	<i>S. paratyphi B</i>	SARB43	FAM HEX	- 33.78	Negatif Pozitif
B6	<i>S. paratyphi C</i>	SARB48	FAM HEX	- 33.49	Negatif Pozitif
B7	<i>S. pullorum</i>	SARB51	FAM HEX	- 33.37	Negatif Pozitif
B8	<i>S. reading</i>	SARB53	FAM HEX	- 33.43	Negatif Pozitif
B9	<i>S. rubislaw</i>	SARB54	FAM HEX	- 33.80	Negatif Pozitif
B10	<i>S. saintpaul</i>	SARB55	FAM HEX	- 33.70	Negatif Pozitif
B11	<i>S. schwarzengrund</i>	SARB57	FAM HEX	- 33.28	Negatif Pozitif
B12	<i>S. sendai</i>	SARB58	FAM HEX	- 33.56	Negatif Pozitif
C1	<i>S. senftenberg</i>	SARB59	FAM HEX	- 33.14	Negatif Pozitif
C2	<i>S. stanley</i>	SARB60	FAM HEX	- 33.51	Negatif Pozitif
C3	<i>S. stanleyville</i>	SARB61	FAM HEX	- 33.17	Negatif Pozitif
C4	<i>S. thompson</i>	SARB62	FAM HEX	- 33.53	Negatif Pozitif
C5	<i>S. typhisu</i>	SARB69	FAM HEX	- 33.52	Negatif Pozitif
C6	<i>S. wien</i>	SARB71	FAM HEX	- 33.72	Negatif Pozitif

Ek B (devam) : *Listeria monocytogenes* dışı türler ile yapılan Real Time-PCR çalışma sonucu.

Kuyucuk	Örnek Adı	Örnek Kodu	Işıma Alınan Kanal	Ct Değeri	Test Sonucu
C7	<i>Serratia marcesens</i>	M15	FAM HEX	- 33.38	Negatif Pozitif
C8	<i>Shigella flexneri</i>	M16	FAM HEX	- 33.38	Negatif Pozitif
C9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	M22	FAM HEX	- 33.54	Negatif Pozitif
C10	<i>E. coli K-12</i>	SAB3059	FAM HEX	- 33.68	Negatif Pozitif
C11	<i>S. typhimurium LT2</i>	1412	FAM HEX	- 33.42	Negatif Pozitif
C12	<i>S. muenchen</i>	SARA63	FAM HEX	- 33.64	Negatif Pozitif
D1	<i>S. decatur</i>	SARB8	FAM HEX	- 33.45	Negatif Pozitif
D2	<i>S. duisberg</i>	SARB15	FAM HEX	- 33.48	Negatif Pozitif
D3	<i>S. emek</i>	SARB20	FAM HEX	- 33.30	Negatif Pozitif
D4	<i>Salmonella spp.</i>	K1229	FAM HEX	- 33.62	Negatif Pozitif
D5	<i>Salmonella spp.</i>	K950	FAM HEX	- 33.44	Negatif Pozitif
D6	dH ₂ O		FAM HEX	- 33.33	Negatif Pozitif

Ek C : *Listeria monocytogenes* hassasiyet çalışması için ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	2970	9376	674	10050
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	4330	10612	210	10822
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	3950	11822	334	12156
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	2470	9472	1117	10589
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	3580	11461	459	11920
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	4820	10573	133	10706
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	3640	11232	426	11658
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	2110	12648	2162	14810
1140 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-9	1430	9908	3708	13616
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	836	6509	5715	12224
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	205	2133	10409	12542
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	436	4378	9002	13380
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	567	5475	8108	13583
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	827	6069	5403	11472
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	1340	7867	3291	11158
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	1010	6796	4496	11292
114 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	1320	8221	3554	11775
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	59.6	641	11504	12145

Ek C (devam) : *Listeria monocytogenes* hassasiyet çalışması için ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	9.18	112	13349	13461
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	41.8	494	12737	13231
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	116	1205	10842	12047
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	41.8	431	11109	11540
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0	0	12593	12593
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	11.3	151	14669	14820
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	14.4	151	11440	11591
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0.0714	1	15396	15397
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	24.8	417	18241	18658
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-9	61.6	863	14958	15821
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0	0	17795	17795
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-10	12.2	118	10547	10665
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-11	74.2	791	11316	12107
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-12	35.1	532	16382	16914
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0.432	5	12706	12711
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0.106	1	10386	10387
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-1	0.333	4	13207	13211
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0.708	7	10862	10869
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0.142	2	15522	15524

Ek C (devam) : *Listeria monocytogenes* hassasiyet çalışması için ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/µl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-2	0.336	4	13063	13067
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0	0	15769	15769
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-13	43.8	518	12749	13267
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0	0	15225	15225
11.4 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-14	44.6	638	15400	16038
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	0.163	2	13461	13463
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	0.205	3	16098	16101
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-3	0.0786	1	13989	13990
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	0.213	3	15468	15471
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-4	0	0	14357	14357
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DN-4	0.144	2	15238	15240
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	0.255	3	12937	12940
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	0.207	3	15963	15966
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-5	0.279	4	15778	15782
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	0.272	4	16165	16169
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	0.225	3	14625	14628
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-6	0.0689	1	15952	15953
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	0.0691	1	15911	15912
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-7	0.148	2	14894	14896

Ek C (devam) : *Listeria monocytogenes* hassasiyet çalışması için ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/μl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0.0679	1	16181	16182
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	0	0	10785	10785
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	0.0859	1	12795	12796
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-8	0.244	3	13517	13520
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-9	0.0934	1	11763	11764
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-9	0	0	12902	12902
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-9	0	0	13105	13105
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-10	0.171	2	12858	12860
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-10	0.36	4	12208	12212
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-10	0	0	14313	14313
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-11	0.177	2	12406	12408
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-11	0.0891	1	12333	12334
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-11	0.0845	1	13000	13001
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-12	0	0	12697	12697
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-12	0	0	11761	11761
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-12	0.377	4	11666	11670
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-13	0.165	2	13312	13314
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-13	0.22	3	14956	14959

Ek C (devam) : *Listeria monocytogenes* hassasiyet çalışması için ddPCR sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (kopya/µl)	Pozitif Droplet	Negatif Droplet	Kabul Edilen Droplet
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-13	0.245	3	13447	13450
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-14	0.298	3	11063	11066
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-14	0.178	2	12341	12343
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-14	0.0763	1	14400	14401
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-15	0	0	12177	12177
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-15	0	0	15105	15105
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-15	0.179	2	12249	12251
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-16	0.164	2	13433	13435
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-16	0	0	11345	11345
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-16	0.0798	1	13768	13769
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-17	0	0	11129	11129
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-17	0	0	13132	13132
1.14 kob bakteri ile kontamine 4 saat ön zenginleştirme uygulanmış 25 ml örnekten elde edilen DNA-17	0.387	4	11351	11355
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	0.0775	1	14185	14186



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Yeliz YÜCEL ÖZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2001, Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2003, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2022 yılında KrosGen Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme San. ve Tic. Ltd. Şti’nde Ar-Ge Sorumlusu olarak çalışmaya başlamıştır.
- 2014-2019 yılları arasında İontek İlaç Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. Ve Tic. A.Ş.’de Üretim Sorumlusu ve Kalite Sorumlusu olarak çalıştı.
- 2010-2014 yılları arasında İontek İlaç Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. Ve Tic. A.Ş.’de Ar-Ge Sorumlusu ve Kalite Sorumlusu olarak çalıştı.
- 2003-2010 yılları arası İontek İlaç Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. Ve Tic. A.Ş.’de Ar-Ge Personeli olarak çalıştı.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Öz, Y. Y., Sönmez, Ö. İ., Karaman, S., Öz, E., Unal, C. B., & Karataş, A. Y.** (2020). Rapid and sensitive detection of Salmonella spp. in raw minced meat samples using droplet digital PCR. *European Food Research and Technology*, 246(10), 1895-1907.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Kurt, S., Öz, E., Aşkın, Ö. E., & **Öz, Y. Y.** (2018). Classification of nucleotide sequences for quality assessment using logistic regression and decision tree approaches. *Neural Computing and Applications*, 29(8), 251-262.

Öz, E., Kurt, S., Asyalı, M. H., Kaya, H., & **Yücel, Y.** (2016). Feature based quality assessment of DNA sequencing chromatograms. *Applied Soft Computing*, 41, 420-427.

Bilenoğlu, O., Altındış, M., Öz, E., **Yücel-Öz, Y.**, İrigül-Sönmez, Ö., & Ünal, C. B. (2015). Detailed polymorphism study on cytomegalovirus DNA polymerase gene to reveal the most suitable genomic targets for quantitative Real-time PCR. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(3), 28.

PROJELER

1511 ARGE, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ

Gıda Patojenleri İçin Dijital PCR Kitlerinin Geliştirilmesi

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)

01 Mayıs 2013, 01 Haziran 2016

1511 ARGE, ARAŞTIRMACI

Multipl Myeloma İçin Hızlı ve Hassas Bir Yöntemle Tanı Kiti Geliştirilmesi

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)

01 Temmuz 2014, 01 Haziran 2016

1511 ARGE, ARAŞTIRMACI

Kistik Fibroz İçin Yeni Nesil Sekanslama Yöntemiyle Tanı Kiti Geliştirilmesi

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)

01 Temmuz 2014, 01 Aralık 2015

1511 ARGE, ARAŞTIRMACI

Tromboza Yatkınlığı Belirleyici Genetik Markörleri Saptamaya Yönelik Pyrosekans Kiti Geliştirilmesi

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)

01 Kasım 2014, 01 Ekim 2015

KOSGEB, ARAŞTIRMACI

Pcr Hazırlığı Yapabilen Otomatik DNA İzolasyon Cihaz Üretimi

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: KOSGEB İSTANBUL İKİTELLİ HİZMET MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜ (Yurt İçi)

01 Ekim 2011, 01 Ekim 2012

TÜBİTAK TEYDEB, ARAŞTIRMACI

Yüksek Başarımlı Biyoinformatik Platformu

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)
01 Ocak 2008, 01 Haziran 2009

TÜBİTAK TEYDEB, ARAŞTIRMACI

Ailesel Kanser Tanısında Uzman Sistem Uygulaması: Diagnus-BRCA., Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)
01 Ocak 2008, 01 Aralık 2008

TÜBİTAK TEYDEB, ARAŞTIRMACI

Luminex Xmap Platformu Üzerinde Beta-Talasemi Mutasyon Saptama Kiti Geliştirilmesi

Yürütülen Kuruluş: İONTEK İLAÇ TANI VE BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNLERİ AR-GE SAN. VE TİC. A.Ş.

Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi)
01 Temmuz 2007, 01 Aralık 2008