

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GIDALARDA BULUNAN ÇEŞİTLİ BAKTERİLER İÇİN TÜRE
ÖZGÜ PRİMERLERİN DİZAYN EDİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İbrahim ERGÜN

DANIŞMAN
PROF. DR. MUHSİN AYDIN

ADİYAMAN, 2025

ÖZET

Gıdalarda Bulunan Çeşitli Bakteriler İçin Türe Özgü Primerlerin Dizayn Edilmesi

İbrahim ERGÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2025, Sayfa: 38

Danışman: Prof. Dr. Muhsin AYDIN

Bu çalışma, gıda güvenliği açısından kritik öneme sahip olan patojen bakterilerin hızlı, spesifik ve hassas bir şekilde tespit edilmesi amacıyla türe özgü primerler tasarlamayı ve bu primerlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği kullanılarak laboratuvar koşullarında etkinliğini değerlendirmeyi hedeflemiştir. Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi, halk sağlığının korunması ve gıda endüstrisinin güvenilirliğinin sürdürülebilirliği açısından bu tür moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışmada, özellikle *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria* spp. ve *Bacillus* spp. ait önemli bakteri türlerine yönelik primer dizaynları yapılmış ve bu primerlerin spesifikliği, duyarlılığı ve amplifikasyon verimliliği deneysel olarak test edilmiştir. Primer tasarımı 16S rRNA geni gibi korunmuş bölgelerin yanı sıra türe özgü genler (örneğin *bceT*, *cytK*, *prs*, *iap*, *iroN* ve *uspA*) hedef alınmıştır. Primerlerin optimizasyonu için farklı bağlanma sıcaklıkları (annealing) ve PZR koşulları denenmiş, başarılı sonuçlar elde edilen primerler belirlenmiştir.

Bu çalışmada, *Bacillus* türlerinin tespiti için tasarladığımız *bceT* genine özgü primerler, 51°C bağlanma sıcaklığında başarılı bir şekilde amplifikasyon sağlamıştır. Ancak aynı bakteriler için hazırladığımız *cyt/hk* ve *tuf* gen primerleri beklenen sonucu vermediği gözlemlenmiştir, yani bu primerler hedef DNA'yı çoğaltamamıştır. *Salmonella* Typhimurium analizlerde ise farklı genler için değişen sonuçlar alınmıştır. *iroN* geni 54°C'de güzel bir şekilde çalışırken, *bigA* geni için 57°C ve 59°C sıcaklıkların daha uygun olduğu saptanmıştır. *iap* geni ise ilginç bir durum gösterdi; standart PZR'da sonuç alınamamış olup gradient PZR yöntemiyle başarılı olunmuştur.

Listeria monocytogenes identifikasyonu için geliştirilen *iap* ve *prs* gen primerleri, çalışılan tüm deneysel parametrelerde amplifikasyon gerçekleştirememiştir. Bu durum, primer sekanslarının yeniden optimize edilmesi gerekliliğini veya hedef bölgelerdeki genetik polimorfizmleri düşündürmektedir. *Escherichia coli* tanımlamasında kullanılan *uspA* geni primerleri, literatürde belirtilen protokole uygun olarak başarılı şekilde çalışmış ve bu genin tür spesifik tanımlamada güvenilir bir moleküler markır olduğu doğrulanmıştır.

Elde edilen bulgular, tasarlanan primer setlerinin bir bölümünün gıda kaynaklı patojenlerin tanımlanmasında etkili olduğunu, ancak bazı primerlerin fizikokimyasal parametreler açısından yeniden optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Gıda kaynaklı patojen tespiti; Türe özgü primer tasarımı; PZR optimizasyonu; Moleküler tanılama

ABSTRACT

DESIGNING SPECIES-SPECIFIC PRIMERS FOR VARIOUS BACTERIA FOUND IN FOODS

İbrahim ERGÜN

Department of Biology

Adıyaman University, Graduate Education School, July/2025, Page: 38

Supervisor: Prof. Dr. Muhsin AYDIN

This study aimed to design species-specific primers for the rapid, specific, and sensitive detection of pathogenic bacteria that are critically important for food safety, and to evaluate their effectiveness under laboratory conditions using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The development of such molecular diagnostic methods is of great importance for preventing foodborne illnesses, protecting public health, and ensuring the sustainability of food industry reliability. The study focused on designing primers for significant bacterial species, particularly *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria* spp., and *Bacillus* spp., and experimentally evaluated their specificity, sensitivity, and amplification efficiency. In primer design, conserved regions such as the 16S rRNA gene were targeted alongside species-specific genes (e.g., *bceT*, *cyt/hk*, *prs*, *iap*, *iroN*, and *uspA*). Optimization was performed by testing different annealing temperatures and PCR conditions to identify primers yielding successful results.

In this study, the *bceT*-specific primers designed for *Bacillus* spp. successfully amplified the target at an annealing temperature of 51°C. However, the *cytK* and *tuf* gene primers for the same bacteria failed to produce the expected results, indicating no amplification of the target DNA. For *Salmonella* Typhimurium, varying results were obtained for different genes. While the *iroN* gene amplified effectively at 54°C, the *bigA* gene performed optimally at 57°C and 59°C. The *iacP* gene exhibited an interesting outcome which indicated that standard PCR failed to yield results, but successful amplification was achieved using gradient PCR. For *Listeria monocytogenes*, the *iap* and *prs* gene primers did not produce amplification under any tested experimental conditions. This suggests the need for primer sequence reoptimization or indicates potential genetic polymorphisms in the target regions. In contrast, the *uspA* gene primers for *Escherichia coli* performed successfully following the protocol specified in the literature, confirming this gene's reliability as a species-specific molecular marker.

The findings demonstrate that while some of the designed primer sets were effective in identifying foodborne pathogens, others require reoptimization of physicochemical parameters.

Keywords: Foodborne pathogen detection; Species-specific primer design; PCR optimization; Molecular diagnostics

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışma sürecimin her aşamasında sabırla bilgi birikimi ve tecrübelerini paylaşarak bana rehberlik eden saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Muhsin AYDIN'a teşekkür ederim.

Eğitim sürecimde ders aldığım, bilgi ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI, Prof. Dr. Mustafa COŞKUN ve Prof. Dr. Yusuf SEVGİLER hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarında yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle yüksek lisans öğrencisi Berfin Berin KIZILDELI ve lisans öğrencisi Seher SAYGI'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında ve eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen, daima yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen canım eşime ve çocuklarıma sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım

....../....../20....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

(İmza)

.....

(Öğrencinin Adı ve SOYADI)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Gıdalarda Bulunan Farklı Bakterilere Özgü Primer Dizaynı: Teorik Temeller ve Uygulamalı Yaklaşımlar	3
2.2. Dizayn Edilecek Primerlerin Göz Önünde Bulundurulması Gereken Fizikokimyasal Özellikleri	5
2.3. Primer-Dimer ve Sekonder Yapılar	6
2.4. Gıda Kaynaklı Bakterilere Özgü Primerler	6
2.5. Korunmuş Dizilerin Avantaj ve Sınırlılıkları	6
2.6. Primer Dizayn Etme ve Geliştirme Süreci.....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	8
3.1.1. Buzdolabı.....	8
3.1.2. Etüv.....	8
3.1.3. Termal döngüleyici (thermal cycler).....	8
3.1.4. Sıcak su banyosu.....	8
3.1.5. Soğutmalı santrifüj.....	8
3.1.6. Elektroforez ve güç kaynağı.....	8

3.1.7. Otoklav.....	8
3.1.8. Mikropipetler (otomatik pipetler)	9
3.1.9. UV jel görüntüleme kabini.....	9
3.1.10. Güvenlik kabini.....	9
3.1.11. Mikrodalga fırın.....	9
3.1.12. Blender.....	9
3.1.13. Kaba terazi.....	9
3.1.14. Hassas terazi.....	10
3.1.15. Karıştırıcı (vortex).....	10
3.1.16. Isıtıcıli manyetik karıştırıcı.....	10
3.2. Kullanılan Kimyasallar	10
3.2.1. Tryptic soy broth.....	10
3.2.2. Trptic soy agar (trypticase soy agar, soybean casein digest agar veya CASO agar).....	10
3.2.3. Agaroz.....	10
3.2.4. Ethidium bromür (EtBr).....	10
3.2.5. 10X Tris-borate-EDTA (10X TBE).....	10
3.2.6. Loading dye (yükleme boyası).....	10
3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'da kullanılan çözeltiler.....	10
3.2.7.1. MgCl ₂	10
3.2.7.2. Nükleotit karışımı (dNTP mix).....	10
3.2.7.3. Taq polimeraz tamponu 10X.....	10
3.2.7.4. Deiyonize su (dH ₂ O).....	10
3.2.7.5. Taq polimeraz.....	10
3.2.7.6. Master mix.....	10
3.2.7.7. Primerler.....	10

3.2.7.8. DNA belirteci (DNA markırı).....	10
3.3. İzolatların Temini	13
3.4. Saf Bakteri Kùltürlerinin Canlandırılması.....	13
3.5. Saf Bakteri Kùltürlerinden DNA'nın İzolasyonu ve Belirlenmesi.....	13
3.6. DNA İzolatlarında Tasarlanan Primerlerin Kullanımı ile Molekùler İdentifikasyon.....	13
3.7. PZR Ürünlerinin AgaroZ Jelde Yürütùlmesi	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	18
4.1. DNA İzolatlarında Tasarlanan Primerlerin Optimize Edilmesi.....	18
4.1.1. <i>bceT</i> , <i>cyt/hk</i> ve <i>tuf</i> genlerinin optimizasyonu.....	10
4.1.2. <i>bigA</i> ve <i>iapP</i> genlerinin optimizasyonu.....	10
4.1.3. <i>iroN</i> geninin optimizasyonu.....	10
4.1.4. <i>iap</i> ve <i>prs</i> genlerinin optimizasyonu.....	25
4.1.5. <i>uspA</i> geninin çalışılması.....	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
KAYNAKÇA	31
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Gıdalarda Bulunan Bazı Bakterilere Yönelik Tasarlanan ve Denenen Primerler	12
Çizelge 3.2. Bakteri DNA izolatlarında çalışılan primerlere ait optimize edilmiş PZR amplifikasyon koşulları	14
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> DNA izolatlarının singlepleks olarak çalışılmasına ait optimizasyon sonuçları	20
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> DNA izolatlarının multipleks olarak çalışılmasına ait optimizasyon sonuçları	21
Çizelge 4.3. <i>Salmonella</i> Typhimurium ve <i>E. coli</i> DNA izolatlarının multipleks olarak çalışılmasına ait optimizasyon sonuçları	23
Çizelge 4.4. <i>Salmonella</i> spp.'nin teşhis ve tespiti için tasarlanan <i>iroN</i> genine ait optimizasyon sonuçları	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>bceT</i> , <i>cyt/hk</i> ve <i>tuf</i> genlerinin PZR sonrası jel görüntüleri.....	19
Şekil 4.2. Gradient PZR sonucu <i>iacP</i> genine ait oluşan amplikon görüntüsü.....	23
Şekil 4.3. <i>iroN</i> genine ait amplikon görüntüsü.....	24



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>bceT</i>	: <i>Bacillus cereus</i> enterotoksin T geni
<i>bigA</i>	: <i>Salmonella</i> adezin geni
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
bp	: Baz çifti (Base Pair)
<i>cytK</i>	: <i>B. cereus</i> sitolizin K toksini geni
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozit trifosfat (DNA sentezi için yapı taşları)
EMBL	: Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (European Molecular Biology Laboratory)
ESBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (Extended-Spectrum Beta-Lactamase)
EtBr	: Etidyum Bromür (DNA boyası)
GC içeriği	: Guanin-Sitozin baz çifti oranı
HACCP	: Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard Analysis and Critical Control Points)
HGT	: Yatay Gen Transferi (Horizontal Gene Transfer)
<i>iacP</i>	: <i>Salmonella</i> Typhimurium virülans geni
<i>iap</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i> hücre bölünmesi ile ilişkili gen
<i>iroN</i>	: <i>Salmonella</i> spp.'de demir alımı ile ilişkili gen
MDR	: Çoklu İlaç Direnci (Multidrug Resistance)
MGE	: Mobil Genetik Element (Mobile Genetic Element)
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<i>prfA</i>	: <i>L. monocytogenes</i> virülans düzenleyici gen

<i>prs</i>	: Fosforibozil pirofosfat sentetaz geni
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
SNV	: Tek Nükleotid Varyantı (Single Nucleotide Variant)
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu (Elektroforez için)
T _m	: Erime sıcaklığı (Melting Temperature)
TSA	: Triptik Soy Agar (Bakteriyel kültür besiyeri)
TSB	: Triptik Soy Broth (Sıvı bakteri kültür ortamı)
TT3SS	: Tip III Sekresyon Sistemi (Type III Secretion System)
<i>tuf</i>	: Termal kararsız uzama faktörü geni
UPEC	: Üropatojenik <i>Escherichia coli</i> (Urinary Pathogenic <i>E. coli</i>)
<i>uspA</i>	: <i>E. coli</i> universal stres proteini geni

1. GİRİŞ

Gıda güvenliği, gıda ürünlerinin üretiminden tüketimine kadar olan tüm aşamalarda kalite ve hijyenin sağlanmasını hedefleyen; insan sağlığı, toplum refahı ve ekonomik istikrar açısından son derece kritik bir konudur. Güvensiz gıdaların tüketimi, sadece birey sağlığını değil, aynı zamanda toplum sağlığını da tehdit ederek geniş çaplı halk sağlığı krizlerine yol açabilmekte; bununla birlikte gıda üreticilerinin güvenilirliğini zedeleyerek sektörde ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Tong ve Zhang, 2019; Unnevehr ve Hoffmann, 2015). Bu bağlamda, gıda güvenliği sorumluluğu yalnızca üreticilerin değil; aynı zamanda dağıtıcıların, tüketicilerin ve ilgili tüm paydaşların ortak yükümlülüğüdür (Fung vd., 2018).

Gıda üretiminin ve tüketiminin küresel ölçekte artış göstermesi, gıda kaynaklı hastalıkların yayılımını da beraberinde getirmiştir. Gıda kaynaklı patojenler; bakteri, virüs, mantar ve protozoa gibi çeşitli mikroorganizmaları içermekte olup, genellikle kontamine gıda ve su yoluyla insana bulaşmaktadır. Son on yılda, özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu patojenlerin neden olduğu hastalıklarda gözle görülür bir artış yaşanmıştır (Bintsis, 2017). *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Toxoplasma gondii* ve *Norovirus* gibi mikroorganizmalar, sık karşılaşılan gıda kaynaklı patojenler arasında yer almaktadır (Alocilja ve Radke, 2003; Chemburu vd., 2005; Safavieh vd., 2015; Velusamy vd., 2010). Bu patojenler; pişmemiş et, çiğ süt, sebzeler ve kontaminasyona açık üretim süreçleri aracılığıyla gıda zincirine karışabilmektedir. Özellikle süt, krema ve et ürünleri gibi bazı gıdalar, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi bakteriler açısından yüksek risk taşımaktadır (Huang vd., 2021; Matle vd., 2020).

Gıda güvenliğini tehdit eden bu mikroorganizmaların tespiti için uzun yıllar boyunca konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılmış olsa da bu yöntemler zaman alıcı olup, sonuçların alınması günler hatta haftalar sürebilmektedir (Law vd., 2015). Dolayısıyla hem halk sağlığını korumak hem de hızlı müdahale mekanizmaları geliştirebilmek adına, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için hızlı, güvenilir ve spesifik moleküler yöntemlerin geliştirilmesi kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu bağlamda, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı tanı sistemleri, patojenlerin erken ve kesin tanımlanmasında giderek artan oranda kullanılmaktadır. Özellikle türe özgü primerlerin kullanımı, PZR'ın hassasiyet ve özgüllüğünü artırmakta; böylece çapraz reaksiyon riskleri azaltılarak sadece hedef patojenin tespiti sağlanabilmektedir (Aydın vd., 2018; Bispo vd., 2023).

Gıda güvenliğini sağlamak adına dünya genelinde uygulanan HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) sistemleri, hijyen standartları ve uluslararası gıda kodeksleri gibi programlar önemli gelişmeler sunmuş olsa da bu sistemlerin etkinliği büyük ölçüde doğru ve hızlı tespit yöntemlerine dayanmaktadır (Awuchi, 2023; Dlamini ve Adetunji, 2023). Bu doğrultuda, patojenik bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanabilmesi için yeni nesil primer dizaynlarının geliştirilmesi, gıda güvenliğinin izlenmesi ve korunmasında önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, halk sağlığını tehdit eden bakterilerin tespiti için türe özgü primerler tasarlamak ve bu primerlerin PZR tekniğı kullanılarak laboratuvar koşullarında etkinliğini değerlendirmektir. Bu doğrultuda, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.* ve *Bacillus spp.* suşlarına özgü primer dizaynlarının yapılması ve bu dizaynların deneysel validasyonu, gıda güvenliğini güçlendirecek moleküler tanı araçlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gıdalarda Bulunan Farklı Bakterilere Özgü Primer Dizaynı: Teorik Temeller ve Uygulamalı Yaklaşımlar

Gıda kaynaklı hastalıklar, tüm dünya genelinde halk sağlığını ciddi anlamda tehdit eden sorunlar arasında yer almaktadır (Elbehiry vd., 2023). Bu hastalıklar genellikle *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Norovirus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Toxoplasma gondii* gibi patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulmakta ve bu patojenler kontamine su ve gıdalar aracılığıyla insanlara bulaşmaktadır (Alocilja ve Radke, 2003; Bintsis, 2017; Klištincová vd., 2024; Kürekci vd., 2017).

Son yıllarda gıda kaynaklı hastalık vakalarındaki artış, gıda güvenliği konusundaki duyarlılığı da beraberinde getirmiştir (Madilo vd., 2023). Güvensiz gıda tüketimi hem bireysel sağlık sorunlarına yol açmakta hem de toplum sağlığını ve ekonomik dengeleri tehdit etmektedir. Toplu gıda zehirlenmeleri gibi durumlar, kamu sağlığı krizi oluşturabilmekte ve gıda endüstrisinin itibarını zedeleyerek ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Zahir vd., 2025). Bu sorunların önlenmesi için hem geleneksel hijyen ve sanitasyon uygulamaları hem de moleküler biyoloji teknikleri ile desteklenmiş bilimsel yaklaşımlar önem arz etmektedir. Gıda kaynaklı patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde tespiti, gıda güvenliği çalışmalarının merkezinde yer almaktadır (Farrukh vd., 2025). Bu bağlamda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler teknikler üzerinden gerçekleştirilen bakteriyel DNA'nın tespiti hem hızlı hem de spesifik tanıya olanak sağlamaktadır (Mangal vd., 2016; Park vd., 2014).

PZR tabanlı tanılamada çalışmanın en kritik aşamalarından biri primer tasarımıdır. Primerler, DNA amplifikasyonunun başlaması için gereken özgül dizileri içeren kısa nükleotid dizileridir ve çalışmanın duyarlılığını ve özgüllüğünü belirler. Doğru primer tasarımı ile gıda kaynaklı bakteriler hızlı, doğru ve spesifik olarak tespit edilebilmektedir (Aydin vd., 2018; Zhang vd., 2022).

Gıda kaynaklı bakterilere yönelik primer tasarımında sıklıkla 16S rRNA geni hedef alınmaktadır (Zhang vd., 2020). Bu gen, tüm bakterilerde bulunan ve içeriğindeki değişken bölgeler aracılığıyla tür ayırma izin veren bir moleküler işaretleme bölgesidir (Velusamy vd., 2010). 16S rRNA dizileri, birden fazla bakteri türü için referans olarak kullanılabilir ve bu diziler içinde yer alan korunmuş bölgeler, çok sayıda türü kapsayan evrensel

primerlerin geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Ancak evrensel primerlerin kullanımı bazen yakın akraba bakteri türleri arasında spesifik ayırım yapamayabilir. Bu durumda, sadece hedef bakteri türünü tanımlamak üzere dizayn edilen türe özgü primerlerin tasarımı çözüm sunar (Church vd., 2020). Bu amaca ulaşmak için hedef organizmaya ait DNA dizileri ile diğer türlerin dizileri karşılaştırılarak, benzersiz diziler belirlenir ve bu dizilere spesifik olarak bağlanan primerler tasarlanır.

Primer tasarımında önemli parametreler şunlardır: primer uzunluğu, GC içeriği, erime sıcaklığı (T_m), ikincil yapı oluşumu (hairpin ve dimer yapılar) ve amplikon uzunluğu. Genel olarak primer uzunluğu 18-25 baz çifti aralığında tercih edilir. GC içeriği %40-60 arasında olmalı, T_m de çiftler arasında 2-3°C'den fazla fark göstermemelidir. Primer-dimer ya da kendi kendine tamamlayıcılıktan kaynaklı ikincil yapılar, amplifikasyonu engelleyebileceği için tasarım aşamasında yazılım destekli analizler mutlaka yapılmalıdır (Kumar ve Chordia, 2015; Lorenz, 2012). Primerlerin tasarlandığı hedef dizinin güncel ve doğruluğu onaylanmış veritabanlarından (NCBI ve EMBL gibi) alınması da önemlidir. GenBank veri tabanından elde edilen hedef gen dizileri, Clustal Omega gibi bioinformatik araçlarla çoklu dizilim analizi yapılarak korunmuş ve değişken bölgeler tespit edilir (V. Sharma vd., 2024; Shirshikov vd., 2019). Türe özgü primerler bu analizler sonucunda belirlenen benzersiz dizilere odaklanarak oluşturulur.

Gıda kaynaklı bakterilerin tanımında kullanılacak primerlerin validasyonu da en az tasarım kadar kritik bir aşamayı oluşturmaktadır. Öncelikle *in silico* analizlerle spesifikliği ve duyarlılığı test edilen primerler, daha sonra gerçek bakteriyel DNA örnekleri üzerinde PZR ile denenir (Aydin vd., 2018; Kumar ve Chordia, 2015). Amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelenerek hedef uzunlukta bant oluşumu gözlenir. Uygun kontrol grupları kullanılarak negatif ve pozitif kontrol testleriyle özgül tespit doğrulanır.

Sonuç olarak, gıda kaynaklı bakteriler için türe özgü primerlerin dizaynı ve bu primerlerin PZR temelli tanılama sistemlerinde test edilmesi hem halk sağlığının korunması hem de gıda endüstrisinde kalite güvencesi sağlanması açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu çalışma, söz konusu bakterilerin hızlı, duyarlı ve doğruluğu yüksek bir şekilde tespiti için bilimsel bir temel sunmayı amaçlamaktadır.

Gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi hem halk sağlığının korunması hem de gıda sanayisinin güvenilirliğinin sürdürülebilirliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu hastalıklara neden olan mikroorganizmaların hızlı, spesifik ve hassas biçimde tespit

edilmesi, modern moleküler biyoteknolojik tekniklerin gelişmesiyle mümkün hale gelmiştir (Aladhadh, 2023). Bu tekniklerin başında gelen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), doğru primer tasarımı sayesinde gıdalardaki patojen bakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu literatür özetinde, gıda kaynaklı bakterilere özgü primerlerin tasarımına ilişkin temel ilkeler, kullanılan moleküler hedefler ve teknik zorluklar detaylı şekilde ele alınmaktadır.

Primerler, PZR reaksiyonlarının başlatıcısı olan kısa nükleotid dizileridir ve hedef DNA bölgesine özgül bağlanarak amplifikasyonun yönünü belirlerler. Primerlerin özgüllüğü, yalnızca hedef mikroorganizmanın DNA'sına bağlanarak spesifik amplifikasyonun gerçekleşmesini sağlar. Bu bağlamda, gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde kullanılan primerlerin dizaynı, teşhisin doğruluğunu ve güvenilirliğini doğrudan etkileyen temel bir faktördür (Clarridge, 2004; Clermont vd., 2013; Liu vd., 2012).

Bakteriyel tanımlamada yaygın olarak tercih edilen moleküler hedeflerden biri, 16S ribozomal RNA (rRNA) genidir (Church vd., 2020; Marchesi vd., 1998). Bu gen, evrimsel açıdan oldukça korunmuş olup, türler arasında ayırt edici değişken bölgeler içermesi sayesinde hem evrensel hem de tür düzeyinde spesifik primerlerin tasarlanmasına olanak tanır. 16S rRNA geninde özellikle V1–V9 bölgeleri gibi değişken bölgeleri çevreleyen korunmuş bölgeler, primer bağlanması için uygun hedefler sunar (Myer vd., 2016).

Primer tasarımında ilk adım, hedeflenen bakteriyel gruba ait 16S rRNA dizilerinin çoklu dizilim hizalaması (multiple sequence alignment) ile korunmuş bölgelerin belirlenmesidir. Bu korunmuş bölgelerden seçilen diziler, universal ya da spesifik primerler için şablon görevi görür. Bu yaklaşım hem geniş spektrumlu hem de hedefe özel tespitlerde başarılı sonuçlar vermektedir (Aydin vd., 2018; Clarridge, 2004; Clermont vd., 2013).

2.2. Dizayn Edilecek Primerlerin Göz Önünde Bulundurulması Gereken Fizikokimyasal Özellikleri

Primer tasarımında ideal uzunluk genellikle 18-25 baz çifti (bp) arasında ve genellikle 20 bp civarında olmalıdır. Daha kısa primerler spesifiklik kaybına, daha uzun primerler ise verimsiz amplifikasyona neden olabilir. GC içeriği ise %40-60 aralığında tutulmalıdır. GC içeriği, erime sıcaklığı (T_m) üzerinde doğrudan etkili olduğu gibi, DNA-primere bağlanma kararlılığını da belirler (Bustin ve Huggett, 2017). Yüksek GC içeriği, bağlanmanın daha kararlı olmasına neden olabilir; ancak çok yüksek oranlar primerin

ikincil yapılar oluşturma olasılığını da artırır (Kumar ve Chordia, 2015; Lorenz, 2012). Bağlanma sıcaklığı (T_a), primerin hedef dizisine bağlandığı sıcaklıktır ve genellikle T_m 'nin 3–5 °C altına ayarlanır. Primer çiftlerinin birbirine yakın T_m değerlerine sahip olması, simetrik ve verimli amplifikasyon için gereklidir.

2.3. Primer-Dimer ve Sekonder Yapılar

Primer-dimer oluşumu, primerlerin birbirine tamamlayıcı dizilere sahip olması durumunda meydana gelir ve amplifikasyonun verimini ciddi şekilde düşürür. Özellikle 3' uçlarında tamamlayıcılık bulunan primerler, polimeraz tarafından uzatılabileceği için yanlış sinyallere neden olabilir (Lorenz, 2012; Yang vd., 2020). Bu sorunu önlemek için tasarım sırasında:

- 3' uçlarında palindromik dizilerden kaçınılmalı,
- Self-complementarity ve cross-complementarity analizleri yapılmalı,
- Yazılım araçları (örneğin Primer3, OligoAnalyzer) kullanılarak sekonder yapı analizleri yapılmalıdır.

2.4. Gıda Kaynaklı Bakterilere Özgü Primerler

Gıda patojenlerine özgü primerlerin tasarımında, yalnızca hedef türü tanıyacak şekilde dizayn edilmiş olmasına dikkat edilmelidir. Bu, özellikle *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 gibi yaygın patojenlerde daha da önem kazanmaktadır. Bazı durumlarda 16S rRNA dışında özgün gen bölgeleri de (örneğin *invA* geni - *Salmonella*, *hlyA* geni - *L. monocytogenes*) primer hedefi olarak kullanılabilir (Chen vd., 2017; Kumar vd., 2015). Bu durumda tür özgüllüğü daha da artar ancak genetik varyasyon riski de yükselir. Primerlerin in silico doğrulama süreçlerinde BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) gibi araçlar kullanılarak çapraz reaktivite analizleri yapılmalıdır (Kumar ve Chordia, 2015).

2.5. Korunmuş Dizilerin Avantaj ve Sınırlılıkları

Korunmuş dizilere dayalı primer tasarımı, geniş spektrumlu tespit yapılmasına olanak tanır. Bu sayede aynı primer setiyle farklı bakteriyel türler aynı anda taranabilir (Barghouthi, 2011). Ancak, bu durum bazı sınırlamaları da beraberinde getirir:

- Yakın türler arasında ayırım yapılamayabilir.
- Farklı türlere ait DNA'lar eş zamanlı olarak amplifiye olabilir (çapraz reaktivite).

- Bazı türler içinde bulunan genetik varyantlar gözden kaçabilir.

Bu nedenle uygulamanın amacına göre primer dizaynı yapılmalıdır. Şüpheli örneklerde doğrulayıcı testler veya tür-spesifik genlerin hedeflenmesi önerilir (Goldberg vd., 2016; Zimoń vd., 2024).

2.6. Primer Dizayn Etme ve Geliştirme Süreci

- a. Hedef Gen Belirleme: 16S rRNA veya tür-spesifik genler seçilir.
- b. Dizi Toplama ve Hizalama: GenBank gibi veri tabanlarından elde edilen diziler hizalanarak korunmuş bölgeler tanımlanır.
- c. Primer Tasarımı: Primer3, NCBI Primer-BLAST gibi araçlarla primer çiftleri oluşturulur.
- d. *In Silico* Analiz: BLAST ile özgüllük kontrolü, OligoAnalyzer ile sekonder yapı analizi yapılır.
- e. *In Vitro* Testler: Tasarlanan primerler laboratuvar ortamında gerçek örneklerle test edilerek doğrulanır.

Gıda kaynaklı bakterilere özgü primer tasarımı, hem moleküler tanı süreçlerinin hassasiyetini artırmakta hem de gıda güvenliği alanında hızlı, doğru ve ekonomik çözümler sunmaktadır (Aydin vd., 2018; Kabiraz vd., 2023). Özellikle 16S rRNA genine dayalı primer tasarımları, geniş bakteri yelpazesini hedefleyebilme avantajı sunsa da tür düzeyinde doğruluk için dikkatli optimize edilmeleri gerekmektedir (Clarridge, 2004). Primerlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin doğru analiz edilmesi, çapraz reaktivitenin önlenmesi ve laboratuvar doğrulama süreçlerinin dikkatle yürütülmesi, yüksek güvenilirlikte PZR temelli teşhis sistemlerinin temel taşlarını oluşturmaktadır (Bhatia, 2024; Yang vd., 2020). Gelecekte daha da gelişen dizayn algoritmaları ve yapay zekâ destekli biyoinformatik araçlarla özgün primer tasarımı süreçleri daha hızlı, etkili ve hatasız bir hâle gelebileceği öngörülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

3.1.1. Buzdolabı

PZR için gerekli primerler, Taq Polimeraz, dNTPs, Buffer, MgCl₂, Marker, su ile bakteri örneklerinin saklandığı üst bölümü -20°C olan ve alt bölümü +4°C olan Arçelik marka buzdolabı kullanılmıştır.

3.1.2. Etüv

Bakterilerin çoğaltılması için NÜVE marka EN-120 model etüv kullanılmıştır.

3.1.3. Termal döngüleyici (thermal cycler)

Örneklerden elde edilen tüm DNA'ların çoğaltımında APPLIED BIOSYSTEMS marka Veriti modeli kullanılmıştır.

3.1.4. Sıcak su banyosu

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonu için kaynatma işleminde WISEBATH marka su banyosu kullanılmıştır.

3.1.5. Soğutmalı santrifüj

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonunda Hettich ZENTRİFUGEN marka UNIVERSAL 320 R model Santrifüj cihazı kullanılmıştır.

3.1.6. Elektroforez ve güç kaynağı

DNA ampikonlarının agaroz jellerde elektriksel yük zıtlığına bağlı olarak boyutları doğrultusunda ilerlemesi için sağlamak için THERMO marka Scientific EC 1000 XL model elektroforez güç kaynağı ve elektroforez teknesi (yatay) kullanılmıştır.

3.1.7. Otoklav

Besiyerlerin hazırlanması, DNA izolasyonun yapıldığı bakteri kalıntılarının sterilizasyonunda WiseClave marka otoklav kullanılmıştır.

3.1.8. Mikropipetler (otomatik pipetler)

PZR yükleme örneklerinin hazırlanması, PZR tüplerine yüklenmesi ve agaroz jele yükleme yapılması gibi sıvı örneklerin ölçülmesinde farklı hacimleri (0,1-2 µL, 2-20 µL, 20-100 µL ve 100-1000 µL) kapasiteli Gilson marka mikropipetler kullanılmıştır.

3.1.9. UV jel görüntüleme kabini

Agaroz jel içinde amplikonların hareket etme seviyelerini ölçerek büyüklüklerini saptamak için Vilber Lourmat marka UV Jel Görüntüleme Kabini kullanılmıştır.

3.1.10. Güvenlik kabini

Besiyerlerin petrilere dökülmesinde, inkübasyon tüplerine besiyeri transferi ve bakteri ekimlerinde oluşabilecek olası kontaminasyonu engellemek için ESCO marka Airscream Flov kabin kullanılmıştır.

3.1.11. Mikrodalga fırın

Agaroz jellerin hazırlanması için Arçelik marka MD 564 model mikrodalga fırın kullanılmıştır.

3.1.12. Blender

Et örneklerinin homojenizasyonunda WARING COMMERCIAL marka blender kullanılmıştır.

3.1.13. Kaba terazi

Et örneklerinin, Agaroz'un tartılması için 0,1 g duyarlılığa sahip 6000 g kapasiteli hassas terazi kullanılmıştır.

3.1.14. Hassas terazi

Tüm küçük ağırlıklar, 0,0001 g duyarlılığı olan OHAUS marka hassas terazi ile ölçülmüştür.

3.1.15. Karıştırıcı (vortex)

Örneklerin PZR tüplerine eklenmesi öncesinde ve PZR yükleme karışımının homojenizasyonunun sağlanmasında Labart marka karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.16. Isıtıcı manyetik karıştırıcı

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonu için kaynatılma işlemleri ve besiyerlerinin saf su içerisinde çözdürülme işlemlerinin tamamı VELP marka ARE model ısıtıcı manyetik karıştırıcı ile yapıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

3.2.1. Tryptic soy broth

Bakteri örneklerinin çoğaltılması için MERCK marka Tryptic Soy Broth besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2. Trptic soy agar (trypticase soy agar, soybean casein digest agar veya CASO agar)

Bakteri örneklerinin çoğaltılması ve canlandırılması için MERCK marka Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri hem kolay çoğalan hem de kolay çoğalmayan mikroorganizmaların izole edilmesi ve kültüre alınması amacıyla kullanılmaktadır.

3.2.3. Agaroz

Elektroforez tankında DNA ampikonlarının yüklenip yürütülmesi için SİGMA marka agaroz kullanılmıştır.

3.2.4. Ethidium bromür (EtBr)

Agaroz jellerde DNA'ya bağlanarak floresan ışımayla nükleik asit işaretlemede SIGMA marka ethidium bromür kullanılmıştır.

3.2.5. 10X Tris-borate-EDTA (10X TBE)

Elektroforez jellerde ve Elektroforez tank solüsyonu olarak THERMO SCIENTIFIC marka 10 X TBE solüsyonu 1X oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2.6. Loading dye (yükleme boyası)

DNA amplikonlarının jelde yürümesini görünür kılmak için THERMO SCIENTIFIC marka DNA Gel Loading Dye (6X) kullanılmıştır.

3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'da kullanılan çözeltiler

3.2.7.1. MgCl₂

PZR ependorf tüplerine eklenen karışıma THERMO SCIENTIFIC marka 25 mM MgCl₂ kullanılmıştır.

3.2.7.2. Nükleotit karışımı (dNTP mix)

PZR'a yüklenecek karışıma eklemek için FERMENTAS marka her 1 ml için 2 mM dNTP Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP karışımı) kullanılmıştır.

3.2.7.3. Taq polimeraz tamponu 10X

PZR'da DNA amplifikasyonu için karışıma THERMO SCIENTIFIC marka (NH₄)₂SO₄ katkılı 10X Taq polimeraz tamponu kullanılmıştır.

3.2.7.4. Deiyonize su (dH₂O)

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmak üzere Millipore marka Rios8 model saf su cihazının ürettiği distile su kullanılmıştır.

3.2.7.5. Taq polimeraz

Örneklerdeki DNA'ların çoğaltılmasında görevli SOLIS BIODYNE marka FIREPOL Taq polimeraz enzimi kullanılmıştır.

3.2.7.6. Master mix

Bazı analizlerde, rutin PZR analizleri için optimize edilmiş kullanıma hazır PZR ana karışımı olarak Solis BioDyne marka FIREPol[®] Master Mix kullanılmıştır. Bu ana karışım termostabil Taq polimeraz FIREPol[®], MgCl₂, dNTP'ler, deterjanlı tampon ve yüklem boyası içerir. Sadece bir DNA şablonu, primerler ve su eklenmesi ile kullanılmıştır.

3.2.7.7. Primerler

DNA örneklerinin ilişkili olduğu gene bağlanarak amplifikasyonlarını sağlamak amacıyla kullanılan SENTEBİOLAB firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Gıdalarda bulunan bazı bakterilere yönelik tasarlanan ve denenilen primerler

Hedef Gen	Forward ve Reverse Primer Dizileri	Spesifisite
<i>bcet</i>	F: GAACTGGATGCTGTTATTGACTAC R: GCTTGAGAAGACCGCTACG	<i>Bacillus</i> spp.
<i>cyt/hk</i>	F: CTATTACTATCATATTTCCATTTCCGAATC R: TTTGTACCACCATTTAGACATAAGAAC	<i>B. cereus</i>
<i>prs</i>	F: GTATCCGTGGTTGTCATGTATATG R: TTACCAACGATGTTCACTTCTCAG	<i>Listeria</i> spp.
<i>iap</i>	F: AATGAGGTTGCTGCTGCTG R: TTTCTTTTCGTTTCTGCTACTTTAGG	<i>L. monocytogenes</i>
<i>prfA</i>	F: GTATTAGTGAGAACGGGACCATC R: TTGTTAAATTATCCAGTGCAATCTTG	<i>L. monocytogenes</i>
<i>iroN</i>	F: TTCGCCGTTGTCGTCTGT R: TCTGAACCGCACTATAACCATCT	<i>Salmonella</i> spp.
<i>iapP</i>	F: AAGACGATTGATAATAGCCGAACA R: CGACGCCAGCCAGTTGA	<i>S. Typhimurium</i>
<i>bigA</i>	F: CGATAGCGGCGATGATGATG R: CACTGGTTGTCCTGTTCTGAATA	<i>S. Typhimurium</i>
<i>uspA*</i>	F: CCGATACGCTGCCAATCAGT R: ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	<i>Escherichia coli</i>
<i>tuf</i>	F: TTAGAAGGCGATGCTGAATACG R: TTACAACACCAGTTACGTCAGTAG	<i>Staphylococcus aureus</i>

*Bu gen için yeni primer tasarımı yapılmamış olup, Chen ve Griffiths (1998) tarafından bildirilen primer dizileri birebir alınarak bu çalışmada kullanılmıştır.

3.2.7.8. DNA belirteci (DNA markırı)

DNA belirteci olarak 100 bp boyutlu THERMO SCİENTİFİC marka markır kullanılmıştır.

3.3. İzolatların Temini

Yapılan bu çalışmada, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium ve *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanılmıştır. Çalışmanın gerçekleştirilmesi için kullanılan tüm bakteri suşları, daha önce laboratuvarımızda -80 °C’de saf kültür halinde muhafaza edilen stoklardan tekrar canlandırılarak kullanılmıştır.

3.4. Saf Bakteri Kültürlerinin Canlandırılması

Donmuş halde olan (-80 °C’de) olan saf bakteri kültürleri oda sıcaklığına getirilerek çözündürülür. Çözündürülen sıvı haldeki saf kültür vortekslenerek homojen hale getirilir ve bu kültürden 100 µl alınır ve 5 ml steril triptik soy broth (TSB) üzerine eklenerek 37 °C’de 18 saat inkübe edilir. Daha sonra bu kültürden 50 µl alınır ve triptik soy agar (TSA) üzerine bırakılarak steril drigalski spatülü kullanılarak agar besiyeri üzerine yayılır ve 37 °C’de 18 saat inkübe edilir. Bu işlemin sonunda hem sıvı hem de katı besiyerleri kullanılarak bakteri kültürleri canlandırılmış olur.

3.5. Saf Bakteri Kültürlerinden DNA’nın İzolasyonu ve Belirlenmesi

Canlandırılan saf bakteri kültürlerinin agar üzerinde oluşturduğu kolonilerden alınan örnekler steril plastik tüplerde bulunan 1 ml’lik phosphate buffered saline (PBS) içerisinde konularak seyreltilir. Vortekslenir ve 95 °C’de 6 – 10 dk süre ile sıcak su banyosunda kaynatma işlemine tabi tutulmuştur. Kaynatma sonrası alınan örnekler 17.000 g’de 5 dk soğutmalı santrifüj yardımıyla santrifüjlenmiş ve süpernatantlar DNA izolatu olarak saklanmıştır. İzole DNA’ları içeren süpernatantlar steril temiz tüplere alınarak -20 °C kullanıma kadar bekletilmiştir (Arslan ve Uçan, 2006).

3.6. DNA İzolatlarında Tasarlanan Primerlerin Kullanımı ile Moleküler İdentifikasyon

Bacillus cereus, *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium ve *Staphylococcus aureus* bakteri türlerinden izole edilen DNA’lar çizelge 3.1’de sunulan primerler kullanılarak cinse, türe veya suşa özgü identifikasyon yapılmıştır. Ayrıca, tanımlamada kullanılan PZR koşulları Çizelge 3.2’de yer almaktadır. Bunun için *E. coli*’de bulunan beş küçük Usp proteininin ekspresyonunu yapan *usp* genlerinden *uspA* genini amplifikasyon bölgesi olarak seçen bir

çift primerin kullanıldığı PZR yöntemi tercih edilmiştir (Nachin vd., 2005; Uyanık, 2022). Sonra aynı PZR koşulları gıda ve klinik kaynaklı tüm örnekler üzerinde denenmiştir.

Çizelge 3.2. *Bakteri DNA izolatlarında çalışılan primerlere ait optimize edilmiş PZR amplifikasyon koşulları*

Hedef Gen	PZR Koşulları	Döngü Sayısı	Amplikon Büyüklüğü (bp)
<i>bceT</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 51°C 45", 72°C 30" - 72°C 5'	35	261
<i>cyt/hk</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 51°C 45", 72°C 30" - 72°C 5'	35	313
<i>prs</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 57°C 35", 72°C 1' - 72°C 5'	35	311
<i>iap</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 57°C 35", 72°C 1' - 72°C 5'	35	589
<i>prfA</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 52°C 30", 72°C 1' - 72°C 5'	35	309
<i>iroN</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 57°C 35", 72°C 1' - 72°C 5'	35	443
<i>iapP</i>	94°C 5' - 94 °C 30", 49/64°C 1', 72°C 1' - 72°C 5'	36	439
<i>bigA</i>	94°C 5' - 94°C 30", 59°C 45", 72°C 30" - 72°C 5'	35	399
<i>uspA*</i>	94°C 5' - 94°C 30", 56°C 30", 72°C 30" - 72°C 5'	30	884
<i>tuf</i>	94°C 5' - 94°C 30", 59°C 45", 72°C 30" - 72°C 5'	35	493

*Bu gen için yeni primer tasarımı yapılmamış olup, Chen ve Griffiths (1998) tarafından bildirilen primer dizileri ve PZR koşulları yazarlar tarafından belirtildiği şekilde bu çalışmada kullanılmıştır.

Bacillus cereus B-4ac suşuna ait enterotoksin T (*bceT*) geni, yaklaşık 2.9 kb uzunluğundaki bir DNA fragmanı üzerinde yer almakta olup, bu genin gıda kaynaklı zehirlenmelerde diyareye neden olduğu sonucuna varılmıştır. *B. cereus* türüne özgüdür (Agata vd., 1995).

B. cereus türüne özgü olan bir diğer gen *cytK*'dir. *cytK*, *B. cereus*'un neden olduğu diyarel infeksiyondan sıklıkla sorumlu tutulmaktadır (Heckler vd., 2024). *cytK* geninin, bazı memelilerin hücrelerinde parçalanmalara neden olan sitolizin K toksinini kodladığı bilinmektedir (Dietrich vd., 2021).

Listeria cinsini belirlemek amacıyla kullanılan fosforibozil pirofosfat sentetaz (*prs*) geni, *Listeria*'nın tüm türlerinde mevcuttur (R. K. Sharma vd., 2024). *prs*, hücrel metabolizma sürecinde karbon ve azotu bir araya getirerek yüksek enerjili olan PRPP bileşiğini üretir (Ugbogu vd., 2022).

prfA geni, PrfA proteini yapısal olarak aktif hale getirir.18 *prfA* geni transkripsiyonel, translasyonel ve transasyon sonrası düzeyde düzenlenebilir. 20 Yapılan araştırma sonucunda, izole edilen 12 transpozon mutantının *prfA* geninde mutasyonları incelendiğinde on tanesinin *prfA* geninde nokta mutasyonun bulunduğu ve amino asit değişimlerine neden olduğu tespit edilmiştir. *L. monocytogenes*'in *prfA* geninin ekspresyonu üzerine kuersetin'in etkisini değerlendiren bir çalışmada, RT-qPCR analizi kuersetin'in *prfA* geninin dozuna bağlı olarak aşağı regüle edildiği gösterilmiştir (Vazquez-Armenta vd., 2020).

İnvazyonla ilişkili bir asil taşıyıcı protein olan *iapP*, SPI-1 tipi III sekresyon sistemi (TT3SS) efektörlerinin salınımını destekleyerek *S. Typhimurium*'un virülensinde kritik bir rol oynamaktadır (Eom vd., 2012).

iroN geni, ferrik salmochelin'e özgü dış zar reseptörünü kodlayan ve Gram-negatif bakterilerde demir alımında görev alan önemli bir gen bölgesidir. Demir, bakterilerin çoğalması ve metabolik işlevleri için elzem bir element olmasına rağmen, konak canlılarda biyoyararlanımı sınırlıdır (Crosa, 1997). Bu nedenle patojen bakteriler, demiri çevreden etkin şekilde elde etmek amacıyla siderofor adı verilen yüksek afiniteye sahip bileşenler üretir. *iroN* geni de, bu siderofor sistemine bağlı olarak salmochelin adlı glikozile edilmiş bir enterokelinin taşınmasında görev alan özgül bir dış zar proteinini kodlamaktadır (Hantke vd., 2003).

Salmonella enterica üzerinde yapılan mutasyon analizleri ve *Escherichia coli*'de yürütülen ekspresyon deneyleri sonucunda, *iroN* genine ait bir dış zar proteini tespit edilmiştir. Bu proteinin moleküler kütlesi yaklaşık 78 kDa olarak belirlenmiştir. İlgili genin açık okuma çerçevesi (ORF), *iroN* olarak tanımlanmış ve bu bölgenin 727 amino asitlik bir polipeptidi kodladığı ortaya konmuştur (Bäumler vd., 1998). Bu polipeptidin teorik moleküler ağırlığı hesaplamalara göre yaklaşık 79,5 kDa'dır. Söz konusu protein, demir sınırlı ortamlarda bakteriyel hayatta kalmayı destekleyen sistemin bir parçası olup, bakterinin enfektivitesini artıran önemli bir virülans faktörü olarak değerlendirilmektedir (Crouch vd., 2008).

bigA olarak adlandırılan açık okuma çerçevesi, Bab1_2009 lokusunda kodlanan proteinin, birleşik epitel hücre kültürlerinde *Salmonella*'nın hücre-hücre bağlantı zarına yönlendirilmesini sağlayan güçlü bir adezin olduğunu ortaya koymuştur. Bu adezin, bakterinin konak hücreye tutunma ve invazyon süreçlerinde önemli bir rol oynamakta olup, patojenitenin artışına katkı sağlamaktadır (Berdejo vd., 2020; Lauri ve Mariani, 2009).

Ayrıca, *Salmonella* Typhimurium suşlarının karvakrol bileşiğine maruziyeti sonrası elde edilen dirençli mutantların analizinde, *trkA* geninin 1234. nükleotid pozisyonunda tek bir nükleotid varyantı (SNV) tespit edilmiştir (Berdejo vd., 2020). Bu mutasyon sonucunda, amino asit diziliminde alanin ile treonin arasında bir yer değişimi gözlenmiştir. *trkA* geni, bakterinin potasyum taşıma sisteminde görev yapan TrkA proteininin sentezinden sorumludur ve bu protein, iyon dengesi ile birlikte hücrel osmotik regülasyonun sağlanmasında temel rol oynamaktadır (Gong vd., 2025). Bu değişiklik, *Salmonella*'nın çevresel stres koşullarına ve antimikrobiyal bileşiklere karşı adaptasyon yeteneğini etkileyebilecek niteliktedir.

tuf geni, protein sentezi sırasında aminoasil-tRNA'nın ribozoma taşınmasını sağlayan termal kararsız uzama faktörü EF-Tu'nun (Elongation Factor Thermo-unstable) üretiminden sorumlu olup, translasyon süreçlerinin temel bileşenlerinden biridir (Harvey vd., 2019). Bu gen, yalnızca translasyonun etkinliği açısından değil, aynı zamanda moleküler evrim ve bakteriyel taksonominin anlaşılması açısından da önemli bir konuma sahiptir. Özellikle fitoplazmalarda yer alan *tuf* geni, 16S rRNA genine kıyasla daha yüksek düzeyde genetik çeşitlilik göstermesi nedeniyle, filogenetik sınıflandırma ve tür düzeyinde ayırım yapma amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Bu özelliği sayesinde, farklı bakteriyel türlerin, özellikle de filogenetik olarak yakın olanların ayırt edilmesinde değerli bir moleküler belirteç olarak öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, *tuf* gen dizilimi analizlerinin, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinslerine ait türlerin ayırımında 16S rRNA dizilemesinden daha üstün bir ayırt edicilik sunduğunu göstermiştir (Hwang vd., 2011; Picard vd., 2004). Ayrıca, bu genin tamamı veya spesifik fragmanları, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileriyle birlikte kullanılarak karmaşık stafilocok topluluklarının tanımlanmasında hedef gen olarak değerlendirilmektedir (Ahle vd., 2021; Iversen vd., 2020). Bu yönüyle *tuf* geni hem fonksiyonel hem de taksonomik açıdan bakteriyel çeşitliliğin analizinde stratejik bir araç niteliği taşımaktadır.

İzozimlerin dönüşüm süreci, *iap* geninin ürünü olan bir protein aracılığıyla gerçekleşmekte ve büyük olasılıkla bu süreç, söz konusu gen ürünü tarafından katalizlenmektedir. Bu nedenle, *iap* geninin proteolitik bir enzimi kodladığı düşünülmektedir (Ishino vd., 1987; Nakata vd., 1982). Bakteriyolitik aktivite gösterdiği bilinen p60 adlı protein ile *iap* geni arasındaki ilişki incelendiğinde, *iap* geninin hücre canlılığını yitirmeden inaktive edilemediği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, p60 proteininin *Listeria monocytogenes* başta olmak üzere muhtemelen diğer *Listeria* türleri için de hücre

bölünmesi ve yapısal bütünlüğün korunmasında kritik rol oynayan, bakteriyel temizlik ve hücre duvarı yeniden düzenlenmesi ile ilişkili önemli bir protein olduğunu ortaya koymaktadır (Camejo vd., 2011; Hess vd., 1995).

3.7. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Çizelge 3.2’de amplifikasyon koşullarına göre çoğaltılan PZR ürünlerinin jelde yürütülmesi için önce agaroz jel hazırlandı. Kısaca, 1,5 g Agaroz 100 ml 1× TBE içinde çözünmesi için bir mikro dalga fırında 1,5 dakika ısıtılmıştır. Tamamen homojen şeffaf bir karışımdan oluşan jelin ilk sıcaklığı çıkınca içine 6 µl Ethidium Bromür çözeltisi eklenip karışması sağlanmıştır. Yatay konumda yerleştirilmiş tarakları takılmış Jel döküm tankına boşaltılarak katılaşması beklenmiştir. Katılaşan jelden taraklar uzaklaştırılarak Elektroforez tankına yerleştirilir. PZR örneklerinden 6 µl mikropipetle alınıp parafilm üzerinde bulunan 4 µl’lik Loading Dye ile karıştırılır ve kuyucuklara 10 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Her dizide bir kuyuya 100 bp uzunluğundaki Marker’dan 5 µl yükleme boyası (Loading Dye) boyası ile karıştırılması yükleme yapılmıştır. Yükleme tamamlandan kuyulardan DNA örneklerinin hareket etmesi için 100 V, 150 mA ve 10 watt şeklinde ayarlanmış akım oluşturulmuştur. Hazır karışım (FIREPol® Master Mix) kullanılarak amplifiye edilen PZR ürünlerinde ayrıca yükleme boyası kullanılmamıştır. Amplikonlar yaklaşık olarak 40 dk jelde yürütülmüş olup, süreç sonunda UV Görüntüleme sisteminde bant oluşumları izlenmiş, fotoğraflanmış ve görüntüler kayıt altına alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolatlarında Tasarlanan Primerlerin Optimize Edilmesi

4.1.1. *bceT*, *cyt/hk* ve *tuf* genlerinin optimizasyonu

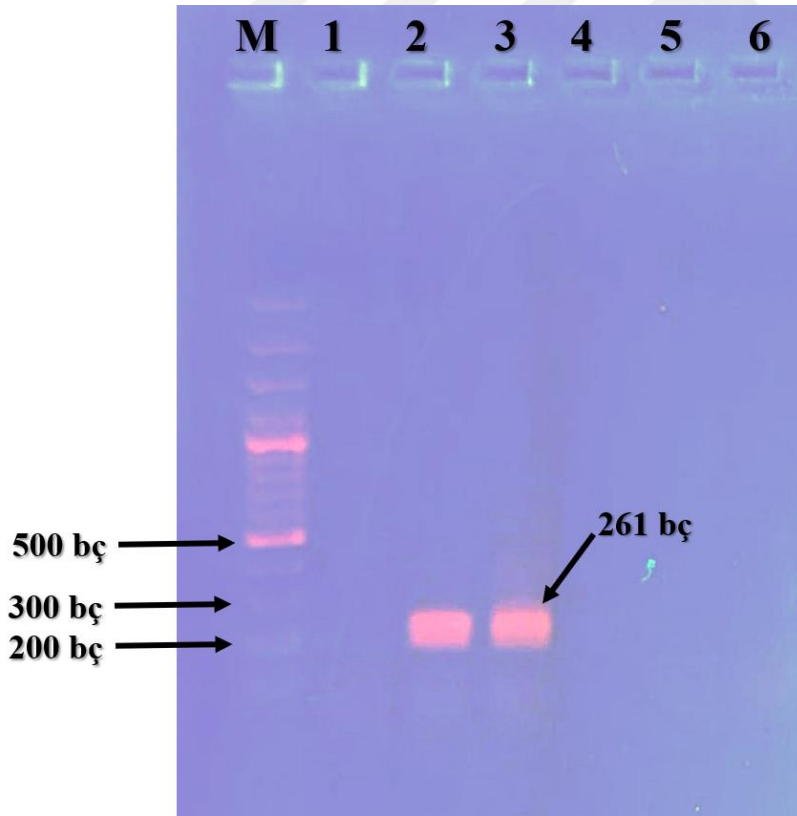
PZR tabanlı tanı yöntemlerinin güvenilirliği ve özgüllüğü, kullanılan primerlerin hedef gen bölgeleri ile olan etkileşim düzeyine doğrudan bağlıdır. Bu bağlamda, multipleks PZR uygulamalarında kullanılacak primerlerin ön değerlendirmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, *Bacillus cereus* grubuna ait türlerin ayırt edilmesine yönelik olarak seçilen *bceT*, *cyt/hk* ve *tuf* genlerine özgü primer çiftlerinin performanslarını belirlemek amacıyla hem singlepleks hem de multipleks PZR koşullarında optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan genler, enterotoksijenik potansiyel veya tür düzeyinde ayırt edici özellik taşıyan genetik bölgelerden seçilmiştir.

Deneyisel çalışmalarda *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. subtilis* ve *Staphylococcus aureus* türlerine ait DNA izolatları kullanılmıştır. Her bir primer çifti önce ayrı ayrı singlepleks PZR protokolü ile dört farklı bağlanma sıcaklığında (49 °C, 51 °C, 53 °C ve 55 °C) test edilmiştir. Bu koşullarda elde edilen amplifikasyon bulguları Çizelge 4.1’de detaylandırılmıştır. Ardından, aynı primer çiftleri çoklu kombinasyonlar hâlinde multipleks PZR formatında da test edilerek, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de raporlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, yalnızca *bceT* genine özgü primerlerin *Bacillus* sp. türüne ait DNA üzerinde başarılı amplifikasyon verdiği belirlenmiştir. Bu pozitif sonuçlar, singlepleks PZR uygulamalarında 49 °C ve 51 °C annealing sıcaklıklarında, multipleks PZR’de ise yalnızca 51 °C’de gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Bu veriler doğrultusunda yapılan optimizasyon çalışmalarında, *bceT* geni için en uygun annealing sıcaklığı 51 °C olarak saptanmış ve bu sıcaklık daha sonraki PZR analizlerinde standart protokol parametresi olarak kullanılmıştır.

Diğer taraftan, *cyt/hk* ve *tuf* genlerine özgü olarak tasarlanan primer çiftleriyle gerçekleştirilen denemelerde, dört farklı bakteri türüne ait DNA izolatlarında herhangi bir amplifikasyon elde edilememiştir. Bu durum, ilgili primer çiftlerinin ya hedef DNA dizisi ile yeterli eşleşme sağlayamadığını ya da hedef bölgelerdeki olası sekonder yapıların amplifikasyonu engellediğini düşündürmektedir. Primer bağlanma bölgelerindeki yüksek GC içeriği, saç tokası (hairpin) gibi ikincil yapı oluşum potansiyeli veya primer-primer dimerizasyonu gibi faktörlerin de başarısız amplifikasyon üzerinde etkili olabileceği değerlendirilmektedir. Bu nedenle, *cyt/hk* ve *tuf* genlerine özgü primerlerin yeniden tasarımı önerilmektedir. Bu süreçte, in silico analizler (örneğin Primer-BLAST, mFold

veya OligoAnalyzer gibi araçlarla) kullanılarak özgüllük, bağlanma enerjisi ve sekonder yapı olasılıkları ayrıntılı biçimde analiz edilmelidir. Ayrıca, hedef bakteriyel genomlara ait en güncel dizilerin kullanılması, primer tasarımının başarısını artıracaktır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, yalnızca *bceT* genine ait primerlerin, test edilen *Bacillus* türleri için güvenilir bir tanı aracı olabileceği ortaya konmuştur. Bu durum hem singlepleks hem de multipleks PZR uygulamaları için söz konusu primer çiftinin yüksek düzeyde özgüllük ve tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermektedir. Bununla birlikte, *cyt/hk* ve *tuf* genlerine yönelik tanısal yaklaşımlar geliştirilmeden önce, primerlerin kapsamlı bir şekilde yeniden tasarlanması gerektiği açıktır. Yeni tasarlanacak primerlerin, gen bölgelerinin evrimsel korunmuşluk düzeyleri ve hedef mikroorganizmalardaki varyasyonları dikkate alınarak optimize edilmesi, tanısal doğruluğu artıracaktır. Ayrıca, bu primerlerin laboratuvar dışı koşullarda da geçerliliğini koruyacak şekilde validasyonunun yapılması, saha uygulamaları açısından önemli bir adımdır.



Şekil 4.1. *bceT*, *cyt/hk* ve *tuf* genlerinin PZR sonrası jel görüntüleri

Çizelge 4.1. *Bacillus sp.*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *Staphylococcus aureus* DNA izolatlarının singlepleks (tekli) olarak çalışılmasına ait optimizasyon sonuçları

Gen Bakteri Türü	<i>bceT</i>	<i>cyt/hk</i>	<i>tuf</i>	Annealing (°C)
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	49
	+	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	57
	-	-	-	59
<i>B. cereus</i>	-	-	-	49
	-	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	57
	-	-	-	59
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	49
	-	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	57
	-	-	-	59
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	49
	-	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	57
	-	-	-	59

Çizelge 4.2. *Bacillus sp.*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *Staphylococcus aureus* DNA izolatlarının multipleks (çoklu) olarak çalışılmasına ait optimizasyon sonuçları

Gen Bakteri Türü	<i>bceT</i>	<i>cyt/hk</i>	<i>tuf</i>	Annealing (°C)
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	58
<i>B. cereus</i>	-	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	58
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	58
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	51
	-	-	-	54
	-	-	-	58

4.1.2. *bigA* ve *iapP* genlerinin optimizasyonu

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium suşuna özgü olarak *bigA* ve *iapP* bölgelerinin bir kısmını amplifiye etmek için tasarlanan primer çiftleri ikili (dupleks) PZR olarak iki farklı bakteri türüne ait DNA izolatında denenmiş olup sonuçları çizelge 4.3’de verilmiştir. *E. coli* DNA izolatı da negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda, dupleks PZR koşulları altında hem *iroN* hem de *bigA* genlerine ait primer çiftlerinin, 57°C ve 59°C annealing sıcaklıklarında başarılı bir şekilde amplifikasyon sağladığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ilgili gen bölgelerine yönelik primerlerin hedef DNA'ya spesifik olarak bağlanabildiğini ve optimum termal koşullarda verimli amplifikasyon gerçekleştirebildiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, aynı koşullar altında yapılan denemelerde *iapP* genine ait primerlerin herhangi bir sıcaklıkta amplifikasyon ürünü oluşturmadığı, yani pozitif sonuç vermediği belirlenmiştir.

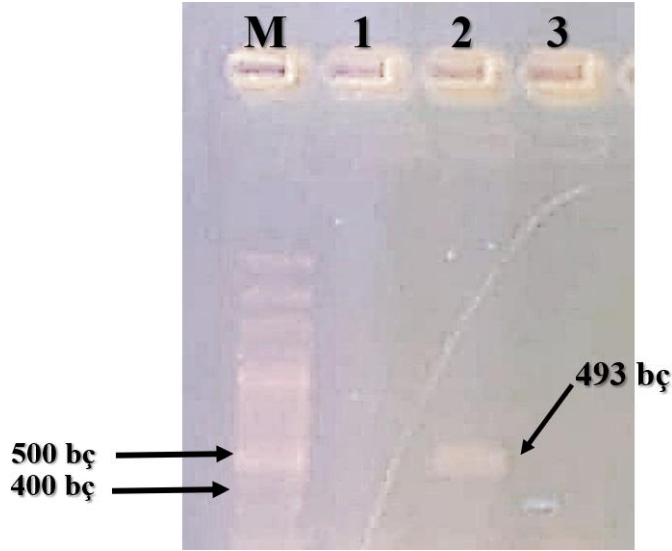
Bu olumsuz sonucun nedenlerini daha iyi anlayabilmek adına, *iapP* genine özgü primer çifti, bu kez singlepleks PZR formatında ve gradient PZR protokolü ile test edilmiştir. Bu yöntem kapsamında, annealing sıcaklığı 49°C’den başlayarak 64°C’ye kadar

her döngüde 0,5°C'lik artışlarla sistematik olarak değiştirilmiş ve böylece primerin bağlanma kapasitesi geniş bir sıcaklık aralığında değerlendirilmiştir. Gradient PZR uygulaması sonucunda, belirli bir sıcaklık aralığında pozitif amplifikasyon ürünleri elde edilmiş ve *iapP* geninin tespitinin ancak bu yaklaşımla mümkün olabildiği görülmüştür (Şekil 4.2).

Elde edilen bu bulgular, *iapP* genine yönelik primerlerin sabit bir annealing sıcaklığında yeterli bağlanma sağlayamadığını ve dolayısıyla sabit sıcaklıkla yapılan PZR uygulamalarında başarısız amplifikasyonlara yol açtığını göstermektedir. Ancak gradient PZR ile farklı sıcaklık koşulları altında denendiğinde, belirli bir aralıkta bağlanma gerçekleşmiş ve hedef bölge amplifiye edilebilmiştir. Bu durum, primerlerin bağlandığı DNA dizilerinde olası sekonder yapıların (örneğin saç tokası yapıları, internal dimerleşme gibi) varlığına veya hedef DNA'nın üç boyutlu ikincil yapısal konformasyonuna bağlı olarak bağlanma kinetiklerinin değişkenlik gösterdiğine işaret etmektedir (Lorenz, 2012).

Özellikle *iapP* gibi zor amplifiye edilen gen bölgelerinde, primerlerin özgülüğünün değerlendirilmesi ve termal profillerinin belirlenmesi için gradient PZR yaklaşımı, oldukça değerli bir optimizasyon stratejisi olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntem sayesinde, bağlanma sıcaklığına duyarlı primer çiftleri için uygun termal koşullar tespit edilerek yanlış negatif sonuçların önüne geçilebilir. Ayrıca, dupleks ya da multipleks PZR sistemlerine entegre edilmeden önce, her bir primer çiftinin singlepleks koşullarda detaylı validasyonunun yapılması, tanısal başarının artırılması açısından kritik öneme sahiptir.

Bu çalışmada kullanılan *bigA* ve *iapP* genlerine yönelik primerlerin performansları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş; *bigA* primerlerinin sabit sıcaklıklarda çalışabilirliği gösterilirken, *iapP* primerlerinin sadece geniş bir sıcaklık aralığında amplifikasyon sağladığı ortaya konmuştur. Bu nedenle, *iapP* geninin PZR tabanlı tespitinde gradient PZR uygulaması, tanı güvenilirliğini artıracak uygun bir alternatif yöntem olarak önerilmektedir. Gelecekteki uygulamalarda, bu tür sıcaklık hassasiyeti gösteren primerlerin biyoinformatik analizlerle daha ileri düzeyde optimize edilmesi ve farklı örnek tipleriyle test edilerek doğrulanması, yöntemin sahadaki uygulanabilirliğini güçlendirecektir.



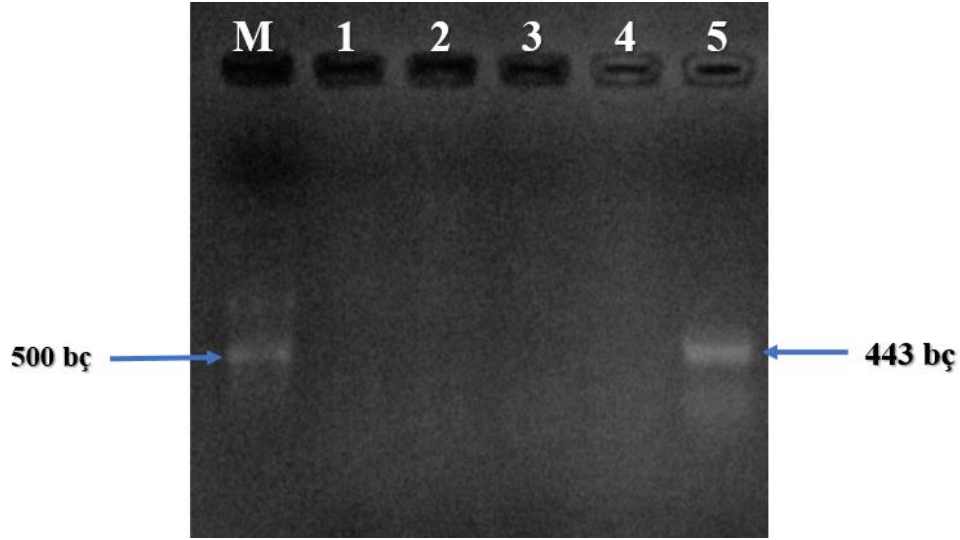
Şekil 4.2. Gradient PZR sonucu *iap* genine ait oluşan amplikon görüntüsü

Çizelge 4.3. *Salmonella Typhimurium* ve *E. coli* DNA izolatlarının multipleks (çoklu) olarak çalışılmasına ait optimizasyon sonuçları

Gen Bakteri Türü	<i>bigA</i>	<i>iap</i>	Annealing (°C)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	54
	+	-	57
	+	-	59
<i>Escherichia coli</i>	-	-	54
	-	-	57
	-	-	59

4.1.3. *iroN* geninin optimizasyonu

Salmonella spp.'ye özgü olarak *iroN* bölgelerinin bir kısmını amplifiye etmek için tasarlanan primer çifti singlepleks PZR olarak iki farklı bakteri türüne ait DNA izolatında ve farklı annealing sıcaklıklarında denenmiş olup sonuçları çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgede de belirtilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda pozitif sonucun sadece 54 °C'de pozitif olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Bu nedenle *iroN* geninin amplifikasyonu için optimal annealing sıcaklığının 54 °C olduğu kabul edilmiş ve sonraki PZR analizlerinde bu sıcaklık standardize edilmiştir.



Şekil 4.3. *iroN* genine ait amplikon görüntüsü

Çizelge 4.4. *Salmonella* spp.'nin teşhis ve tespiti için tasarlanan *iroN* genine ait optimizasyon sonuçları

Gen Bakteri Türü	<i>iroN</i>	Annealing (°C)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	49
	-	51
	+	54
	-	57
	-	59

Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, *iroN* genine ait primerlerle yalnızca 54 °C annealing sıcaklığında pozitif amplifikasyon elde edildiği gözlemlenmiştir. Diğer test edilen sıcaklıklarda amplifikasyon başarısız olmuş, hedef DNA bölgesine özgül bantlar elde edilememiştir. Bu nedenle, *iroN* genine yönelik primerlerin optimal bağlanma sıcaklığının 54 °C olduğu kabul edilmiş ve bundan sonraki PZR analizlerinde bu sıcaklık standart protokol olarak benimsenmiştir.

iroN gen bölgesinin yalnızca dar bir sıcaklık aralığında başarılı amplifikasyon göstermesi, primerlerin bağlandığı dizilerin sıcaklık duyarlılığına sahip olduğunu ve özgül bağlanmanın ancak belirli bir termal aralıkta etkin şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu durum, primerlerin bağlandığı bölgelerdeki nükleotid kompozisyonu, özellikle GC

içeriği, ikincil yapı oluşumu potansiyeli ve DNA'nın erime profili gibi moleküler parametrelerle yakından ilişkilidir. GC oranının yüksek olduğu diziler, genellikle daha yüksek T_m (erime sıcaklığı) değerine sahip olurlar ve bağlanma verimliliği, sıcaklıktaki küçük değişimlerden büyük ölçüde etkilenebilir. Aynı şekilde, primerlerin ikincil yapılar (örneğin saç tokası, dimerleşme) oluşturma eğilimi de bağlanma etkinliğini olumsuz etkileyebilir ve bu da amplifikasyonun sadece dar bir sıcaklık aralığında gerçekleşmesine neden olabilir (Lorenz, 2012).

Bu bulgulara göre PZR analizlerinde primer-spesifik optimizasyonun önemini bir kez daha ortaya çıkarmıştır. Özellikle saha uygulamalarında ve farklı örnek tiplerinde kullanılacak PZR sistemlerinde, bu tür primerlerin geniş çaplı validasyonlarının ve ön tarama çalışmalarının yapılması büyük önem taşır. Aksi takdirde, sıcaklığa duyarlılık gösteren primer çiftlerinin yanlış negatif sonuçlara yol açabileceği ve bunun da tanısal doğruluğu olumsuz etkileyebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, *iroN* gibi dar bir sıcaklık toleransına sahip gen bölgelerine yönelik PZR uygulamalarında, hem primer tasarım süreci hem de PZR protokolü dikkatle optimize edilmelidir. Ayrıca, ilerleyen aşamalarda bu primerlerin daha geniş bir *Salmonella* suş paneli ile test edilmesi, farklı matrikslerde (örneğin süt, et, su) uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi ve varsa çapraz reaktivite ihtimalinin *in silico* analizlerle kontrol edilmesi önerilmektedir. Böylece, hem özgüllük hem de duyarlılık açısından daha güvenilir bir moleküler tanı yöntemi oluşturulabilir.

4.1.4. *iap* ve *prs* genlerinin optimizasyonu

Listeria monocytogenes türünün moleküler düzeyde doğru ve özgül bir şekilde tanımlanabilmesi hem halk sağlığının korunması hem de gıda kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, tür spesifik tanımlama amacıyla, literatürde yaygın olarak kullanılan *iap* (invasion-associated protein) ve *prs* (phosphoribosylpyrophosphate synthetase) gen bölgeleri hedef alınarak tasarlanmış primer çiftleri değerlendirilmiştir. Belirtilen gen bölgelerine özgü primerlerle yapılan PZR uygulamaları hem singlepleks (tekli) hem de dupleks (ikili) formatlarda gerçekleştirilmiş ve annealing sıcaklıkları 51°C ile 59°C arasında optimize edilmeye çalışılmıştır. Ancak, farklı koşullarda yapılan tekrarlı denemelere rağmen, tüm reaksiyonlarda pozitif amplifikasyon ürünleri elde edilememiştir.

Elde edilen bu olumsuz sonuçlar, kullanılan primerlerin hedef DNA dizilerine yeterli bağlanma gerçekleştirmediğini ve/veya söz konusu hedef dizilerin test edilen *L. monocytogenes* suşlarında mevcut olmayabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, özellikle doğal izolatlardaki genetik varyasyonların moleküler tanımlama sürecine etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Çünkü hedef gen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları, delesyonlar ya da dizilim polimorfizmleri, primerlerin bağlanma verimliliğini önemli ölçüde azaltabilir. Nitekim primerlerin bağlandığı kısa nükleotid dizilerinde bile oluşabilecek tek bir baz değişimi, PZR amplifikasyonunu başarısızlığa uğratabilecek düzeyde kritik öneme sahiptir (Sharma vd., 2024).

Bu bağlamda, primerlerin başarısızlığı yalnızca deneysel koşullara değil, aynı zamanda primer tasarım sürecinde kullanılan dizi verilerinin güncelliğine de bağlı olabilir. Özellikle *iap* ve *prs* genleri için kullanılan primer dizaynları, günümüzde mevcut olan daha geniş ve çeşitli genom veri tabanları kullanılarak yeniden gözden geçirilmeli ve daha güncel in silico analizlerle tasarlanmalıdır. Primer-BLAST gibi biyoinformatik araçlarla yapılan özgüllük testleri, potansiyel çapraz reaksiyon risklerini en aza indirebilir ve bağlanma etkinliğini artıracak diziler belirlenebilir (Kumar ve Chordia, 2015; Lorenz, 2012).

Öceki *Listeria monocytogenes* suşlarının genetik çeşitliliğinin önemli düzeyde olduğunu ve bu çeşitliliğin moleküler tanı yaklaşımlarında dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Özellikle gıda örneklerinden ve çevresel kaynaklardan izole edilen suşların, referans laboratuvar suşlarına göre genetik olarak farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, tek bir gen bölgesine dayalı tanımlama yerine, farklı gen bölgelerini hedefleyen çoklu primer setleri ile çalışmak, tanı güvenilirliğini artıracak bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Örneğin, *hlyA*, *inlA*, *prfA* gibi virulansla ilişkili genler, *L. monocytogenes*'in tanısında alternatif ve etkili hedefler olabilir (Vazquez-Armenta vd., 2020).

Sonuç olarak, bu çalışmada *iap* ve *prs* genlerine yönelik primerlerin test edilen suşlarda amplifikasyon başarısı göstermemesi, *L. monocytogenes*'in tür içi genetik farklılıklarının tanı süreçlerine doğrudan etki ettiğini ortaya koymaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, daha kapsamlı dizilim analizlerine dayalı primer tasarımı ve farklı gen hedeflerinin dahil edilmesi, bu patojenin tespitinde moleküler tanı araçlarının duyarlılığını ve güvenilirliğini artıracaktır. Ayrıca, bu tür primerlerin, sadece laboratuvar

ortamında saf kültürlerle değil, aynı zamanda kontamine gıda örnekleri üzerinde de test edilerek validasyonlarının yapılması önerilmektedir. Bu sayede gerçek saha koşullarında da güvenle kullanılabilir, pratik ve etkili tanı sistemleri geliştirilebilir.

4.1.5. *uspA* geninin çalışılması

Escherichia coli suşlarının doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanması amacıyla, bu türe özgü universal stress proteinlerden biri olan *uspA* genini hedefleyen bir PZR temelli identifikasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, Chen ve Griffiths (1998) tarafından bildirilen özgül primer çifti kullanılmıştır. Primerlerin doğruluğunu teyit etmek amacıyla, öncelikle referans suş olan *E. coli* ATCC 25922'den izole edilen DNA üzerinde test gerçekleştirilmiş ve amplifikasyon başarıyla elde edilmiştir.

uspA genine ait primerler için, literatürde önerilen 59 °C annealing sıcaklığı referans alınarak PZR protokolü laboratuvarımızda da denenmiş ve optimize hali ile kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre optimizasyon başarılı olmuş ve primerlerin hem tür spesifikliğinin hem de deneysel koşullara olan uyumunun yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, *uspA* geninin moleküler tanımlamada güvenilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği ve *E. coli* suşlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında, *uspA* genine ait primerlerin hem tür düzeyinde spesifiklik gösterdiği hem de uygulanan laboratuvar koşulları altında güvenilir sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda *uspA* geninin, *E. coli* tanımlamasında kullanılabilirlik etkili bir moleküler hedef olduğu, bu türün farklı suşlarının tespiti için geniş uygulama alanı bulabileceği söylenebilir. Literatürde bu genin sadece çevresel stres yanıtlarıyla değil, aynı zamanda bakteriyel fizyoloji ve patojenite süreçleriyle de ilişkili olduğu belirtilmiş olup, bu özellikleri tanısal potansiyelini daha da artırmaktadır. Bu çalışmada da optimize olarak kullanılan *uspA*-temelli PZR yöntemi, *E. coli* tanısında tür özgüllüğü yüksek, uygulanabilirliği kolay ve sonuçları tekrarlanabilir bir moleküler yaklaşım sunmaktadır. Bu yöntem, gıda güvenliği kontrollerinde, çevresel izleme çalışmalarında ve klinik tanı uygulamalarında etkili bir araç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların hızlı, güvenilir ve spesifik bir şekilde tespit edilmesini sağlamak amacıyla tür düzeyinde özgünlük gösteren primer dizaynları gerçekleştirilmiş ve bu primerlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli tanı sistemlerindeki etkinliği ayrıntılı bir biçimde değerlendirilmiştir. Moleküler tanı tekniklerinin, geleneksel kültür ve biyokimyasal yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç vermesi ve duyarlılığının yüksek olması, özellikle gıda güvenliği uygulamalarında bu yöntemlerin önemini artırmaktadır. Bu bağlamda çalışma kapsamında, gıda kaynaklı enfeksiyonlara ve salgınlara neden olan *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium ve *Staphylococcus aureus* gibi klinik ve epidemiyolojik öneme sahip bakteriyel türlere yönelik primer tasarımları yapılmış, bu primerlerin laboratuvar ortamında spesiflik, duyarlılık ve verimlilikleri test edilerek performansları analiz edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında *Bacillus* spp. için tasarlanan *bceT* genine özgü primerler, yapılan amplifikasyon deneylerinde hedef DNA bölgesini yüksek özgüllükle çoğaltmış ve optimum sonuçların 51°C annealing sıcaklığında elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu sonuç, *bceT* geninin *Bacillus* türleri içerisinde güvenilir bir tanı markırı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak aynı tür için hedeflenen *cyt/hk* ve *tuf* genlerine yönelik olarak dizayn edilen primerler, yapılan PZR analizlerinde beklenen amplifikasyon ürünlerini vermemiştir. Bu durum, söz konusu primer çiftlerinin sekonder yapı oluşturması, dimerleşme eğilimi göstermesi ya da hedeflenen gen bölgelerinde tür içi varyasyonların bulunması gibi biyoinformatik ve moleküler faktörlerden kaynaklanmış olabilir (Aydın vd., 2018; Kumar ve Chordia, 2015). Dolayısıyla, primer tasarımı sürecinde sadece dizilim uyumu değil, aynı zamanda moleküler dinamik özelliklerin de dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur.

Salmonella Typhimurium için geliştirilen primerler incelendiğinde, *iroN* genine ait primerlerin 54°C'de başarılı amplifikasyon sağladığı, ancak *iapP* genine yönelik primerlerin sabit bir sıcaklıkta hedef DNA'yı yeterince çoğaltmadığı, sadece geniş bir sıcaklık aralığına sahip gradient PZR (49-64°C) koşullarında zayıf da olsa amplifikasyon verdiği görülmüştür. Bu bulgu, *iapP* gen bölgesinin termal stabilitesinin düşük olabileceğini ve primerlerin bağlanma etkinliğinin sıcaklık değişimlerinden ciddi biçimde

etkilendiğini göstermektedir. Ayrıca, bu tür gen bölgeleri için daha hassas yöntemlerin veya alternatif hedeflerin tercih edilmesi önerilmektedir (Chen vd., 2017).

Listeria monocytogenes özelinde yapılan analizlerde, çalışmada kullanılan iap ve prs gen primerlerinin, test edilen PZR koşullarında amplifikasyon veremediği belirlenmiştir. Bu durum, bu genlerin hedef bölgelerinde oluşabilecek genetik varyasyonlar, DNA şablon kalitesinin düşüklüğü veya primerlerin bağlanma bölgelerinde oluşabilecek mutasyonlardan kaynaklanıyor olabilir (Sharma vd., 2024). Literatürde, *hlyA*, *inlA* ve *prfA* gibi alternatif genlerin *Listeria* tanısı için daha güvenilir olabileceği bildirilmektedir ve bu nedenle gelecekteki çalışmalarda bu gen bölgelerine odaklanmak uygun olacaktır (Vazquez-Armenta vd., 2020).

Escherichia coli için ise literatürde yaygın olarak kullanılan *uspA* genine yönelik mevcut primerler, yapılan deneylerde başarılı sonuçlar vermiştir. Amplifikasyonun güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği, bu genin tür içi korunmuş bölgelerinde yer alması ve literatür desteğinin güçlü olmasıyla açıklanabilir. Bu durum, *uspA* geninin *E. coli*'nin hızlı ve güvenilir tanısı için halen geçerliliğini koruyan bir moleküler hedef olduğunu göstermektedir (Chen ve Griffiths, 1998).

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, moleküler tanı sistemlerinin gıda güvenliği uygulamalarında büyük avantaj sağladığı, ancak sistemin başarısının büyük ölçüde primer tasarımına ve kullanılan hedef genlerin moleküler özelliklerine bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Tasarlanan primerlerin bir kısmı hedef genleri başarıyla amplifiye ederken, bazıları ise düşük verim ya da hiç amplifikasyon sağlayamamıştır. Bu durum, primer tasarımı sürecinde daha derinlemesine in silico analizlerin yapılması gerektiğine işaret etmektedir. Örneğin, primerlerin özgüllük analizi için NCBI Primer-BLAST gibi araçlar kullanılarak, benzer türlerle çapraz reaktivite riskleri test edilmeli; GC içeriği, erime sıcaklığı (T_m), ikincil yapı oluşumu gibi biyofiziksel özellikleri dikkate alınarak tasarımlar optimize edilmelidir (Kumar ve Chordia, 2015; Lorenz, 2012).

Özellikle *Listeria monocytogenes* gibi genetik çeşitliliği yüksek bakteriler için, tek bir gen hedefi yerine birden fazla gen bölgesine yönelik primer setleri geliştirilmesi, tanı güvenilirliğini artıracaktır. Ayrıca, geleneksel PZR yerine real-time PZR (qPZR) gibi kantitatif yöntemler kullanılarak, daha kısa sürede ve daha hassas sonuçlar elde edilebilir (Mangal vd., 2016). Multipleks PZR sistemleri sayesinde ise, tek bir reaksiyon tüpünde birden fazla patojenin eş zamanlı tespiti mümkün hale gelmektedir (Aydın vd., 2018).

Primerlerin performansı yalnızca saf kültürlerde değil, aynı zamanda gerçek gıda örnekleri üzerinde de değerlendirilmelidir. Gıda matrislerinin PZR verimini düşüren inhibitör bileşikler içerebildiği göz önünde bulundurularak, DNA izolasyon protokolleri bu etkileri ortadan kaldıracak şekilde modifiye edilmelidir (Law vd., 2015). Ayrıca, son yıllarda gelişen biyoinformatik yaklaşımlar ve makine öğrenmesi temelli algoritmalar ile, primer tasarımı özgüllük ve etkinlik daha yüksek düzeyde sağlanabilir hale gelmiştir (Yang vd., 2020).

Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen ve test edilen primerlerin önemli bir kısmı, hedef patojenlerin PZR tabanlı tespitinde umut verici sonuçlar vermiştir. Ancak, bazı primer çiftlerinin yetersiz performansı, moleküler tanı sistemlerinin başarısının, primer tasarım kalitesine ve hedef gen seçimine ne kadar bağlı olduğunu da ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, gelecekte yapılacak olan validasyon çalışmalarında primerlerin sadece saf kültürlerle değil, gerçek ve kontamine gıda örnekleri üzerinde de test edilmesi; PZR koşullarının optimize edilmesi ve yöntemlerin gıda güvenliği izleme sistemlerine entegrasyonu büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, bu çalışmada tasarlanan ve optimize edilen primerlerin gıda güvenliği izleme programlarında rutin olarak kullanılabilmesi için ulusal ve uluslararası standartlara uygun validasyon protokollerinin oluşturulması gerekmektedir. Gıda üreticileri ve kamu sağlığı otoriteleri, PZR tabanlı tanı sistemlerini HACCP gibi önleyici gıda güvenliği protokollerine entegre ederek hem ekonomik kayıpları azaltabilir hem de toplum sağlığının korunmasına katkı sağlayabilir (Awuchi, 2023).

KAYNAKÇA

- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y. ve Mori, M. (1995). "The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein". *Microbiology*, 141 (4), 983-988.
- Ahle, C. M., Stødtkilde-Jørgensen, K., Poehlein, A., Streit, W. R., Hüpeden, J. ve Brüggemann, H. (2021). "Comparison of three amplicon sequencing approaches to determine staphylococcal populations on human skin". *BMC Microbiology*, 21, 221.
- Aladhadh, M. (2023). "A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens". *Microorganisms*, 11(5), 1111.
- Alocilja, E. C. ve Radke, S. M. (2003). "Market analysis of biosensors for food safety". *Biosensors ve Bioelectronics*, 18(5-6), 841-846.
- Arslan, E. ve Uçan, U. (2006). "Hızlı Bakteriyel DNA Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması". *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 2(27), 27.
- Awuchi, C. G. (2023). "HACCP, quality, and food safety management in food and agricultural systems". *Cogent Food ve Agriculture*, 9(1), 2176280.
- Aydin, M., Carter-Conger, J., Gao, N., Gilmore, D. F., Ricke, S. C. ve Ahn, S. (2018). "Molecular identification of common *Salmonella* serovars using multiplex DNA sensor-based suspension array". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(10), 2637-2646.
- Barghouthi, S. A. (2011). "A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers". *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 430-444.
- Bäumler, A. J., Norris, T. L., Lasco, T., Voight, W., Reissbrodt, R., Rabsch, W. ve Heffron, F. (1998). "IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*". *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1446-1453.
- Berdejo, D., Merino, N., Pagán, E., García-Gonzalo, D. ve Pagán, R. (2020). "Genetic Variants and Phenotypic Characteristics of *Salmonella* Typhimurium-Resistant Mutants after Exposure to Carvacrol". *Microorganisms*, 8(6), 937.
- Bhatia, S. (2024). "Do we need a quality standard to use primers and probes from literature?" *Microbes and Infectious Diseases*, 5(1), 1-3.

Bintsis, T. (2017). "Foodborne pathogens". AIMS Microbiology, 3(3), 529-563.

Bispo, P. J. M., Belanger, N., Li, A., Liu, R., Susarla, G., Chan, W., Chodosh, J., Gilmore, M. S. ve Sobrin, L. (2023). "An All-in-One Highly Multiplexed Diagnostic Assay for Rapid, Sensitive, and Comprehensive Detection of Intraocular Pathogens". American journal of ophthalmology, 250, 82-94.

Bustin, S. ve Huggett, J. (2017). "qPCR primer design revisited". Biomolecular Detection and Quantification, 14, 19-28.

Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S. ve Cabanes, D. (2011). "The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle". Virulence, 2(5), 379-394.

Chemburu, S., Wilkins, E. ve Abdel-Hamid, I. (2005). "Detection of pathogenic bacteria in food samples using highly-dispersed carbon particles". Biosensors ve Bioelectronics, 21(3), 491-499.

Chen, J. ve Griffiths, M.W. (1998). "PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram- negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein". Letters in applied microbiology, 27(6), 369-371.

Chen, J.Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P. ve 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.

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A. ve Emler, S. (2020). "Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory". Clinical Microbiology Reviews, 33(4), e00053-19.

Clarridge, J. E. (2004). "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases". Clinical Microbiology Reviews, 17(4), 840-862.

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. ve Gordon, D. M. (2013). "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups". Environmental Microbiology Reports, 5(1), 58-65.

Crosa, J. H. (1997). "Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 61(3), 319-336.

Crouch, M.-L. V., Castor, M., Karlinsey, J. E., Kalhorn, T. ve Fang, F. C. (2008). "Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Molecular Microbiology*, 67(5), 971-983.

Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märklbauer, E. ve Granum, P. E. (2021). "The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*". *Toxins*, 13(2), Article 2.

Dlamini, B. C. ve Adetunji, A. I. (2023). "Chapter 11 - Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) and Food Safety Management Systems". İçinde O. A. Ijabadeniyi ve O. Folake Olagunju (Ed.), *Food Safety and Toxicology: Present and Future Perspectives* (ss. 243-262). Berlin: De Gruyter.

Elbehiry, A., Abalkhail, A., Marzouk, E., Elmanssury, A. E., Almuzaini, A. M., Alfheaid, H., Alshahrani, M. T., Huraysh, N., Ibrahim, M., Alzaben, F., Alanazi, F., Alzaben, M., Anagreyah, S. A., Bayameen, A. M., Draz, A. ve Abu-Okail, A. (2023). "An Overview of the Public Health Challenges in Diagnosing and Controlling Human Foodborne Pathogens". *Vaccines*, 11(4), 725.

Eom, J. S., Kim, J. S., Jang, J. I., Kim, H. G., Bang, I.-S. ve Park, Y. K. (2012). "Effect of iacP mutation on flagellar phase variation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium strain UK-1". *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4332-4341.

Farrukh, M., Munawar, A., Nawaz, Z., Hussain, N., Hafeez, A. B. ve Szweda, P. (2025). "Antibiotic resistance and preventive strategies in foodborne pathogenic bacteria: A comprehensive review". *Food Science and Biotechnology*, 34(10), 2101-2129.

Fung, F., Wang, H.-S. ve Menon, S. (2018). "Food safety in the 21st century". *Biomedical Journal*, 41(2), 88-95.

Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler-McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E. ve Taberlet, P. (2016). "Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species". *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307.

Gong, Y., Li, X., Wang, J., Zhao, Y., Meng, J. ve Zhai, L. (2025). "Unveiling *Salmonella* Derby Survival: Stress Responses to Prolonged Hyperosmotic Stress". *Foods*, 14(9), 9.

Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. ve Winkelmann, G. (2003). "Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3677-3682.

Harvey, K. L., Jarocki, V. M., Charles, I. G. ve Djordjevic, S. P. (2019). "The Diverse Functional Roles of Elongation Factor Tu (EF-Tu) in Microbial Pathogenesis". *Frontiers in Microbiology*, 10, 2351.

Heckler, C., Vale, M. G., Canales, H. D. S., Stradiotto, G. C., Giordano, A. L. P. L., Schreiber, A. Z. ve Sant'Ana, A. S. (2024). "Spore-forming bacteria in gelatin: Characterization, identification by 16S rRNA and MALDI-TOF mass spectrometry (MS), and presence of heat resistance and virulence genes". *International Journal of Food Microbiology*, 422, 110813.

Hess, J., Gentschev, I., Szalay, G., Ladel, C., Bubert, A., Goebel, W. ve Kaufmann, S. H. (1995). "*Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*". *Infection and Immunity*, 63(5), 2047-2053.

Huang, Z., Yu, X., Yang, Q., Zhao, Y. ve Wu, W. (2021). "Aptasensors for *Staphylococcus aureus* Risk Assessment in Food". *Frontiers in Microbiology*, 12, 714265.

Hwang, S. M., Kim, M. S., Park, K. U., Song, J. ve Kim, E.C. (2011). "*tuf* gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci". *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4142-4149.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. ve Nakata, A. (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product". *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-5433.

Iversen, S., Johannesen, T. B., Ingham, A. C., Edslev, S. M., Tevell, S., Månsson, E., Nilsson-Augustinsson, Å., Söderquist, B., Stegger, M. ve Andersen, P. S. (2020). "Alteration of Bacterial Communities in Anterior Nares and Skin Sites of Patients Undergoing Arthroplasty Surgery: Analysis by 16S rRNA and Staphylococcal-Specific *tuf* Gene Sequencing". *Microorganisms*, 8(12), 12.

Kabiraz, M. P., Majumdar, P. R., Mahmud, M. M. C., Bhowmik, S. ve Ali, A. (2023). "Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review". *Heliyon*, 9(4), e15482.

Klišťincová, N., Pin, L., Puškárová, A., Giannino, D., Bučková, M., Lambreva, M. D., Manfredini, A., Canfora, L., Pangallo, D. ve Pinzari, F. (2024). "From farm to fork: Fungal and bacterial contaminants and their diagnostics in the production steps of ready-to-eat salads". *Trends in Food Science ve Technology*, 150, 104573.

Kumar, A. ve Chordia, N. (2015). "In Silico PCR Primer Designing and Validation". İçinde C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (ss. 143-151). Berlin: Springer.

Kumar, A., Grover, S. ve Batish, V. K. (2015). "Exploring specific primers targeted against different genes for a multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes*". *3 Biotech*, 5(3), 261-269.

Kürekci, C., Aydin, M., Yipel, M., Katouli, M. ve Gündoğdu, A. (2017). "Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey". *Journal of Water and Health*, 15(5), 788-798.

Lauri, A. ve Mariani, P. O. (2009). "Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety". *Genes ve Nutrition*, 4(1), 1-12.

Law, J. W. F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G. ve Lee, L.H. (2015). "Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations". *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.

Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C. ve Shi, X. (2012). "Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis". *Food Control*, 27(1), 87-93.

Lorenz, T. C. (2012). "Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies". *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 63, 3998.

Madilo, F. K., Islam, M. N., Letsyo, E., Roy, N., Klutse, C. M., Quansah, E., Darku, P. A. ve Amin, M. B. (2023). "Foodborne pathogens awareness and food safety knowledge of street-vended food consumers: A case of university students in Ghana". *Heliyon*, 9(7), e17795.

Mangal, M., Bansal, S., Sharma, S. K. ve Gupta, R. K. (2016). "Molecular Detection of Foodborne Pathogens: A Rapid and Accurate Answer to Food Safety". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1568-1584.

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Dymock, D. ve Wade, W. G. (1998). "Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA". *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 795-799.

Matle, I., Mbatha, K. R. ve Madoroba, E. (2020). "A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis". *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), 1869.

Myer, P. R., Kim, M., Freetly, H. C. ve Smith, T. P. L. (2016). "Evaluation of 16S rRNA amplicon sequencing using two next-generation sequencing technologies for phylogenetic analysis of the rumen bacterial community in steers". *Journal of Microbiological Methods*, 127, 132-140.

Nachin, L., Nannmark, U. ve Nyström, T. (2005). "Differential Roles of the Universal Stress Proteins of *Escherichia coli* in Oxidative Stress Resistance, Adhesion, and Motility". *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6265-6272.

Nakata, A., Shinagawa, H. ve Amemura, M. (1982). "Cloning of alkaline phosphatase isozyme gene (iap) of *Escherichia coli*". *Gene*, 19(3), 313-319.

Park, S. H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M. C., Gilmore, D. F., Bouldin, J. L., Ahn, S. ve Ricke, S. C. (2014). "Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products". *Food Microbiology*, 38, 250-262.

Picard, F. J., Ke, D., Boudreau, D. K., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., Ouellette, M., Roy, P. H. ve Bergeron, M. G. (2004). "Use of tuf Sequences for Genus-Specific PCR Detection and Phylogenetic Analysis of 28 Streptococcal Species". *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3686-3695.

Safavieh, M., Nahar, S., Zourob, M. ve Ahmed, M. U. (2015). "15 - Microfluidic biosensors for high throughput screening of pathogens in food". İçinde A. K. Bhunia, M. S. Kim ve C. R. Taitt (Ed.), *High Throughput Screening for Food Safety Assessment* (ss. 327-357). Cambridge: Woodhead Publishing.

Sharma, R. K., Jalalpure, S. S., Pathak, S., Ganapathy, S., Desvaux, M., Roy, S. ve Hegde, S. (2024). "Molecular detection of *Listeria monocytogenes* from different dairy and street food sources in North Karnataka, India". *Journal of Infection and Public Health*, 17(4), 696-703.

Sharma, V., Sheikh, I., Kushwaha, V., Gupta, S., Kaushal, A., Ramniwas, S., Bansal, P., Sharma, A., Sharma, V., Sharma, J. K., Panwar, A. ve Sharma, A. K. (2024). "Chapter 2 Biological databases and bioinformatics tools". İçinde A. K. Sharma ve V. Sharma (Ed.), *Bioinformatics: Drug Discovery* (ss. 13-40). Berlin: De Gruyter.

Shirshikov, F. V., Pekov, Y. A. ve Miroshnikov, K. A. (2019). "MorphoCatcher: A multiple-alignment based web tool for target selection and designing taxon-specific primers in the loop-mediated isothermal amplification method". *PeerJ*, 7, e6801.

Tong, X. ve Zhang, H. (2019). "Perception, Amplification and Communication: A Case Study of Food Safety Risks". *China's Emergency Management*, 71-115.

Ugbogu, E. A., Schweizer, L. M. ve Schweizer, M. (2022). "Contribution of Model Organisms to Investigating the Far-Reaching Consequences of PRPP Metabolism on Human Health and Well-Being". *Cells*, 11(12), 1909.

Unnevehr, L. ve Hoffmann, V. (2015). "Food safety management and regulation: International experiences and lessons for China". *Journal of Integrative Agriculture*, 14(11), 2218-2230.

Uyanık, T. (2022). "Samsun İlindeki Hastane Kantinlerinde Satışa Sunulan Tüketime Hazır Sandviçlerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* Varlığının Araştırılması". *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 1.

Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Oñate, M. A., Martinez-Tellez, M. A., Lopez-Zavala, A. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Gutierrez-Pacheco, M. M. ve Ayala-Zavala, J. F. (2020). "Quercetin repressed the stress response factor (sigB) and virulence genes (*prfA*, *actA*, *inlA*, and *inlC*), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*". *Food Microbiology*, 87, 103377.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. ve Adley, C. (2010). "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors". *Biotechnology Advances*, 28(2), 232-254.

Yang, Z., Le, J. T., Hutter, D., Bradley, K. M., Overton, B. R., McLendon, C. ve Benner, S. A. (2020). "Eliminating primer dimers and improving SNP detection using self-avoiding molecular recognition systems". *Biology Methods ve Protocols*, 5(1), bpaa004.

Zahir, A., Ge, Z. ve Khan, I. A. (2025). "Public Health Risks Associated with Food Process Contaminants – A Review". *Journal of Food Protection*, 88(2), 100426.

Zhang, M., Wu, J., Shi, Z., Cao, A., Fang, W., Yan, D., Wang, Q. ve Li, Y. (2022). "Molecular Methods for Identification and Quantification of Foodborne Pathogens". *Molecules*, 27(23), 8262.

Zhang, R.-Y., Zou, B., Yan, Y.W., Jeon, C. O., Li, M., Cai, M. ve Quan, Z. X. (2020). "Design of targeted primers based on 16S rRNA sequences in meta-transcriptomic datasets and identification of a novel taxonomic group in the Asgard archaea". *BMC Microbiology*, 20(1), 25.

Zimoń, B., Psujek, M., Matczak, J., Guziński, A., Wójcik, E. ve Dastych, J. (2024). "Novel multiplex-PCR test for *Escherichia coli* detection". *Microbiology Spectrum*, 12(6), e03773-23.