

BEBEK MAMALARINDA DİREKT PCR YÖNTEMİ İLE *CRONOBACTER SPP.* TESPİTİ

Gökçe Polat Yemiş^{1*}, İbrahim Çakır² A. Kadir Halkman³

¹Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya

²Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu

³Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 16.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 20.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 12.07.2016

Özet

Cronobacter spp., bebeklerde ve çocuklarda hayati tehlike yaratan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarının önemli bir sebebidir. Çeşitli klinik vakalarda *Cronobacter* spp. enfeksiyonu ile bebek maması tüketimi epidemiyolojik olarak ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada bebek mamasında patojenin hızlı tanısı için direkt PCR yöntemi üzerine modifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile 10^2 KOB/mL düzeyinde ve 4 saatlik ön zenginleştirme sonrasında uygulanan PCR yöntemi ile 1 KOB/mL seviyesinde *Cronobacter* spp. belirlenebilmiştir. *Cronobacter* spp. tespitinde uygulanan PCR yönteminin kültürel belirleme yöntemlerine oranla daha hızlı ve daha duyarlı olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Cronobacter* spp., bebek maması, izolasyon, PCR

DETECTION OF *CRONOBACTER SPP.* IN POWDERED INFANT FORMULA BY PCR

Abstract

Cronobacter spp. causes meningitis, sepsis, and necrotizing enterocolitis in neonates and infants. *Cronobacter* spp. infections have been epidemiologically associated with consumption of reconstituted powdered infant formula. In this study, the modified PCR method for the rapid detection of *Cronobacter* spp. were performed. Detection limit of PCR assay for *Cronobacter* spp. was determined to be 10^2 CFU/mL directly and 1 CFU/mL after 4-h of enrichment step in infant formula. The result showed that the modified PCR based technique described in this study was found more rapid and sensitive than the conventional methods for detection of *Cronobacter* spp. from infant formula.

Keywords: *Cronobacter* spp., infant formula, isolation, PCR

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gokceyemis@sakarya.edu.tr, ☎ (+90) 264 295 7038, 📠 (+90) 264 295 5601

Bu makale Gökçe Polat Yemiş'in Doktora tezinin bir bölümünden üretilmiştir. This paper is a part of Gökçe Polat Yemiş's Ph. D. thesis.

GİRİŞ

Son yıllarda önemi artan bir patojen olan *Cronobacter* spp. (eski adı ile *Enterobacter sakazakii*), bebeklerde hayati risk oluşturan menenjit, sepsis ve nekrotizan enterokolit enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Henüz tam olgunlaşmamış bağırsak yapısına sahip olan prematüre, 28 günden küçük, düşük doğum ağırlığına sahip ve medikal bakım gören bebekler *Cronobacter* spp. enfeksiyonu riski altındadır (1-3). *Cronobacter* spp. enfeksiyonunun görülme oranı 12 aydan küçük bebekler için 1/100 bin iken, düşük doğum ağırlığına (<1500 g) sahip bebeklerde bu oran 9.4/100 bin'dir. Doğal yaşam alanı bilinmemekle beraber; bakteri gıdadan, çevreden ve farklı klinik kaynaklardan izole edilmiştir. Yenidoğan bebeklerde görülen enfeksiyonlar sebebiyle *Cronobacter* spp.'nin, bebek maması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Salgınlar da çoğunlukla yenidoğan bakım ünitelerinde gerçekleşmektedir. *Cronobacter* spp. ozmotik ortam ve kurutma gibi çevresel stres koşullarına diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine kıyasla daha dirençlidir ve düşük su aktivitesine sahip olan bebek mamasında (0.25-0.5 a_w) uzun süre canlılığını korumaktadır. Ancak, epidemiyolojik araştırmalar bebek mamasının yanı sıra, hastane ortamlarında mamaların hazırlanması için kullanılan araç ve gereçleri de kontaminasyon kaynağı olarak göstermiştir (4-8).

Uluslararası Mikrobiyolojik Spesifikasyonlar Komisyonu (International Commission on Microbiological Specifications for Foods; ICMSF) *Cronobacter* spp.'yi potansiyel olarak yaşamı tehdit eden ya da önemli kronik sekellere yol açan ciddi bir tehlike olarak tanımlamış ve *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* tip A ve tip B gibi gıda kaynaklı ya da *Cryptosporidium parvum* gibi su kaynaklı patojenler ile aynı grupta yer almasına karar vermiştir. Bakterinin, yeni doğmuş bebeklerin üst gastrointestinal sistemlerinde düşük pH koşullarıyla karşılaşmayacağı ve hızla ince bağırsaklara geçerek enfeksiyona neden olabileceği belirtilmiştir.

Cronobacter spp. ilk kez 1958 yılında İngiltere'de iki bebeğin ölümü ile sonuçlanan bir salgında yenidoğanlarla ilişkilendirilmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalarda ise *Cronobacter* türleri içerisinde yalnızca *C. sakazakii*, *C. malonaticus* ve *C. turicensis*'in neonatal enfeksiyonlarla ilişkili

olduğu bildirilmiştir (2, 4, 6, 9). Bakteri, en çok yeni doğmuş bebekler ve 3 günlük ile 4 yaş arası çocuklarda hastalığa neden olarak kendini göstermiş olup, hastalığa yakalanan bebeklerde ölüm oranının % 40-80 olduğu ve hayatta kalanlar için süregelen sorunların nörolojik rahatsızlıklarla sonuçlanabildiği bildirilmiştir (10). Bunun üzerine toz bebek maması kullanımı ile ortaya çıkan enfeksiyon riskini azaltmak için uygun stratejilerin uygulamasına yönelik çabalar artmıştır.

Son yıllarda *Cronobacter* spp. izolasyonunda var olan yöntemlere alternatif daha hızlı, etkin ve güvenilir yöntem arayışına gidilmiş ve bu konuda araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Patojenlerin analizinde kullanılan klasik yöntemlerde analiz sürelerinin uzunluğu önemli bir dezavantajdır. Moleküler teknikler, bakterilerin tanımlanması, karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında büyük öneme sahiptir. Bu nedenle patojen mikroorganizmaların tespitinde DNA'ya dayalı teknikler oldukça önem kazanmış ve özellikle PCR tekniği klasik yöntemlerin yerini alabilecek hızlı ve duyarlı bir alternatif olarak öne çıkmıştır. *Cronobacter* spp.'nin genetik tiplendirme çalışmalarında tüm gen bölgelerinin analizine imkân sağlayan, sınıflandırma ve karakterizasyonda oldukça hızlı bir yöntem olan PCR temelli teknikler kullanılmaktadır. Ribozomal 16S rRNA geni, 16S ve 23S rRNA genleri arasında yer alan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi ile *thdF*, *rhoA*, *rhoB*, *ompA*, *recN* ve *gluA* gibi hedef genler *Cronobacter* spp.'nin tanımlanmasında kullanılan genlerdir (11-21).

Bu araştırmada direkt PCR uygulaması ile bebek mamasında *Cronobacter* spp.'nin tespitinde klasik kültürel belirleme yöntemine kıyasla daha hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bebek maması

Materyal olarak kullanılan toz bebek maması (başlangıç), Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda (TAEK, SANAEM, Ankara) 10 kGy dozda ışınlanarak sterilize edilmiştir.

Bakteri kültürü

Araştırmada, *C. muytjensii* ATCC 51329, *C. sakazakii* (bebek ek gıdasından izole edilerek moleküler tanısı gerçekleştirilen suş G73), bakteri kültürleri kullanılmıştır. *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin spesifikliğini tespitinde ise referans

bakteri kültürleri olarak *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus cereus* kullanılmıştır. -20°C'ta dondurularak muhafaza edilen bakteri kültürleri denemelerden önce Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'ta 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir.

Bebek maması örneklerinin inokülasyonu

Bebek maması, üretici firmanın hazırlama talimatı doğrultusunda steril su ile hazırlanmıştır. Geri alma çalışmalarında belirli sayıda (10^1 - 10^6 KOB/mL) *C. muytjensii* ATCC 51329 suşu steril bebek mamasına katılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra herhangi bir ön zenginleştirme işlemi yapılmaksızın buradan alınan örnekte hedef bakterinin hangi sayıda geri alınabileceği tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu belirlemeler DNA izolasyon kiti kullanılarak ve kaynatma yöntemi ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada steril bebek maması örnekleri standart suş ile inoküle edilmiş (yaklaşık 10^0 , 10^1 ve 10^2 KOB/mL) ve 4; 6 ve 8 saatlik ön zenginleştirme işlemi uygulanarak hedef bakterinin direkt PCR yöntemi ile belirlenmesi için gerekli optimum ön zenginleştirme süresi saptanmıştır.

DNA izolasyonu

C. muytjensii ATCC 51329 standart suşu inoküle edilmiş bebek mamalarından DNA izolasyonu iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Birinci yöntemde bebek mamasından *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA izolasyonu Fermantas Genomic DNA Purification Kit #K0512 yardımıyla gerçekleştirilmiştir. DNA kiti ile izolasyon için 5 mL bebek maması örneği 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş (Sigma 3K30) ve elde edilen pelet 200 µL Tris-EDTA (TE)'da çözülmüştür. Daha sonra 400 µL lizis çözültüsü eklenerek 65 °C'ta 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 600 µL kloroform eklenerek 12000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında üst faz alınıp 800 µL presipitasyon çözültüsü eklenerek 12000 x g'de 2 dakika yeniden santrifüj edilmiş ve süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır. Elde edilen DNA peleti 100 µL 1.2 M NaCl'de çözüldükten sonra üzerine 300 µL soğuk etanol eklenerek -20°C'ta 10 dakika bekletilmiştir. 12000 x g'de 4 dakika santrifüj işleminden sonra etanol uzaklaştırılıp pelet 50-100 mL TE içerisinde çözülmüştür. Ekstraktlar

kullanılınca kadar -20 °C'da muhafaza edilmiştir. İkinci yöntemde ise bebek maması örneğinde bulunan bakteriler kaynatma yöntemi ile lize edilerek DNA'ları açığa çıkarılmış ve buradan PCR aşamasına geçilerek hedef bakterinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır (21). Bu amaçla 1 mL bebek maması örneği 16000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş (Sigma 3K30) ve elde edilen pelet 1 mL steril damıtık suda çözülmüştür. Elde edilen süspansiyon ısıtıcı blokta (Thermolyne 17600 Dri-Bath) 100 °C'ta 10 dakika kaynatıldıktan sonra 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatanttan alınan 10 µL yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılarak PCR işleminde kullanılmıştır.

DNA'nın PCR'da amplifikasyonu

PCR analizlerinde kullanılan 16S rRNA spesifik primerleri National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında bulunan *Cronobacter* türlerine ait 16S rRNA dizileri ile karşılaştırılarak %100 homolojiyle uygunluğu belirlenmiştir. Belirlenen primer dizileri ile *Cronobacter* spp.'nin 16S rRNA gen bölgesinin 929 baz çiftlik (bc) bölümü çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin oligonükleotid dizilimi: Esak-F (Forward primer) 5' GCT YTG CTG ACG AGT GGC GG 3' ve Esak-R (Reverse primer) 5' ATC TCT GCA GGA TTC TCT GG 3' şeklindedir. PCR reaksiyon karışımı; 0.05 U/mL Taq DNA polimeraz, 4mM MgSO₄, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP içeren PCR master mix (Fermantas), 50 µM forward primer (Thermo) ve 50 µM reverse primerden (Thermo) oluşmaktadır. Uygun konsantrasyonlardan oluşan reaksiyon karışımına PCR işlemi uygulanmıştır. PCR döngüsü; 94 °C'ta 2 dakika ön denatürasyon, 94 °C'ta 30 saniye, 58 °C'da 30 saniye, 72 °C'ta 30 saniye (50 döngü) ve 72 °C'ta 5 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi

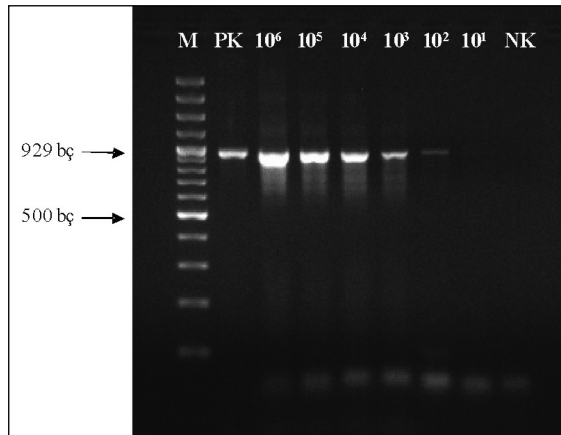
İzolasyonu yapılan DNA örnekleri için %1'lik agaroz jeller, PCR sonucunda elde edilen ampikonların analizi için %1.5'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Agaroz, 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA; 10X TBE: 0.9M Tris, 0.9M Borik Asit ve 0.02M EDTA) tamponunda eritildikten sonra DNA'nın ultraviyole ışık altında görünmesini sağlayan etidyum bromür ilave edilerek tarak içeren elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel polimerize olduktan sonra 1X TBE içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. DNA örnekleri

ve PCR ürünlerinden 10'ar µL alınarak, 2'şer µL 6X yükleme boya çözeltisi (Fermantas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve ilk kuyucuğa yüklenen 100 bç'lik DNA ladder (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Fermantas) eşliğinde 90V elektrik akımında yaklaşık 90 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel, jel görüntüleme sistemi ile bilgisayarda incelenerek görüntüleri kaydedilmiştir (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak).

SONUÇ ve TARTIŞMA

Bebek mamalarından *Cronobacter* spp. tespitinde direkt PCR yönteminin duyarlılığı

Geri alma çalışmalarında belirli sayıda (10^1 - 10^6 KOB/mL) *C. muytjensii* ATCC 51329, bebek maması ortamına katılıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra buradan alınan örnekte direkt PCR yöntemi ile hedef bakterinin hangi sayıda geri alınabileceği tespit edilmiştir. Hedef bakterinin tespiti DNA izolasyon kiti ve kaynatma işlemi olmak üzere iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Ön zenginleştirme işlemi uygulanmaksızın DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen ve ardından PCR uygulanan örneklerin agaroz jel görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir. Bu yöntem ile bebek mamalarında en düşük 10^2 KOB/mL düzeyinde bakteri kontamine edilen bebek

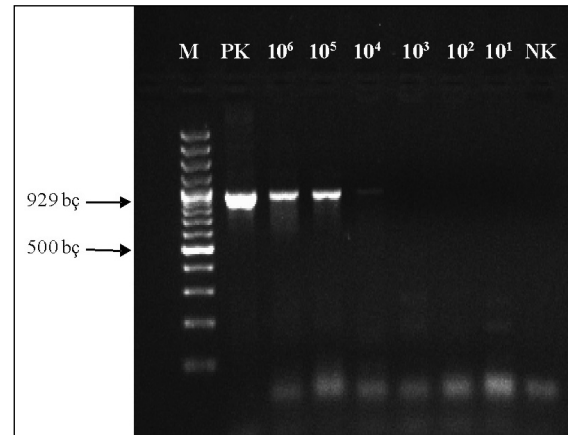


Şekil 1. Rekonstitüe bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Figure 1. Direct detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR (DNA Isolation Method I). PCR products amplified from infant formula containing 10^1 to 10^6 CFU/mL of *C. muytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA)

mamasından DNA izolasyonu gerçekleştirilirken, 10^1 KOB/mL düzeyinde bakteri kontamine edilen bebek mamalarından izole edilen DNA örnekleri jelde gözlenmemiştir. Bebek mamasında *Cronobacter* spp. tespitinde DNA izolasyon kiti ile elde edilen en düşük belirleme limiti (10^2 KOB/mL) Wang ve ark. (22) tarafından bildirilen değere (1.2×10^3 KOB/mL) göre daha düşük olmasına karşın Seo ve Brackett (23) tarafından belirlenen değerle (1.0×10^2 KOB/mL) oldukça benzerlik göstermektedir.

Belirli sayıda *C. muytjensii* ATCC 51329 standart suşu ile kontamine edilmiş bebek mamalarından DNA izolasyonu yapılmadan, kaynatılarak elde edilen hücre lizatından hazırlanan süpernatant, kalıp DNA olarak kullanılmış ve bu örnekler de spesifik primerler kullanılarak PCR işlemi uygulanmıştır. Bu örneklerle ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 2'de verilmiştir. Uygulanan bu yöntem ile bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespitinde limit değer 10^4 KOB/mL olarak belirlenmiştir. 10^1 ; 10^2 ve 10^3 KOB/mL düzeyinde yapılan kontaminasyonlardan hazırlanan jellerde özgün bant gözlenmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespitinde, DNA izolasyon kiti ile uygulanan yöntemin kaynatma yöntemine göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır.



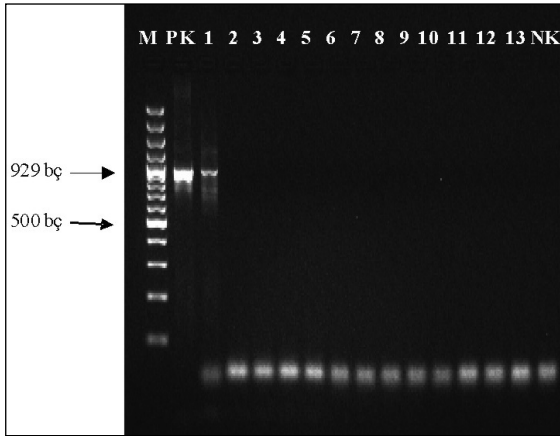
Şekil 2. Rekonstitüe bebek mamasından direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (kaynatma yöntemi). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Figure 2. Direct detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR (DNA Isolation Method II). PCR products amplified from infant formula containing 10^1 to 10^6 CFU/mL of *C. muytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA)

Araştırma kapsamında PCR analizlerinde kullanılan, *Cronobacter* türlerine özgü 16S rRNA gen bölgesinin 929 bç'lik DNA fragmentini çoğaltan primerlerin spesifikliğı belirlenmiştir (Şekil 3). Bu amaçla *C. mytjensii* ATCC 51329 standart suşu dışında bebek maması ve ek gıda bileşenlerinden yaygın olarak izole edilen ve tanımlanan bakteriler ile özellikle bebeklerde potansiyel enfeksiyon etkeni bakteriler referans olarak kullanılmıştır. Belirli sayıda (10^6 KOB/mL) test bakterileri ile kontamine edilmiş bebek mamasında yapılan direkt PCR sonrasında *C. mytjensii* ATCC 51329 ve sekans analizi sonucu *C. sakazakii* olarak tanımlanan G73 kodlu suş dışında diğer bakteriler için jelde bant gözlenmemiş ve kullanılan primerlerin *Cronobacter* spp. için spesifik olduğu belirlenmiştir.

Ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile bebek mamalarından *Cronobacter* spp. tespiti

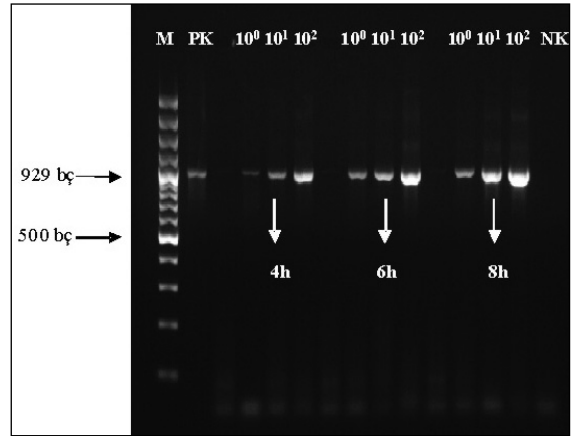
Yapılan çalışmalarda *Cronobacter* spp.'nin bebek mamalarındaki kontaminasyon düzeyinin oldukça düşük sayılarda (0,36-66 KOB/100 g) olduğu bildirilmiştir (1). Bu nedenle *Cronobacter* spp.



Şekil 3. *Cronobacter* türlerine özgü primerlerin spesifikliğinin tespiti. M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. mytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), 1: *C. sakazakii* (G73), 2: *E. cloacae*, 3: *E. aerogenes*, 4: *E. coli*, 5: *K. pneumoniae*, 6: *K. oxytoca*, 7: *A. baumannii*, 8: *C. freundii*, 9: *S. Enteritidis*, 10: *P. aeruginosa*, 11: *B. cereus*, 12: *S. aureus*, 13: *L. monocytogenes*, NK: Negatif Kontrol

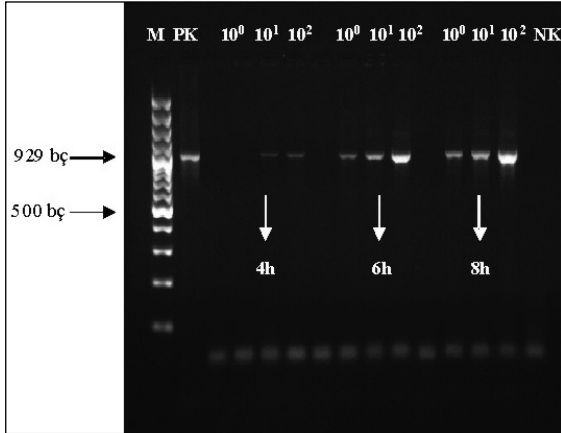
tespitine yönelik mevcut yöntemlerde bakterinin geri kazanım oranını artırmak için zenginleştirme işlemi uygulanmaktadır. Araştırma kapsamında bebek maması örneklerinde, selektif olmayan ön zenginleştirme ortamında (rekonstitüe bebek maması) 37 °C'ta 4; 6 ve 8 saatlik inkübasyon süreleri kullanılarak yaklaşık 10^0 ; 10^1 ve 10^2 KOB/mL seviyesindeki hedef bakterinin direkt PCR yöntemi ile belirlenmesi için gerekli en kısa ön zenginleştirme süresi saptanmıştır. Belirli sayıda bakteri ile kontamine edilmiş ve ön zenginleştirme işlemine tabi tutulmuş bebek maması örneklerinden DNA izolasyon kiti ve kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış, ardından PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerle ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4 ve Şekil 5'de verilmiştir.

DNA izolasyon kiti kullanılarak kontamine edilmiş bebek mamalarında yalnızca 4 saatlik ön zenginleştirme işleminin uygulanması ile 1 KOB/mL seviyesinde *Cronobacter* varlığı tespit edilebilmiştir (Şekil 4). Buna karşın kaynatma yöntemi uygulanarak gerçekleştirilen direkt PCR yöntemi ile 4 saatlik ön zenginleştirme işlemi sonrasında 10 KOB/mL seviyesinde *Cronobacter*



Şekil 4. Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilen yöntem). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. mytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol

Figure 4. Detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR after an enrichment step (DNA Isolation Method I). PCR products amplified from infant formula containing 10^0 to 10^2 CFU/mL of *C. mytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. mytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA).



Şekil 5. Rekonstitüe bebek mamasından ön zenginleştirme sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* spp. tespiti (kaynatma yöntemi). M: Marker (100 bp DNA ladder), PK: Pozitif Kontrol (*C. muytjensii* ATCC 51329 DNA'sından çoğaltılmış PCR ürünü), NK: Negatif Kontrol
Figure 5. Detection of *Cronobacter* spp. in reconstituted infant formula by PCR after an enrichment step (DNA Isolation Method II). PCR products amplified from infant formula containing 10^0 to 10^2 CFU/mL of *C. muytjensii* ATCC 51329. M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder), PK: Positive control (PCR products amplified from *C. muytjensii* ATCC 51329 DNA). NK: Negative control (PCR run without any template DNA).

belirlenebilirken, 6 saatlik ön zenginleştirme sonrasında *Cronobacter* tespitinde limit değer 1 KOB/mL olarak saptanmıştır (Şekil 5). Ön zenginleştirme işlemi sonrası direkt PCR yöntemi ile *Cronobacter* tespitinde, DNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilen yöntemin (4 saatlik bir ön zenginleştirme ile 1 KOB/mL duyarlılıkta tespit) kaynatma yöntemine göre daha duyarlı olduğu ve bu yöntemde daha kısa bir ön zenginleştirme süresine ihtiyaç duyulduğu saptanmıştır. Buna karşın analiz maliyeti göz önüne alındığında 6 saatlik bir ön zenginleştirme ile kaynatma yönteminin (1 KOB/mL duyarlılıkta) daha avantajlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Cronobacter spp. tespitinde PCR yönteminin, kültürel belirleme yöntemlerine göre etkinliği, birçok araştırmacı tarafından karşılaştırmalı olarak araştırılmış ve PCR yönteminin, kültürel belirleme yöntemlerine oranla daha hızlı ve daha duyarlılıkta sonuç verdiği bildirilmiştir. Gutierrez-Rojo ve Torres-Chavollo (24) tarafından yapılan çalışmada, direkt PCR yöntemi ile 10^5 KOB/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. tespit edilirken, 8 saatlik selektif zenginleştirme ile yapılan PCR sonucunda 1 KOB/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. saptanmıştır.

Araştırmacılar tarafından 50 bebek maması örneği klasik yöntem ve direkt PCR yöntemi ile analiz edilmiş ve analiz sonrasında PCR yöntemi ile 39 örnekte *Cronobacter* spp. pozitif olarak doğrulanırken, klasik yöntemde 31 örnekte pozitif olarak doğrulanmıştır. 16S-23S rDNA genini kodlayan ITS gen bölgeleri hedef alınarak yapılan başka bir çalışmada, TaqMan prob ve SYBR Green temelli olmak üzere iki farklı real-time PCR tekniği ile *Cronobacter* spp. toz bebek maması örneklerinde 1.1 KOB/100 g seviyesinde tespit edilebilmiştir (12). Mohan Nair ve Venkitanarayanan (21), tarafından yapılan çalışmada, bebek mamasında direkt PCR yöntemi ile 10^3 KOB/mL düzeyinde ve 8 saatlik zenginleştirme sonrasında 0.1 KOB/mL düzeyinde *Cronobacter* spp. belirlenmiştir. Zimmermann ve ark. (14) tarafından real-time PCR ve *ompA* hedef geni kullanılarak toz bebek mamasında *Cronobacter* spp.'nin hızlı tespitine yönelik yapılan diğer bir çalışmada, brain heart infusion (BHI) broth besiyerinde 12 saatlik zenginleştirme ile 10 KOB/g düzeyinde hedef bakteri tespit edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, kantitatif real-time PCR ile *cgcA* hedef geni ve TaqMan prob kullanılarak, toz bebek mamasında zenginleştirme işlemi yapılmaksızın 1100 KOB/g, tamponlanmış peptonlu suda gerçekleştirilen 6 saatlik zenginleştirme sonrasında ise 2 KOB/25 g (0.08 KOB/g) düzeyinde *C. sakazakii* belirlenebilmiştir (25).

Standart kültürel yöntemle (ISO/TS 22964) *Cronobacter* spp. izolasyonu ve biyokimyasal identifikasyonu için 6 günlük bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır (26). Bu çalışmada, bebek mamasından *Cronobacter* spp. tespitinde (1 KOB/mL düzeyinde) uygulanan direkt PCR yöntemi ile kit kullanılarak yalnızca 10 saat, kaynatma yöntemi ile ise yalnızca 12 saat sonunda sonuç alınabilmektedir. Biyokimyasal izolasyon ve tanı yöntemleri kullanılarak yapılan kültüre dayalı yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Bunlar; izolasyon ve tanı için uzun zaman gereksinimi, tür düzeyinde kesin tanı yapılmasında karşılaşılan yanlış negatif sonuçlar ve belki de en önemlisi hasar görmüş mikroorganizmaların kültürel yöntemlerle geliştirilmesinde karşılaşılan zorluklardır. Bu ve benzeri nedenlerle gıdalardan patojen mikroorganizmaların aranmasında direkt PCR yönteminin kullanılması son zamanlarda üzerinde çok durulan bir konudur. Klinik

mikrobiyolojide patojenlerin izolasyonunda PCR temeline dayalı yöntemler patojen aranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin diğer bazı avantajları da canlı fakat kültürü yapılamayan (viable but non-culturable; VBNC) mikroorganizmaların da belirlenmesine olanak sağlamakta, aynı anda çok sayıda örnek ile çalışılmasına olanak tanımaktadır. Yüksek duyarlılık ve seçicilik gibi avantajlarının yanı sıra, hızlı ve otomasyona uyum sağlayan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (27).

Araştırma sonunda, *Cronobacter* spp. tespitinde klasik kültürel yöntemlere göre daha kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta sonuç veren PCR bazlı bir yöntem geliştirilmiştir. Kontamine edilmiş bebek mamalarında yalnızca 4 saatlik bir ön zenginleştirme sonrası uygulanan direkt PCR yöntemi ile 1 KOB/mL düzeyinde hedef bakteri belirlenebilmiştir. Bebek mamalarının *Cronobacter* spp. ile kontaminasyon düzeyinin oldukça düşük olduğu göz önüne alındığında kısa süreli bir zenginleştirme işlemi ile kombine edilerek uygulanan PCR yönteminin, bebek mamalarında *Cronobacter* spp. tespitinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenen projenin (08B4343004) bir bölümünü oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning S. 2010. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis*, 7(4): 339-347.
2. Holy O, Forsythe S. 2014. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect*, 86: 169-177.
3. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. 2005. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol*, 104: 1-34.
4. Forsythe SJ. 2005. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern Child Nutr*, 1: 44-50.
5. Dancer GI, Mah JH, Rhee MS, Hwang IG, Kang DH. 2009. Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J Appl Microbiol* 107: 1606-1614.
6. Jaradat ZW, Al Mousa W, Elbetieha A, Al Nabulsi A, Tall DT. 2014. *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J Med Microbiol*, 63: 1023-1037.
7. Craven HM, McAuley CM, Duffy LL, Fegan N. 2010. Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *J Appl Microbiol*, 109 (3): 1044-1052.
8. Gurtler JB, Beuchat LR. 2007. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J Food Protect*, 70: 1579-1586.
9. Kucerova E, Clifton SW, Xia X-Q, Long F, Porwollik S, Fulton L, Fronick C, Minx P, Kyung K, Warren W, Fulton R, Feng D, Wollam A, Shah N, Bhonagiri V, Nash WE, Hallsworth-Pepin K, Wilson RK, McClelland M, Forsythe SJ. 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS ONE*, 5(3): e9556.
10. Kandhai MC. 2010. Detection, occurrence, growth and inactivation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). PhD. Thesis. Wageningen University, 240 p., Wageningen.
11. Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Deip B, Thelen K, Stephan R. 2006. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol*, 6: 15.
12. Liu Y, Cai X, Zhang X, Gao Q, Yang X, Zheng Z, Luo M, Huang X. 2006. Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Microbiol Methods*, 65: 21-31.
13. Krascensicsova K, Trncikova T. 2008. Detection and quantification of *Enterobacter sakazakii* by real-time 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the pale gene. *Food Anal Method*, 1 (2): 85-94.

14. Zimmermann J, Schmidt H, Loessner MJ, Weiss A. 2014. Development of a rapid detection system for opportunistic pathogenic *Cronobacter* spp. in powdered milk products. *Food Microbiol*, 42: 19-25.
15. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. 2009. Development and evaluation of *rpoB*-based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol*, 136 (2): 165-168.
16. Pan Z, Cui J, Lyu G, Du X, Qin L, Guo Y, Xu B, Li W, Cui Z, Zhao C. 2014. Isolation and molecular typing of *Cronobacter* spp. in commercial powdered infant formula and follow-up formula. *Foodborne Pathog Dis*, 11 (6): 456-461.
17. Ye Y, Wu Q, Zhou Y, Dong X, Zhang J. 2008. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *E. sakazakii* in dry food samples. *J Microbiol Methods*, 75: 392-397.
18. Feer CF, Cernela N, Bolzan S, Lehner A, Stephan R. 2011. Evaluation of three commercially available real-time PCR based systems for detection of *Cronobacter* species. *Int J Food Microbiol*, 146 (2): 200-202.
19. Kuhnert P, Korczak BM, Stephan R, Joosten H, Iversen C. 2009. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA). *Int J Food Microbiol*, 136: 152-158.
20. Ye Y, Ling N, Han Y, Cao X, Wu Q. 2015. Detection of *Cronobacter* on *gluB* gene and differentiation of four *Cronobacter* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism typing. *J Food Safety*, 35 (3): 422-427.
21. Mohan Nair MJ, Venkitanarayanan KS. 2006. Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl Environ Microbiol*, 72 (4): 2539-2546.
22. Wang X, Zhu C, Xu X, Zhou G. 2012. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples. *Food Control*, 25 (1): 144-149.
23. Seo KH, Brackett RE. 2005. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Protect*, 68: 59-63.
24. Gutierrez-Rojo R, Torres-Chavollo E. 2007. A rapid polymerase chain reaction assay for *Enterobacter sakazakii* detection in infant milk formulas. *J Rapid Meth Aut Mic*, 15: 345-358.
25. Hu S, Yigang Y, Li R, Wu X, Xiao X, Wu H. 2016. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* by real-time PCR based on the *cgcA* gene and TaqMan probe with internal amplification control. *Can J Microbiol*, 62: 191-200.
26. Anon. 2006. Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*, International Standards Organization, ISO/TS 22964, 13 p.
27. Çakır İ, Çakmakçı ML. 2005. Gıdalarda patojen mikroorganizma aranmasında kullanılan moleküler yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 3 (12): 1-7.