

2016

DOKTORA

MİKROBİYOLOJİ

Melih SAYIN



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
MİK-2016-0002

**MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Melih SAYIN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

AYDIN-2016

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

MASTİTİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDE *LISTERIA*
***MONOCYTOGENES* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Melih SAYIN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu Doktora Tezi Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
VTF-15008 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Melih SAYIN tarafından hazırlanan "MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/12/2016

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ

Üye : Prof. Dr. K. Serdar DİKER

AÜ

Üye : Prof. Dr. Serkan İKİZ

İÜ

Üye : Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

ADÜ

Üye : Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, sistemli bir şekilde çalışmayı öğreten ve hayat görüşü ile beni aydınlatan, öneri ve yorumları ile hep destek olan ve doktora öğrenimime başladığımdan beri yanımda olup, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Çalışmamın çeşitli basamaklarında sabırla beni destekleyen eşime ve aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sütün Bileşimi ve Genel Özellikleri.....	4
2.1.1. Sütün Tanımı.....	5
2.1.2. Sütün Özellikleri ve Yapısı.....	6
2.1.3. Sütün Bileşimi	6
2.1.4. Sütün Yağlı Maddeleri.....	8
2.1.5. Süt Azotlu Maddeleri	8
2.1.6. Sütün Karbonhidratları.....	9
2.1.7. Sütün Vitaminleri	9
2.2. Mastitis	10
2.2.1. Mastitisin Önemi.	10
2.2.2. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis.....	11
2.2.3. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları.....	12
2.3. Listeria ve Listeriozis	12
2.3.1. Tarihçe	13
2.3.2. Listeria Türlerinin Taksonomisi.....	14
2.3.3. Etiyoloji	15
2.3.4. Epidemiyoloji	16
2.3.5. Patogenezis	16
2.3.6. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Virülans Faktörleri	17
2.3.7. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Oluşturduğu Hastalıklar.....	19
2.3.7.1. Hayvanlarda Listeriozis	19

2.3.6.3. İnsanlarda Listeriozis	20
2.3.8. Semptomlar	21
2.3.9. Teşhis	22
2.3.9.1. Klinik Teşhis	22
2.3.9.2. Nekropsi Bulguları	22
2.3.9.3. Laboratuvar Muayeneleri	22
2.3.9.3.1. Bakteriyoskopi	22
2.3.9.3.2. <i>L. monocytogenes</i> İzolasyon Metotları	23
2.3.9.3.2.1. Kültürel Olmayan İzolasyon Metotları	23
2.3.9.3.2.2. Kültürel İzolasyon Metotları	24
2.3.9.4. Hızlı Teknikler	25
2.3.9.4.1. Antijen Antikor Reaksiyonlarına Dayalı Hızlı Teknikler	25
2.3.9.5. <i>Listeria monocytogenes</i> 'i Genotiplendirme Metotları	27
2.3.9.5.1. Geleneksel Fenotipik Genotiplendirme Metotları	27
2.3.9.5.2. Moleküler Genotipik Metotlar	28
2.3.9.6. Hayvan deneyi	31
2.3.10. Tedavi	31
2.3.11. Koruma	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Örnekler	33
3.1.2. İzolasyon Besiyerleri	33
3.1.2.1. Ön zenginleştirme besiyeri	33
3.1.2.2. Asıl zenginleştirme besiyeri	34
3.1.2.3. Selektif katı besiyeri	34
3.1.3. Kullanılan Solusyonlar ve Ayıraçlar	29
3.1.3.1. Kaliforniya Mastitis Test Ayracı (Immucell®) 16 oz.	35
3.1.3.2. İndol ayıracı	35
3.1.4. PCR	35
3.1.4.1. PCR'da kullanılan solüsyonlar ve ayıraçlar	35
3.1.4.2. Primerler	37
3.1.5. Cihazlar	38
3.1.5.1. Termal Döngüleme Cihazı	38
3.1.5.2. Elektroforez Cihazı	38

3.1.6. Pozitif Kontrol	38
3.1.7.DNA Ekstraksiyon Kiti	38
3.2. Yöntem	38
3.2.1. <i>L. monocytogenes</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	38
3.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Fenotipik İdentifikasyonu	39
3.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Genotipik İdentifikasyonu	42
3.2.4. PCR	42
3.2.5. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	44
3.2.6. Jelde Yürütme	44
3.2.7. Görüntüleme ve Değerlendirme	44
4. BULGULAR	45
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	45
4.2. PCR Bulguları	46
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Listeria monocytogenes*'in izolasyon ve identifikasyon basamakları.....39



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. *L. monocytogenes* inlB spesifik gen için yapılan PCR sonuçları 47



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonların oluşum nedenleri ve oranları	5
Tablo 2. Bazı memeli türlerinin süt kompozisyonu	7
Tablo 3. <i>Listeria</i> infeksiyonlarında insanlarda görülen başlıca formlar	22
Tablo 4. PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları.....	38
Tablo 5. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları	41
Tablo 6. Mastermiks hazırlanma oranları	43
Tablo 7. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	43
Tablo 8. Süt Örneklerinin Alınan Çiftliklere Göre Dağılımları.....	45
Tablo 9. <i>L. monocytogenes</i> suşları kullanılarak yapılan bazı biyokimyasal testlerin sonuçları	46
Tablo10. PCR Çalışması Sonunda İzolasyon Yüzdesi	47

ÖZET

MASTITİSLİ SIĞIR SÜTLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

**Sayın M. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı,
Doktora Tezi, Aydın, 2016.**

Araştırmamızda Aydın ili ve yöresinde bulunan çiftliklerdeki mastitisli sığırlardan alınan süt örneklerinde *L. monocytogenes* etkeni varlığının fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırma materyalini Aydın ili ve çevresinde bulunan sığır işletmelerinde bulunan mastitis semptomu gözlenen 200 adet sığır oluşturmuştur. Sığırlardan alınan toplam 200 adet mastitisli süt örneği soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilmiştir. Süt örneklerinden fenotipik yöntemlerle *L. monocytogenes* identifikasyonları yapılmıştır. *L. monocytogenes* olarak tanımlanan izolatlar genotipik olarak PCR ile doğrulanmıştır. İncelenen 200 adet süt örneğinin 11 (% 5.5) *L. monocytogenes* izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. *L. monocytogenes* spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonrasında incelenen toplam 11 adet *L. monocytogenes* izolatının hepsi (% 100) inlB geni açısından pozitif olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak araştırmamızda mastitisli sığırlardan alınan süt örneklerinden fenotipik ve genotipik yöntemlerle % 5.5 oranında *L. monocytogenes* tanımlanmış ve Aydın ili süt sığırcılığı işletmelerinde *L. monocytogenes* varlığı ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*, süt, sığır, identifikasyon, PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* FROM CATTLE MILK WITH MASTITIS

Sayın M. Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Programme, PhD Thesis, Aydın, 2016.

In our research, it was aimed to investigate the *L. monocytogenes* from milk samples taken from cattle with mastitis in Aydın province and its provinces by phenotypic and genotypic methods.

The research material consisted of 200 cattle that had symptoms of mastitis in cattle farms in and around Aydın province. A total of 200 milk samples with mastitis taken from cattle were brought to the laboratories of Microbiology Department of Adnan Menderes University Veterinary Faculty under cold chain. Identification of *L. monocytogenes* was carried out by phenotypic methods from milk samples. The isolates identified as *L. monocytogenes* were genotypically confirmed by PCR. The isolation and identification of 11 (5.5%) *L. monocytogenes* in 200 milk samples were identified. A total of 11 isolates of *L. monocytogenes* (100%) confirmed by PCR using *L. monocytogenes* specific primers and were identified as positive for the *inlB* gene.

As a result, 5.5 % of *L. monocytogenes* were identified by phenotypic and genotypic methods in milk samples taken from cattle with mastitis in our research and *L. monocytogenes* was brought out in Aydın dairy milk cattle farms.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, milk, cattle, identification, PCR

1. GİRİŞ

Hayati fonksiyonlardan biri olan beslenme, insan var olduğu sürece devam edecektir. Bu amaç için ihtiyaç duyulan besin maddeleri ya bitkisel kaynaklardan ya da hayvansal kaynaklardan temin edinilmek zorundadır. Bunların içinde hayvansal kaynaklı olan gıda maddeleri biyolojik değerlerinden dolayı daha fazla öneme sahiptir (Coşkun 1995).

Dünya nüfusunun her geçen gün hızla artması, sınırlı olan besin kaynaklarının daha verimli kullanılmasını zorunlu kılmıştır. Dünyada insanların doyurulması değil, aynı zamanda dengeli bir şekilde beslenmesinin de önemli olduğu anlaşılmıştır. Dengeli bir beslenme sağlanabilmesi için protein yönünden zengin hayvansal gıdaların tüketiminin artırılması gerekmektedir (Küçüköner ve Tarakçı 1998).

İyi bir besin maddesi, bünyesinde bulundurduğu protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineral gibi maddelerin varlığı, miktarı, yararlılık derecesi ve kolay bulunabilmesiyle kıymet ifade etmektedir. Süt bu özelliklerin tümünü içeren bir gıdadır (Coşkun ve ark 1990). Ayrıca bileşimindeki çok değerli ve komple besin maddeleri nedeniyle mikroorganizmaların gelişimi için de uygun bir ortam oluşturmaktadır. Bu nedenle çabuk bozulabilen ve kolaylıkla değerini kaybedebilen bir niteliktedir (Güven 1993).

Normalde sağlıklı bir süt hayvanının sütü sağım anında steril olmasına karşın, hijyenik olmayan sağım koşullarına bağlı olarak süt, bakteriler ile kontamine olur. Sağlıklı olmayan süt hayvanları, mastitis ve subklinik mastitis gibi lokal enfeksiyon etkenlerinin yanı sıra, sistemik enfeksiyon etkenlerinden olan *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium bovis* ve *Brucella* spp. gibi patojen mikroorganizmaları süte bulaştırabilirler (Erol 2007).

Süt ve süt ürünleri ile ilişkili hastalıkların % 90'ından çoğu bakteriyel kökenlidir. Tifo ve kızıl hastalıkları etkeni olan *Salmonella Typhi* ve *Streptococcus pyogenes* adlı patojenler, bu bakterilerin taşıyıcısı olan insanlar tarafından çiğ süte bulaştırıldığından, 1940 yılından önce, tifo ve kızıl süttten kaynaklandığı en sık rapor edilen hastalıklar olmuştur. İkinci Dünya Savaşından bu yana Brusellozis, Salmonellozis ve Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmeleri halk sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerdendir. Listeriozis ise günümüzde insanlar için çiğ sütte bulunan *Listeria monocytogenes* adlı patojen bakteri tarafından oluşturulan ve ölümcül olabilen bir hastalıktır (McSweeney ve Fox 2008). *Listeria monocytogenes* halk sağlığını ilgilendiren en önemli patojenlerden biridir. Bu patojen özellikle immun sistemi zayıf insanlar arasında gıda kaynaklı bulaşmalarla seyir göstermektedir (Schlech 2000; Liu

2008). *Listeria monocytogenes*, et ve et ürünleri, balık ve balık ürünleri, süt ve süt ürünleri gibi bir çok çeşitli yiyecek aracılığıyla bulaşabilmektedir (Adzitey ve Huda 2010).

Listeriozis, insanda nadiren görülür ve en büyük sorun hastalığın rotasının bilinmemesidir (Gahan ve Collins 1991). Fakat, salgınlar ve yapılan çalışmalardaki kanıtlar ayaküstü tüketilen ürünlerde *Listeria spp.*'nin varlığını göstermektedir. Süt ve süt ürünleri *Listeria monocytogenes* kontaminasyonu ile ilgili olan ilk gıdalardır ve bu enfeksiyon için en fazla rapor edilendir (Rocourt 1994). *L. monocytogenes*, çiğ süt örneklerinde % 2-5 civarında bulunmuştur, bunlar çevresel kaynaklardan kontamine olabilir, inek dışkılarında, toprak ve samanda bulunabilir (Bickley ve ark 1996).

İnfeksiyöz hastalıkların teşhisi amacıyla genellikle direkt ve indirekt yöntemlerden yararlanılmaktadır. Hastalık etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonlarını amaçlayan klasik direkt yöntemler ya da konvansiyonel teşhis yöntemleri; klinik bulgulara, otopsi bulgularına, etken izolasyonu ve identifikasyonuna, antijenik materyallerin saptanmasına ve serolojik yöntemlere dayanmaktadır. Bu yöntemler bazen başarılı sonuçlar vermez ya da latent ve gizli enfeksiyonlarda izolasyon bakımından bazı olumsuzluklara yol açarlar. Ayrıca, bazı bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda, spesifik etkeni izole ve identifiye etmek her zaman mümkün olmamaktadır ve bazı durumlarda etkenin identifikasyonu uzun sürmektedir. Ayrıca, mikroorganizmaların fagositik hücreler tarafından endositozisi veya hastalık etkenlerinin intraselüler bir karakter taşıması da konvansiyonel tekniklerle hastalık etkenlerinin izolasyonunu güçleştirmektedir. *Listeria monocytogenes*'in gıdalarda tanısında, sıfır tolerans politikası geçerli olup sayım yerine 25 g örnekte var/yok esasına dayanan ISO 11290 yöntemi kullanılmaktadır ve gold standart yöntem olarak güncelliğini korumaktadır (EFSA 2010).

Ancak bakteriyolojik testlere dayanan teşhis yöntemlerinin yanı sıra mikroorganizmaya ait genetik materyallerin (DNA ya da RNA) veya proteinlerin saptanmasını amaçlayan, spesifitesi ve sensitivitesi oldukça yüksek olan daha çabuk, kesin ve güvenilir sonuçlar veren biyoteknolojik teşhis yöntemlerinin kullanılmaları giderek yaygınlık kazanmıştır (Saiki ve ark 1988, Bilgehan 1993).

Genetik, biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve biyokimya alanlarında, genetik materyal üzerine yapılan araştırmaların ön çalışması olarak DNA izolasyonu, büyük öneme sahip bir aşamadır. DNA yapısının analizi, DNA hibridizasyonu, DNA sıra analizi, PCR 'a (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) dayanan metotlarla, polimorfizm çalışmaları ve gen klonlanması gibi genetik araştırmalarda öncelikle büyük moleküler ağırlıktaki, saflaştırılmış genomik DNA'nın elde edilmesi gerekmektedir (Özdil ve Başpınar 2004).

Çeşitli kaynaklardan DNA izolasyonu yapılabilmekte özellikle havyan materyallerinde yaygın olarak kan hücreleri kullanılmaktadır (Jeanpierre 1987, Ciulla ve ark 1988, Johns ve Paulus-Thomas 1989, Montgomery ve Sise 1990, Mullenbach ve ark 1989). Bunun dışında süt, sperm, kıl, kemik, deri vb. hücrelerden de DNA elde etmek mümkündür (Brown 1991).

Sütte yüksek ancak değişken sayıda (keçi sütünde yaklaşık 10^6 - 10^7 /ml; inek sütünde 10^4 - 10^7 /ml) somatik hücre bulunmaktadır. Bu sayı sütün elde edildiği hayvanın durumuna bağlı olarak (mevsim, laktasyon dönemi, hastalık vb.) farklılık göstermektedir. Sütteki somatik hücreler; nötrofiller, makrofajlar, lenfositler gibi lökositlerden ve daha az oranda da (< %2) epitel hücrelerinden oluşmaktadır (Kehrli ve Shuster 1994). Bu hücrelerin kullanımı ile süttten genomik DNA örneklerinin elde edilmesi mümkün olmaktadır (Lipkin ve ark 1993, De ve ark 2000).

Listeria türlerinin teşhis yöntemleri gelişmesine rağmen, bunlar yoğun çalışma gerektiren araştırma yöntemleridir. *L. monocytogenes*'in PCR ile aranması uzun zenginleştirme prosedürlerini içerse de PCR kullanımı veya diğer DNA'ya dayalı yöntemler prosesin hızlanmasındaki önemli yollardır (Golsteyn ve ark 1991, Rossen ve ark 1991, Niederhauser ve ark 1992). Ön zenginleştirme yapılmaksızın gıdalardan direk PCR yapılmasında sadece birkaç çalışma problem bildirmiştir (Bessesen ve ark 1990, Furrer ve ark 1991, Starbuck ve ark 1992). Şüphesiz PCR, gıdalardan bakteriyel patojenlerin başarılı bir şekilde aranmasında gerekli, oldukça hassas ve spesifik bir tekniktir. (Bickley ve ark 1996).

Araştırmamızda Aydın ili ve yöresinde bulunan çiftliklerdeki mastitisli sığırlardan alınan süt örneklerinde *L. monocytogenes* etkeni varlığının fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sütün Bileşimi ve Genel Özellikleri

Her yaş grubundaki insanların yeterli ve dengeli beslenebilmeleri için, yüksek proteinkalitesine sahip hayvansal gıdaları tüketmeleri gerekmektedir. Oysa ülkemizde kişi başına düşen günlük protein ihtiyacının ancak % 25'i hayvansal ürünlerden sağlanabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran oldukça yüksektir. Örneğin Amerika Birleşik Devletlerindeki kişi başına düşen günlük protein miktarının hayvansal ürünlerden sağlanan kısmı % 68, Fransa'da % 65, İsrail'de % 54 tür (Coşkun 1995, Ünal ve Besler 2008).

Tayar ve Şen (2007)'e göre süt organizmanın gelişebilmesi ve yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli olan besin unsurlarının hemen hemen hepsini içerdiğinden uzun yıllardır, insanlar için önemli bir besin maddesi olma özelliğini korumaktadır. Bileşimleri açısından ideal bir besin maddesi olarak kabul edilen süt proteinleri, yaşam için önemli olan eksojen amino asitlerin tümünü içerdiğinden yüksek biyolojik değere sahiptirler.

Dünyada kişi başına yılda 97.1 kg süt düşmektedir. Kişi başına yıllık inek sütü üretimi ise Yeni Zelanda'da 2255.0 kg, Danimarka'da 921.7 kg, Hollanda'da 758.0 kg, İsviçre'de 597.7 kg ve ABD'inde 263.6 kg iken Pakistan'da 26.5 kg, Irak'da 16.3 kg, Afganistan'da 21.3 kg, Bangladeş'de 6.5 kg ve Hindistan'da 0.02 kg kadardır. Türkiye'de ise 1993 yılında kişi başına düşen süt miktarı 154.8 kg dır (Başpınar ve Batmaz 2006).

İçme sütü olarak ya da işlenmiş süt ürünleri halinde tüketimi, insanların her yaşta temel besin ihtiyaçlarına cevap vermektedir. Bunun nedeni temel besin unsurlarını diğer besin maddelerinden daha fazla ve yeterli içermesinden ileri gelmektedir. Süt özellikle, kalsiyum, fosfor, riboflavin, Vitamin B12 ve yüksek kaliteli protein kaynağı olarak tanımlanmaktadır.

Tüm bu olumlu faktörlerin yanında süt, hayvan hastalıklarından ve bazı çevresel bulaşma faktörlerinden etkilenip bazı olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Bu olumsuzluklar bazı durumlarda insan sağlığını etkilerken bazı durumlarda da ürün kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Sağım anından itibaren sütün hijyenik kalitesi ve besin değeri bozulma riski ile karşı karşıyadır (Tablo 1). Bu nedenle sağımdan tüketime sunulana kadar hijyenik kurallara dikkat edilmeli, modern teknoloji ve işletme metotları dikkatli ve titiz bir şekilde uygulanmalıdır.

Tablo 1. Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların oluşum nedenleri ve oranları (Erol 2007)

Neden	Oran (%)
Üretim hatası	23.5
Hatalı veya çok uzun süre muhafaza	23.5
Hijyen eksikliği	19.7
İnfekte hayvanlar tarafından kontaminasyon	19.7
Piştirme-ısıtma hatası	6.2
Hatalı çiğ materyal	4.9
Paketleme ve nakil hatası	0.5

2.1.1. Sütün Tanımı

Tayar ve Şen (2007) kitaplarında sütü, “genelde tüm memeli hayvanların doğum yapmalarından hemen sonra yavrularını besleyebilmek için oluşan ve meme bezlerinden salgılanan biyolojik bir sıvı” olarak tanımlasa da, insan gıdası olarak kullanılma amacı ile aşağıdaki şekillerde tarif edilebilir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı sütü; bir veya daha fazla sayıda özel bir şekilde beslenen ve bakıma alınan sağlıklı ineklerin, buzağılamalarından 15 gün önce ve 5 gün sonra sağılmaları sonucunda elde edilen tamamen temiz, taze meme salgısı olarak tanımlamıştır. Birleşmiş Milletler Halk Sağlığı Teşkilatı sütü, bir veya daha fazla sayıdaki sağlıklı ineklerin tam olarak sağılmaları sonucu elde edilen, kolostrumdan yoksun, % 8.25 den daha az yağsız kuru madde ve % 3.25 den daha az süt yağı vermeyen taze meme sekresyonu olarak tanımlamıştır. Türk Standartları (TS) ise 1018 çiğ süt standardına göre: Süt, inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine özgü tat, koku ve kıvamda olan, içine başka maddeler karıştırılmamış ve içinden herhangi bir maddesi alınmamış beyaz renkli bir sıvı olarak tanımlanmıştır (Besler ve Ünal 2006).

Türk Gıda Kodeksine göre: çiğ süt; bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, 0 °C'nin üzerinde ısıtılmamış veya eşdeğer etkiye sahip herhangi işlem görmemiş kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır (Anonim 2).

Genel özelliklerine bakılırsa, süt, beyaz, opak (saydam olmayan) kendine has bir lezzette, bazen sağıldığı hayvanın yediği yeme göre değişik kokuda, 6,3-6,5 pH'lı mevcut gıdaların içinde en mükemmel besleyici değere sahip bir sıvıdır. Süt denildiğinde sadece inek sütü anlaşılır. Diğer hayvan sütleri sağıldığı hayvanın türü ile adlandırılmaktadır (koyun sütü, keçi sütü, manda sütü v.b.) fakat doğumdan 15 gün önce ve 7 gün sonraya kadar sağılan ticari sütlerin bir önemi yoktur. Kolostrum (ağız sütü) olarak adlandırılan bu sütler yavruların beslenmesinde büyük önem taşır (Tayar ve Şen 2007).

2.1.2. Sütün Özellikleri ve Yapısı

Tayar ve Şen (2007)'e göre, süt çeşitli tuzlar ve süt şekerinden oluşan kristaleoitlerin bir eriyiğidir. Bu eriyik içinde kazein ve albümin koloidal halde, yağ ise emülsiyon halinde bulunmaktadır. Sütteki su ve diğer maddelerin miktarları aynı olmakla birlikte protein ve yağ miktarları bakım ve beslenmeye, yaşa ve hayvanların türüne göre değişiklikler göstermektedir.

Damıtık su normal koşullarda 0 °C'de donmaktadır. Süt, bileşiminde gerçek çözelti halinde bulunan laktoz ve minerallerden dolayı, damıtık suya kıyasla daha düşük derecede, yaklaşık -0.55 °C'de donmaktadır. Sütün donma noktasına temel olarak laktoz ve minerallerin % 75 oranında etkisi varken, protein ve yağın donma noktası üzerine etkisi önemsiz miktardadır (Anonim 1).

Kendi haline bırakılan çiğ sütün üzerinde bir süre sonra bir kaymak tabakası oluşur. Bu süt yağından ibarettir. Kaymak tabakası alınıp, kalan kısma peynir mayası katıldığında pıhtılaşan kısım ise sütün azotlu kısmında bulunan kazeindir. Oluşan peynir pıhtısı süzülüp akan yeşilimsi sıvı biraz tuz ve sirke ile kaynatılırsa düğümçük şeklinde parçacıklardan oluşan lor elde edilir. Bu da sütün azotlu kısmıdır ve albümin olarak adlandırılır. Nihayet lor çıkarılmış peynir suyu koyu bir şurup halini alana dek kaynatılır ve soğumaya bırakılırsa cam gibi billurcuklar elde edilir ki bu da süt şekeri laktozdur (Tayar ve Şen 2007).

2.1.3. Sütün Bileşimi

Fox ve McSweeney (1998) tarafından sütün kompozisyonu Tablo 2'deki gibi yayınlanmıştır;

Tablo 2. Bazı memeli türlerinin süt kompozisyonu (%) (Fox ve McSweeney 1998)

Tür	Toplam Kuru madde	Yağ	Protein	Laktoz	Kül
İnsan	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
İnek	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Bufalo	16,8	7,4	3,8	4,8	0,8
Keçi	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Koyun	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
Domuz	18,8	6,8	4,8	5,5	
At	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Eşek	11,7	1,4	2,0	7,4	0,5
Geyik	33,1	16,9	11,5	2,8	
Tavşan	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8
Hint Fili	31,9	11,6	4,9	4,7	0,7
Kutup Ayısı	47,6	33,1	0,9	0,3	1,4
Gri Ayı Balığı	67,7	53,1	11,2	0,7	

Tayar ve Şen (2007)'in kitaplarında belirttiğine göre ise, 1 L sütün ağırlığı 1028-1039 arasında değişmektedir. Bunun yaklaşık 905 gramı su, 129 gramı kuru maddedir. Kuru maddenin ise 35 gramı yağ, 94 gramı yağsız kuru maddeden oluşmuştur. Sütteki su miktarının fazla olması taşıma ve muhafazasını zorlaştırırken, suyun %96 gibi büyük bir bölümünün serbest su halinde bulunması bakteri üremesi için uygun ortam oluşturmaktadır. 1 L sütün bileşiminde ortalama, 36 g protein, 35 g yağ, 47 g laktoz, 650 kalori, 1500 Vitamin A, 1,2 g kalsiyum bulunmaktadır.

2.1.4. Sütün Yağlı Maddeleri

Sütte bulunan lipidler basit ve birleşik lipidler olmak üzere iki grup altında incelenir. Basitlipidler (Gliserid ve steridler), 1 lt sütte 35-45 gr bulunur. Yağ asitlerinin gliserin ile yaptığı esterlere gliseridler, sterol ile yaptığı esterlere de steridler denilmektedir. Sütün total basit lipidlerinin büyük bir kısmını gliseridler oluşturmaktadırlar. Steridler sütte 0,10-0,17 gr/lt miktarında bulunurlar. Birleşik lipidler (lesitin ve sefalinler) ise, 1 lt sütte 0,3-0,5gr bulunur. Birleşik lipidler C,H ve O ile birlikte belli miktarlarda fosfor ve kükürt içerirler. Sütte bunlardan yalnızca azotlu ve fosforlu lipidlerden oluşan fosfoamino lipidler bulunur (Ünal ve Besler 2008).

2.1.5. Sütün Azotlu Maddeleri

Tayar ve Şen (2007)'in kitaplarında bildirdiğine göre, 1 litre sütte bulunan azotlu maddeler ve miktarları aşağıdaki gibidir.

Sütün Total Azotlu Maddeleri.....	33-36 gr.
1. Proteinler.....	31-34 gr.
a) Kazein.....	26-29 gr.
b) Betalaktoglobulin.....	2.5-4 gr.
c) Alfalaktalbümin.....	0.8-1.5 gr.
d) İmmünglobulinler.....	0.5-0.8 gr.
e) Proteos-Pepton.....	0.8-1.5 gr.
f) Minor Proteinler.....	eseri
2. Protein tabiatında olmayanlar.....	0.8-1.4 gr.
a) Protidler.....	0.2-0.3 gr.
b) Protid olmayan azotlu maddeler.....	0.6-0.9 gr.

Proteinler birçok aminoasit molekülünün bir araya gelmesi ile oluşmuşlardır.

Sütün erimiş azotlu maddeleri ve miktarları aşağıdaki gibidir.

1. Globülinler (İmmünglobülinler)

a) Euglobülin.....	0.3-0.5 gr/lt.
--------------------	----------------

b) Pseudoglobülin.....	0.2-0.3 gr/Lt.
2. Albüminler	
a) Alfa Laktalbumin.....	0.8-1.5 gr/Lt.
b) Beta Laktoglobülin.....	2.5-4 gr/Lt.
3. Proteos-Pepton.....	0.8-1.5 gr/Lt.
4. Protein olmayan azotlu maddeler	
a) Polipeptidler.....	0.8-1.8 gr/Lt.
b) Üre.....	0.2-0.3 gr/Lt.
c) Diğer organik maddeler.....	0.3-0.5 gr/Lt.
d) Amonyak.....	0.3-1.0 gr/Lt.
e) Kreatin.....	0.03-0.05 gr/Lt.

Total azotlu maddelerin yaklaşık % 20-24'ünü sütün erimiş azotlu maddeleri oluşturur. Bunların % 18-20 sini de protein tabiatında olanlar oluşturmaktadır. Sütün erimiş azotlu maddelerinin, protein fraksiyonunun esasını laktalbumin ve laktoglobulin oluşturmaktadır.

2.1.6. Süt Karbonhidratları

Süt karbonhidratlarının en büyük kısmını laktoz oluşturur. Sütte laktozdan başka eseri miktarlarda glukoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler bulunmaktadır. Beslenme fizyolojisi açısından süt şekerinin önemli fonksiyonları vardır. Galaktoz özellikle bebeklerin barsaklarında beta galaktosidazın etkisi ile glukoz ve laktozla birlikte oluşur. Sütle alınan laktoz kalın barsağa ulaştığında fermentasyon sonucu laktik asit meydana gelir. Oluşan asit reaksiyonu kalsiyumun rezorpsiyonu ve vitamin sentezi üzerine olumlu etkiler yapar. Laktoz vücutta yavaş parçalandığından ve barsağın çalışmasını olumlu yönde etkilediğinden, kan şeker seviyesi çok hızlı yükselmez ve böylece de çok fazla kalori depolanmaz. Bunların dışında sütte yine eseri miktarda arabinoz bulunduğu da tespit edilmiştir (Tayar ve Şen 2007)

2.1.7. Süt Vitaminleri

Protein tabiatında olmayan süt vitaminleri çok küçük molekül ağırlıklarına sahiptirler ve sütte genelde çok az miktarda bulunurlar. Sütte bulunan vitamin miktarları hayvanın yediği yeme ve bakım şartlarına göre değişiklikler gösterir. Örneğin yeşil otlarla beslenen (mera besisine tutulan) süt hayvanlarında, süt vitamin oranı, kuru yemle beslenenlere göre daha

yüksektir. Süt vitaminleri iki gurup altında incelenmektedir. Bunlar yağda eriyen vitaminler (A, D, E, K) ve suda eriyen vitaminlerdir. (B1, B2, PP, B5, B6, B9, C, H) (Tayar ve Şen 2007; Ünal ve Besler 2006).

2.2.Mastitis

Mastitis, meme dokusundaki patolojik değişiklikler ve sütteki somatik hücre sayısının artışı ile karakterize, meme bezlerinde oluşan yangısal değişiklikler olarak tanımlanır. İnsan ve hayvan sağlığı, beslenmesi ve ulusal ekonomide çok önemli olan süt ve süt ürünleri, ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebilir. Meme bezinin yangısal durumuna bağlı olarak oluşan patolojik değişikliklerin sonucunda sütte bir takım fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelir. Meydana gelen bu değişimler süt ve süt ürünlerinin kullanılabilirliğini sınırlar ve bu nedenle mastitis, üzerinde dikkatle durulması gereken önemli bir problemdir (Khan ve ark 2003).

2.2.1. Mastitisin Önemi

İşletme düzeyinde etkin kontrol programlarının uygulanması ile mastitis nedenli kayıpların azaltılması mümkün olabilmektedir. Mastitis kontrol programlarının uygulanması ve bu programların devamlılığının sağlanması, özellikle kapasiteleri büyük olan süt işletmelerinde, ekonomik verimliliğin en önemli göstergesidir. Ancak ülkemizde özellikle süt yönlü yetiştiricilikte işletme kapasitelerinin küçük olması ve henüz verimlilik merkezli mastitis kontrol programlarının oluşturulamaması nedeniyle, süt üretiminde büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı süt, sağlıklı hayvanlardan elde edildiği için, hayvan sağlığını korumak ve mastitis olgularını erken teşhis etmek temel hedeftir. Süt endüstrisinde mastitis nedenli ekonomik kayıplar, süt kalitesinin ve süt veriminin azalması, buna bağlı olarak da ilaç ve veteriner hizmet kullanımının artması ve yem giderlerinin artışı sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda, enfeksiyonun tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sütte kalıntı bırakması, bilinçsiz olarak ilaç kullanımına bağlı gelişen antibiyotik dirençli bakteriler, tedavi olanaklarının sınırlanması gibi olumsuz etkiler oluşmaktadır. Düzenli ve bilinçli kontrol programlarının uygulanması, klinik mastitis olgularının azaltılmasını ve subklinik enfeksiyonların da erken teşhis edilmesini sağlamaktadır (Blowey ve Edmondson 1995).

2.2.2. Bulaşıcı ve Çevresel Mastitis

Mastitise neden olan etkenler arasında bakteriler önemli bir yere sahiptir (Phuektes ve ark 2001a). Memelerdeki anatomik bozukluklar ve travmalar da enfeksiyonun yerleşimini ve oluşumunu hızlandırmaktadır. Anatomik bozukluklara bağlı mastitis olgularında; memelerin doğmasal olarak bozuk anatomik yapısı, hayvanın yaşı, ırkı gibi etkiler, süt veriminin fazla olması, laktasyonun dönemi (aktif involusyon, peripartum periyot, erken laktasyon vb.), beslenme durumları (Se ve Vit. E eksiklikleri), süt ineklerini enfeksiyona duyarlı kılmaktadır (Blowey ve Edmondson 1995).

Çevresel faktörler arasında, uygun olmayan çevre koşulları, ahır ve barınakların sağlık yönünden uygun olmaması, yetersiz havalandırma koşulları, altlıkların sert ve kirli olması sayılabilir. Süt verimini arttırmak amacıyla protein yönünden zengin besleme mastitise yakalanma olasılığını arttırmaktadır. Sağımçıların temizlik ve dezenfeksiyona dikkat etmemeleri de hayvanlar arasında enfeksiyonun yayılmasını hızlandırmaktadır. Mikrobiyel nedenlere bakıldığında; pek çok bakteri, mantar ve viral etken mastitisin oluşumuna neden olmaktadır. Mastitis etkenleri, meme ve meme kanalıyla ilişkileri yanında, özellikleri de dikkate alınarak bulaşıcı ve çevresel patojenler olarak ayrılmıştır. Mikrobiyel patojenler, sığır meme bezine yerleşerek çoğalır ve hayvandan hayvana sağım sırasında bulaşır. Çevresel patojen olan *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Escherichia coli* çevresel mastitis enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bulaşıcı patojenler olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasmatürleri* ve *Corynebacterium bovis* bulunmaktadır. Ayrıca tüberküloz etkenleri, *Proteus*, *Leptospira*, *Listeria* ve *Brucella* türleri de mastitise neden olmaktadır. Çevresel patojenlerin enfeksiyon oluşturması hayvanlar arasında sağım esnasında ya da sağım aralarında çevre teması ile meydana gelir (Oliver ve ark 2005).

Çoğunlukla kuru dönemde, laktasyonun erken evresinde ve hayvan sıklığının arttığı durumlarda, serbest hayvancılıktan ziyade ahır işletmelerinde, çevresel patojenlerin oluşturduğu enfeksiyonlara daha sık rastlanır. Bakım ve beslemenin iyi yapıldığı durumlarda, koliform mastitisleri nadiren ortaya çıkar ve oranı % 1-2'de kalırken, streptokokkal nedenli mastitis oranı % 5'den daha az seyreder, ancak sürüde mevcut herhangi bir problemde bu oran % 10'u aşar. Çevresel streptokokların oluşturduğu mastitis enfeksiyonlarının % 49-50'sinde klinik semptomlar kendini gösterir. Klinik mastitislerin sonucuna bağlı olarak da süt üretiminde, reproduktif aktivitede azalma ve işletme giderlerinin artışı ile ekonomik kayıp şekillenir. Bulaşıcı mastitis enfeksiyonları ise, bir meme bezinin enfeksiyon kaynağı olması ve bu infekte meme bezine sahip hayvandan, sağlıklı başka bir hayvana etkenin taşınması ile

gerçekleşir. Meme başı lezyonları, yetersiz bakım koşulları etkenlerin yerleşimini kolaylaştırır. Bulaşıcı mastitis olguları sıklıkla akut, kronik veya subklinik formlarda görülebilir. Mikroorganizmanın geçişi sağımçıların elleri, sağım makineleri gibi sağım esnasında yayılma gösterir. Bu şekilde infekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara mikroorganizmaların geçişi gerçekleşir (Blowey ve Edmondson 1995).

2.2.3. İnfeksiyonun Klinik ve Subklinik Formları

İnfeksiyonun klinik formlarına bakıldığında; mikroorganizma meme bezini enfekte ettikten sonra buraya yerleşerek hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar ve bunu konak-patojenilişmesine bağlı olarak çeşitli klinik bulgular takip eder. Konak immun cevabının başarısız, antibiyotik tedavisinin yetersiz olduğu durumda etken meme bezine kolonize olur ve mastitis şekillenir. Sonuç olarak da yangının klinik bulguları olan şişkinlik, renk değişimi, ısı artışı ve ağrı gelişir. Klinik semptomlar perakut, akut, subakut ve kronik formlar halinde karakterize edilir. Klinik mastitis durumlarında sütteki değişimler (pıhtı, renk değişimi, kan görülmesi vb.) açığa çıkar. Ateş, anormal sekresyon, iştah kaybı, süt üretiminin azalması akut mastitis durumlarında görülen ilave klinik bulgulardır. Klinik mastitis bulgularının tersine subklinik enfeksiyonlarda meme bezi ve sütteki değişimlere nadiren rastlanır ya da hiç rastlanmaz. Semptom göstermeyen hayvanlar sağlıklı kabul edilir, bu nedenle subklinik infekte hayvanların teşhisi zordur. Klinik belirti göstermeyen infekte hayvanlar diğer sağlıklı hayvanlar için bir rezervuar görevi görür ve sağlıklı hayvanlar arasında enfeksiyonun yayılımına neden olurlar. Mastitis etiyolojisinde çevresel patojen olan *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Escherichia coli* rol oynamaktadır. Ayrıca bulaşıcı patojenler olarak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* türleri ve *Corynebacterium bovis* de mastitislerde yer almaktadır. Bununla beraber tüberküloz etkenleri, *Proteus*, *Leptospira*, *Listeria* ve *Brucella* türleri de mastitislerde görülmektedir (Blowey ve Edmondson 1995).

2.3. Listeria ve Listeriozis

Listeriozis oluşturan bakteriler insan ve birçok hayvan türleri için patojen mikroorganizmalardır. Doğada geniş bir alana yayılmışlardır; toprakta, bitkilerde, sebzelede,

hayvan yemlerinde, su ve lağım atıklarında, gübrelerde, günlük yaşantımızda besin olarak kullandığımız süt ve süt ürünlerinde, çiğ veya dondurulmuş besinlerde et ve deniz ürünlerinde, otlarda, sağlam insan ve hayvanların atık yavrularında, vajinal akıntılarında, fetal membranlarda, süt, idrar, gaitalarında ve diğer kontamine materyallerde fazlaca bulunurlar (Breer ve Schopfer 1988, Uysal ve Anđ 2003).

Listeria türleri Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de "Düzgün, spor oluşturmeyen, Gram pozitif çomaklar" seksiyonunda bulunmaktadır. Bu grup içinde 7 cins (Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix, Brochothrix, Renibacterium, Kurthia, Caryophanon cinsleri) yer almaktadır. Listeria'lerden *L. monocytogenes*, zoonotik özelliğe sahip bir bakteridir (Holt ve ark 1994).

İnfekte insan ve çeşitli hayvanların (evcil ve yabani, memeli ve kanatlı) sekret, ekskret ve dokularında mikroorganizmayı izole ve tanımlamak mümkündür (Baykal 2008).

Listeriozis, dünyanın birçok ülkesinde insan ve hayvanlarda sporadik ve endemik olarak görülmektedir. Septisemi, meningoensefalit ve abortusa neden olması, ayrıca hayvanlarda ekonomik kayıplara da yol açması hastalığın önemini artırmaktadır (Pinner ve ark 1992, Oliver ve ark 2005, Uysal ve Anđ 2003).

2.3.1. Tarihçe

Arda ve ark (2005) tarafından belirtildiğine göre, Hülphers (1911) İsveç'te tavşanlardaki karaciğer nekrozlarından ürettiği mikroorganizmayı *Bacterium hepatitis* olarak adlandırmıştır. Von Aktinson (1917) Avustralya'da ve Von Dumont Contoni (1919), Paris'de insanlardaki meningitidis olgularından benzer özellikler gösteren bakteriyi izole ettiklerini açıklamışlardır. Murray, Webb ve Swann (1926), tavşanlarda mononükleer lökositosis'e yol açan generalize bir seyir izleyen bir hastalığı tanımlamışlar ve infekte hayvanlardan izole ettikleri Gram pozitif ve spor oluşturmeyen mikroorganizmaya da *Bacterium monocytogenes* adını vermişlerdir. Gill (1931) Yeni Zelanda'da koyunlar arasında dönme hastalığının bulunduğunu bildirerek, infekte hayvanlardan ayırdığı etkeni *Listeria ovis* olarak adlandırmıştır. Ten Broech (1932) New Jersey'de tavuklardan, Jones ve Little (1934) aynı eyalette sığırlardan, Burn (1934) Connecticut'da insanlardan, Biester ve Schwarte (1939), Iowa'da domuzlardan ve Grini (1943) Norveç'te atlardan *L. monocytogenes* izole ve tanımlamışlardır. Türkiye'de de enfeksiyonun varlığı yapılan birçok araştırma ile ortaya konulmuştur. Özcebe ve Doğuer (1945), Özgen (1952), İyigören (1952,

1954), Bögrün (1959), Yılmaz (1960), Doğuer (1961), Yücel (1963) ve Finci (1968) listeriozis üzerinde hastalığın çeşitli yönlerini aydınlatan değerli çalışmalar yapmışlardır. Listeriozis'e yurdumuzda, zaman zaman sporadik olgular halinde (abortus, meningoensefalitis) rastlandığı açıklanmıştır (Arda ve ark 2005).

2.3.2. Listeria Türlerinin Taksonomisi

Listeria türleri Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de spor oluşturmayan, Gram pozitif, düzgün çubuk bakteriler grubunda yer almaktadır. Bu grup içinde yedi cins (Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix, Brochothrix, Renibacterium, Kurthia, Caryophanon) bulunmaktadır. Bu grubun başlıca özellikleri arasında düşük guanin/sitozin oranı, mikolik asit yokluğu ve lipoteikoik asit varlığı sayılabilir. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin dokuzuncu sayısında yapılan taksonomide, Listeriaceae familyasında *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* ve *L. murrayi* olmak üzere yedi tür bulunduğu belirtilmektedir (Holt ve ark 1994). Moleküler biyolojik ve filogenetik analizler sonucu, *L. murrayi*'nin *L. grayi* ile özdeş ve Listeria soyu içerisinde altı türün olduğu saptanmıştır. Bu türler; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ve *L. grayi*'dir. *L. grayi* ve *L. ivanovii*'nin her ikisi de ikişer alt tür içermektedir (Holt ve ark 1994, Hitckins 2003). Listeria soyunda sadece *L. monocytogenes* insan listeriozisi ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte; *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* de seyrek olarak saptanmıştır. Somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerin faktör antiserumları ile yapılan serotiplendirmede 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 olmak üzere *L. monocytogenes*'in 13 serotipi olduğu saptanmıştır. Özellikle 4b, daha az olarak da 1/2a ve 1/2b serotipleri insan listeriozisine neden olan dominant serotipler olarak önem kazanmıştır (Hitckins 2003, Koçan ve Halkman 2006, Erol 2007). DNA/DNA hibridizasyon çalışmalarıyla, genetik yakınlıkları ve evrimsel özellikleri dikkate alınarak, *L. monocytogenes* serotipleri üç soy grubuna ayrılmıştır. Buna göre 1/2a, 1/2c, 3a ve 3c serotipleri Grup I'de, 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e ve 7 serotipleri Grup II'de, 4a ve 4c serotipleri Grup III'de yer almaktadır. Bunun yanı sıra her bir soy grubu kendi içinde iki gruba ayrılmıştır. Grup Ia 1/2a ve 3a, Grup Ib 1/2c ve 3c, Grup IIa 4b, 4d, ve 4e, Grup IIb 1/2b, 3b ve 7, Grup IIIa 4a, Grup IIIb 4c serotiplerinden oluşmuştur (Rocourt ve Buchrieser 2007).

2.3.3. Etiyoloji

Listerialar Gram pozitif, hareketli, sporsuz, kapsülsüz, küçük, düz veya hafif bükülmüş çomakçık veya kokoid tarzında mikroorganizmalardır. Kültürlerde tek tek, çift, V, Y şeklinde veya kısa zincirler halinde görülürler. Genellikle 22-26 °C de belirgin aktif hareket vardır. Genç kültürlerde çomak şekilli mikroorganizmaların yanısıra, korinebakterilere çok benzeyen kokoid formlara da sıkça rastlanır (Arda ve ark 2005, Anonim 3).

Bu bakteriler küçük, 0.4-2 µm boy ve 0.5 µm ende, hafif kıvrık, uçları yuvarlak, uçları bazen şiş olarak görülen tekli veya kıs zincir formunda görülen basillerdir. Sporsuz, kapsülsüz, Gram pozitif, kültürleri eskidikçe kokoid formdan uzun flamanlı şekillere kadar değişik şekillerde görülebilirler. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde daha kolay ve 1-45 °C gibi geniş bir sıcaklıkta üreyebilirler. Bu nedenle 4 °C'da bekletilen kültürlerden daha sonra 37 °C'da inkübe edilecek besiyerlerine ekimler pasajlanınca bakteri daha iyi üreme gösterir. Değişen anaerop özellik gösterdiklerinden % 10 CO₂'li ortamda daha iyi ürerler. (Erol 2007).

Kanlı agarda *L. monocytogenes* suşları dar bir beta-hemoliz alanı meydana getirirler. Serumlu glukozlu veya kanlı glukozlu tryptose agar gibi katı besi yerlerinde 24-48 saat içinde 0.5-1.0 mm çapında parlak, şeffaf, yuvarlak, S-tipli koloniler meydana getirir. Eski kültürlerde ise R-formu koloniler oluşturur. *L. monocytogenes* kültürlerde trypsine duyarlı, diyalize olmayan, termolabil ve antijenik karakterde hemolizin sentezler. *L. monocytogenes*'in biyokimyasal aktivitesi oldukça değişik ve aynı zamanda da zayıftır. Karbonhidratların bazılarında (glukoz, maltoz, mannoz, salisin, fruktoz, dekstrin, nişasta) asit oluşturur. Ancak gaz meydana getirmez. Katalaz, metil red, Voges-proskauer reaksiyonları, eskulin ve hippurat hidralizasyon testleri pozitif, oksidaz, üre, jelatin, kazein ve süt hidrolizasyon testleri ise negatiftir (Aydın ve ark 2006). Listerialar flagellaya sahip olduklarından kendilerinin de hem flagellar (H) antijeni ve hem de somatik (O) antijeni bulunur. *L. monocytogenes* O ve H antijenlerine göre aglutinasyon ve aglutinasyon absorpsiyon testleriyle 17'den fazla sero alt gruba ayrılmıştır.

L. monocytogenes, çeşitli antibiyotiklere (ampisilin, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin, sulfonamid) değişik derecede duyarlı, polimiksin-B'ye dirençlidir. Ayrıca, diğer fiziksel ve kimyasal maddelerde farklı derecelerde duyarlılık göstermektedir. Pastörizasyon sıcaklığında (65 °C de 30-40sn, 75 °C de 10 sn) ölürler. Toprakta 2-6 ay, süt içinde 12 ay, koyun gaitasında 3 ay, sığır gaitasında 16 ay ve çeşitli gıda maddelerinde 5-26 ay kadar canlı kaldığı belirlenmiştir (Aydın ve ark 2006).

2.3.4. Epidemiyoloji

L. monocytogenes, aslında, çabuk yayılan ve epidemiler oluşturan bir mikroorganizma olmayıp sporadik olgular halinde ortaya çıkan enfeksiyonlara yol açmaktadır. Ayrıca, insan ve hayvanlarda rastlanan birçok olguda da gizli enfeksiyonlar tarzında bir seyir gözlenmektedir. Epidemiyolojik açıdan; mevsim ve yatkınlık faktörleri ve kongenital bulaşma (doğumsal) ve veneral bulaşma önemlidir. Hastalığın çıkışında daha çok vücut direncini kıran predispoze faktörler rol oynar. Beslenme bozuklukları, viral ve paraziter enfeksiyonlar hazırlayıcı nedenlerdir. *L. monocytogenes* birçok hayvanın (koyun, sığır, keçi, manda, geyik, domuz, köpek, kedi, laboratuvar hayvanları, kürk hayvanları, hindi, kaz, çinçila, ördek, güvercin, tavuk, vs) sekret ve ekskretlerinden (enfekte hayvanların doku ve organlarından, atık yavru ve yavru zarlarından, süt, gaita, idrar, vajinal akıntılardan, vs), sularından, toprak, gübre, gıdalardan izole ve identifiye edilebilmektedir. Silaj yemleri bulaşmada önemlidir. Etken vücuda sindirim kanalından girerek hastalık oluşturur. İnhalasyon ve konjunktival yolla da enfeksiyon alınabilir. Mikroorganizma vücuttan enfekte hayvanların süt, idrar, aborte fetus, fetal membranlar, vajinal akıntılar, burun akıntıları ile dışarı çıkarak etrafı bulaştırmaktadır. Mikropla bulaşık gıda ve sular bulaşmada önemlidir. Bulaşmada kan emici sinek ve keneler de rol oynar (Aydın ve ark 2006).

2.3.5. Patogenezis

L. monocytogenes'in konak hücre içine girmesi, vakuollerden etkilenmemesi, sitozollerde çoğalabilmesi ve hücrelere dağılabilmesi patojenitesinde önem arz etmektedir. *L. monocytogenes*, epitel hücrelerine ve diğer hücrelere etkin bir şekilde girebilmek için sırasıyla internalin A (InlA) ve internalin B (InlB), konak hücresi içine girdikten sonra vakuollerden korunabilmek için listeriolizin O (LLO) ve fosfolipaz C sentezlemektedir. Bunun yanı sıra hücre içi ve hücreler arası taşınmayı sağlamak için de aktin transferaz protein (ActA) ve metalloproteaz (Mpl) sentezlediği bilinmektedir. Bu invazyon ve virülans bağlantılı proteinler, konak bağışıklık sisteminin hedef olarak kabul ettiği yapılardır (Wagner ve McLauchlin 2008, Kum 2009). *L. monocytogenes*'in β -listeriolizin adı verilen protein yapısında toksik bir hemolizin üretimine bağlı olarak patojenite gösterdiği bilinmektedir. β -listeriolizin, hücrelerin sitoplazmik membranlarında porlar açarak geçirgenliklerini bozmakta ve parçalanmalarına neden olmaktadır. Doku ve kırmızı kan hücrelerini lize ederken, siklik

AMP üretimini de teşvik etmektedir (Çağlar ve ark 2000, Kuhn ve Goebel 2007). *L. monocytogenes*, bağırsak mukozasına yerleştikten sonra β -listeriolizin üreterek, karaciğer ve dalak makrofajlarında çoğalır. β -listeriolizin, bağırsak mukozasına yerleşme aşamasında bağırsak hareketlerini yavaşlatmasının yanı sıra gebelikte uterus kasına etki ederek prematüre doğumlara neden olabilmektedir. *L. monocytogenes*'in kültür ortamlarında da tripsine duyarlı, termolabil ve antijenik karakterde β -listeriolizin sentezlediği bilinmektedir. β -listeriolizin ile lipaz üretimi arasında bir ilişki olduğu ve sadece virulent suşların lipolitik olduğu belirtilmektedir (Koçan ve Halkman 2006). β -listeriolizin dışında diğer patojenite faktörleri; demir konsantrasyonu, intraselüler üreme kapasitesi, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, katalaz ve yüzey bileşikleridir (Çağlar ve ark 2000, Kuhn ve Goebel 2007). Katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri, intraselüler yaşam için gereklidir. Bütün suşlarda tespit edilen fosfataz aktivitesinin patojenitede etkili olduğu bilinmektedir. Yüksek demir seviyesi de *L. monocytogenes*'in gelişimini artırmaktadır (Çağlar ve ark 2000).

2.3.6. *Listeria monocytogenes*'in Virülans Faktörleri

L. monocytogenes'in konakçı hücrelerine adhezyon ve invazyonunda farklı proteinlerin fonksiyonu bulunmaktadır. Bu proteinlerden InIA ve InIB identifiye edilmiş ilk proteinlerdir ve *L. monocytogenes* hücre yüzeyine salınırlar (Peiris 2005, Bhunia 2008).

İnternalin A

InIA proteini, 800 amino asitten oluşmuştur. InIA, *L. monocytogenes*'in intestinal epitel hücrelerine girmesini sağlayarak intestinal bariyerin aşılmasında önemli rol oynamaktadır (Peiris 2005). E-kaderin, intestinal epitel hücrelerinden salgılanan bir transmembran glikoproteini (Güç 2004) olup InIA'nın reseptörü olarak görev yapmaktadır. InIA ve E-kaderin arasındaki türe özgü etkileşim, virülans kabiliyetinde oldukça önem arz etmektedir (Peiris 2005). Klinik vakalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının büyük çoğunluğunda (%96) InIA tam uzunlukta sentezlenmesine karşın gıdalardan elde edilen izolatların daha az (%65) kısmında tam uzunlukta sentezlenmektedir. InIA, insan listeriozislerinin patojenitesinde önemli bir role sahiptir ve gıda kaynaklı listeriozis vakalarında virülansın bir işaretidir (Peiris 2005, Barbuddhe ve ark 2008, Bhunia 2008).

İnternalin B

InIB proteini, hepatositler ve nonepiteliyal hücreleri de içeren birçok farklı hücre yüzeyine girmeyi ve hareket etmeyi sağlayan 630 amino asitten meydana gelir. Hedef hücreler üzerindeki hepatosit büyüme faktörü (hgf), InIB için başlıca reseptör olarak tanımlanmıştır (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Otolizin amidaz

Otolizin amidaz (Ami), *L. monocytogenes* hücre duvarı üzerinde bulunan bir proteindir. Litik aktivitesi vardır ve hücre adhezyonunda rol oynar (Peiris 2005, Bhunia 2008).

p60

p60, hücre duvarı hidrolizisinde katalizör rol oynayan bir proteindir (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Fibronektin bağlayıcı protein

L. monocytogenes'de beş ayrı fibronektin bağlayıcı protein (Fbp) saptanmıştır. Bunlardan moleküler ağırlığı en fazla olan FbpA, LLO ve InIB'nin seviyelerini düzenler ve bazı virülant proteinlerin degradasyonunu önler. Bunun yanı sıra farelerin karaciğer ve dalak, insanların epitel hücrelerinde bakterinin etkili kolonizasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Listeriolizin O

LLO, *L. monocytogenes*'in primer ve sekonder fagozomlardan kaçmasına yardım eden, porlarda oluşmuş bir proteindir. Bunun yanı sıra LLO, makrofajlarda interlökin-1 sekresyonu, apoptozis, hücre adhezyonu ve enfekte epitel hücrelerde protein salınımı gibi birçok hücrel cevabı açığa çıkarır (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Aktin transferaz protein

Aktin transferaz protein (ActA), *L. monocytogenes*'in yüzey proteindir. 639 amino asitten oluşmaktadır. Hedef hücrelere bağlanma ve hücre içine giriş fonksiyonlarında görevlidir. Enfekte hücrelerin sitoplazmasındaki bakterilerin hareketini başlatan ve hücreden hücreye iletimini sürdüren aktin filamentlerinin polimerizasyonunu başlatır (Peiris 2005, Kuhn ve Goebel 2007, Bhunia 2008).

Sortases

Hücre yüzey proteinlerini sabitleyerek, *L. monocytogenes*'in virülans özelliklerine katkı sağlayan transpeptidazlardır (Peiris 2005).

Auto

Otolitik aktiviteye sahip bir yüzey proteindir. Ökaryotik hücrelerin invazyonunda rol oynar. Auto, erken ve geç enfeksiyon safhalarında bulunur. *L. innocua* ve *L. monocytogenes* 4b'de yoktur (Peiris 2005).

Safra tuzu hidrolazı

Konjuge safra tuzlarını dekonjuge eden bir enzimdir. Safra tuzlarının hidrolizi, *L. monocytogenes*'i safra tuzlarının toksik etkisinden koruyan bir mekanizmadır (Peiris 2005).

2.3.7. *Listeria monocytogenes*'in Oluşturduğu Hastalıklar

L. monocytogenes'in önemi, intestinal sistem dışında birçok doku, organ ve sistemde çeşitli hastalıklara (örn., yavru atma, sepsis, mastit, menenjit, meningoensefalit, konjonktivit, faranjit, sinüzit, gelişme geriliği, karaciğer apsesi, siroz) neden olabilen bir patojen olmasından ileri gelmektedir (Gönç ve Kılıç 2002).

2.3.7.1. Hayvanlarda Listeriozis

Birçok hayvan türünde (örn., sığır, manda, koyun, keçi, geyik, domuz, tavuk, hindi, sülün, güvercin, yaras, köpek, kedi, tilki, fare, at, tavşan, balık) ortaya çıkan listeriozis olguları görülmektedir. Listeriozis enfeksiyonunda bazı hayvan türlerinin (örn., sığır, koyun, keçi, domuz, tavuk, hindi, sülün, martı, karga, güvercin ve balık) dışkılarında *L. monocytogenes* tespit edildiği bildirilmiştir. Bu durum, çevrenin kontaminasyonunda önemli rol oynamaktadır. *L. monocytogenes*, hasta hayvanların yanı sıra sağlıklı hayvanların dışkılarından da izole edilebilmektedir (Saunders ve Wiedmann 2007). Weber ve ark (1995), sağlıklı hayvanların dışkılarından izole ettikleri *L. monocytogenes* oranlarını sırasıyla sığır (% 33), koyun (% 8), kuşlar (% 8), domuz (% 5,9), at (% 4,8) ve köpek (% 0,9) olarak bulmuşlardır. Silajla beslenen ruminantlarda diğer hayvan türlerinden daha fazla listeriozis olguları görülmektedir. Bu hayvanlarda listeriozis enfeksiyonları genellikle kontamine silaj

tüketimine bağlı gerçekleşmektedir (Saunders ve Wiedmann 2007). Enfekte hayvanlar salgılarıyla çevreyi kontamine edebilmektedirler. Sağlıklı hayvanlara bulaşma daha çok oral yolla gerçekleşmektedir. Gebe hayvanlarda (başta sığır ve koyunlar olmak üzere) uterusun enfeksiyonuyla abort, ölü doğum veya doğum sonrası ilk dört haftada yavru ölümleri görülmektedir. Yeni doğan kuzularda sıklıkla, sığırlarda nadiren visseral veya septisemik enfeksiyonlar görülebilmektedir. Bunun yanı sıra yürüme bozuklukları ve felç semptomlarıyla görülen ensefalitis, koyun, keçi ve sığırları etkilemektedir. Sığır mastitisi nadir görülmesine karşın tedavi sürecinin sonuna kadar sütle bu bakterinin salgılandığı bilinmektedir (Kınık ve ark 1998).

2.3.7.2. İnsanlarda Listeriozis

İnsanlarda görülen ilk listeriozis vakası I. Dünya Savaşı sonrasında bir askerde görülen menenjit olgusudur. Bunun yanı sıra bakterinin patojen özelliğinin kesinlik kazanması, 1949 yılında Almanya'daki yeni doğan bebeklerde görülen epidemik listeriozis olgularında, bakterinin ekstraintestinal sistemlerdeki etkilerinin de ortaya konmasıyla mümkün olmuştur (Hof 2003). *L. monocytogenes*, göz ve deri yoluyla direkt olarak da bulaşabildiği gibi gıdalardan, hayvanlardan, insektlerden, bitkilerden ve topraktan da insanlara bulaşabilmektedir. Kontamine gıdaların tüketimi, bulaşmada en sık karşılaşılan yoldur. Göz ve deri yoluyla bulaşma daha çok laboratuvar çalışanları, hayvan bakıcıları ve Veteriner Hekimlerde görülmektedir (Erol 2007). İnsanlarda oluşturduğu enfeksiyon bakımından listeriozis, invaziv ve invaziv olmayan olarak iki formda incelenebilmektedir. İnvaziv olmayan listeriozis, febril listerial gastroenterit olarak nitelendirilen hastalığın hafif formudur. Kısa bir inkübasyon dönemi sonunda baş ağrısı, diare, ateş ve miyalji ortaya çıkan başlıca semptomlardır. Hastalığın invaziv formu ise predispoze bireylerde (örn., hamileler, yenidoğanlar, yaşlılar, bazı hastalıklar neticesinde bağışıklık sistemleri etkilenmiş bireyler, immünsüpresif ilaçlarla bağışıklık sistemleri baskılanan transplant alıcıları ve malign tümörlü hastalar) görülen, yüksek mortalite oranlarıyla seyreden ve inkübasyon periyodu 90 güne kadar çıkabilen şeklidir (Painter ve Slutsker 2007). İnvaziv listerioziste başlıca formlar ve klinik bulgular; akut septik form (yeni doğan listeriozisi), merkezi sinir sistemi formu (menenjit, ensefalit, ensefalomiyelit), glandular form (lenfadenit), lokal form (deri listeriozisi, konjonktivit) ve kronik septik form (endokardit, apse) olarak belirtilmektedir (Erol 2007).

2.3.8. Semptomlar

Aydın ve ark (2006) tarafından bildirildiğine göre, genç koyunlarda enfeksiyon septisemik ve erginlerde de meningo-ensefalitis tarzında bir klinik tablo izler. Gebelerin bir kısmı da yavrularını atarlar. Hastalığın inkübasyon süresi, giren mikroorganizmanın giriş yoluna, miktarına, virulensine, konakçının duyarlılığına ve predispoze edici faktörlerin durumuna göre değişir. Bu süre 3-4 haftaya kadar uzayabilir.

Listerial enfeksiyon koyunlarda başlıca 3 klinik tablo ile ortaya çıkmaktadır (Arda ve ark 2005). Bunlar;

Meningo-ensefalitis: Hastalarda durgunluk, yavaş hareket, sürünün gerisinde kalma, bir yere yaslanma, yemleri çiğnememek ve ağızda unutmak, köşelere sıkışma, boyunda sertlik, diş gıcırdaması, tortikolis, kulaklardan birinin düşmesi, tek taraflı yüz felci, ağızdan salya ve burun deliklerinden mukoid bir salgının akması; dudaklarda titreme, yutma zorluğu, ensefalit ve son dönemlerde dairesel dönme (circling disease) ve ekstremitelerde paraliz görülür.

Septisemi: Enfeksiyonun bu tablosuna, genellikle, kuzularda ve genç hayvanlarda rastlanır. Hayvanlarda ateş, durgunluk, iştahsızlık, dermansızlık ve fazla susama, görülebilen başlıca klinik belirtiler arasındadır. Bazı hayvanlarda daireye de rastlanabilir. Hayvanlar çok bitkin hale gelerek yere yatarlar ve 1-7 gün içinde septisemiden ölürlür. Bu dönemde, mikroorganizma bütün vücuda yayıldığından, organ ve dokulardan etkeni izole etmek mümkündür.

Abortus: Listeria enfeksiyonlarında ana karnında fetusun infekte olması sonu abortuslara sporadik olaylar halinde rastlanır ve gebeliğin 11-12. haftasından sonra görülür. Gebeliğin ilk dönemlerinde infekte olması sonu atılan yavrular, genellikle ölü olarak doğarlar. İleri gebeler yavrularını canlı doğurabilirler. Ancak, bu yavrular kısa bir süre sonra septisemiden ölürlür. İnfeksiyonun klinik tablosu koyunlarda olduğu gibidir. Buzağılarda septisemi, erginlerde meningo-ensefalitis gebelerde yavru atımlarına yol açar. Etken sütle dışarı çıkar. İnfeksiyonda morbidite % 2-5 arasında olmasına karşın, spontan iyileşmeler nadirdir ve hastalık genellikle ölümle son bulur. Tek midelilerde ise septisemi ani ölüm, uterus enfeksiyonları ve abort görülür. Erol (2007)'un bildirdiğine göre, insanlarda inkübasyon periyodu 1-90 gün arasında değişmekle birlikte, tipik inkübasyon periyodu sıklıkla 1-7 gündür. Tablo 3'de Listeria enfeksiyonlarının insanlarda görülen başlıca formları verilmiştir. Genel olarak Listerioz'da mortalite çocuklarda ve immunsupresif insanlarda % 50, diğer gruplarda % 25 civarındadır.

Tablo 3. Listeria enfeksiyonlarında insanlarda görülen başlıca formlar (Erol 2007)

Akut-septik form	Yeni doğan listeriozu
MSS formu	Meningit, ensefalit, ensefalomiyelit
Glandular form	Lenfadenit
Lokal form	Deri listeriozu, konjunktivit
Kronik-septik form	Endokardit, apse vb.

2.3.9. Teşhis

2.3.9.1. Klinik Teşhis

Arda ve ark (2005)'a göre, klinik belirtilere dayanarak Listeriozis teşhisi koymak genellikle zordur. Benzer hastalıklarla da karışabilir. Bunlar arasında, enterotoksemi, beyin abseleri, brucellosis, vibriosis, ketozis, bradzot, loupig ill, akut gastroenteritis, zehirlenme, kuduz, viral ensefalitus, avitaminozis, *Coenurus cerebralis* enfeksiyonları sayılabilir.

2.3.9.2. Nekropsi Bulguları

Listeriozis'de otopside görülen makroskopik bozukluklar hiçbir zaman patognomonik değildir. Histopatolojik bakıda, pons, medulla ve spinal kordan yapılan seksiyonlarda, perivasküler lökosit infiltrasyonuna, ödemli ve hemorojik alanlara rastlanır (Arda ve ark 2005).

2.3.9.3. Laboratuvar Muayeneleri

2.3.9.3.1. Bakteriyoskopi

Marazi maddelerden hazırlanan preparatlar Gram yöntemi ile boyanır ve preparatta Gram pozitif küçük çomakçık veya kokoid formlu mikroorganizmalar görülmeye çalışılır.

Ancak, materyaller genelde kontamine oldukları için bakteriyoskopide etkeni tanımlamak olanaksızdır (Holt ve ark 1994).

Marazi maddelerden yapılan frotilerde ve doku kesitlerinde fluoresan antikor tekniği yardımıyla etkeni görmenin kolay olduğu ortaya konulmuş ve birçok laboratuarda bu yöntemden yararlanılmaktadır (Arda ve ark 2005).

2.3.9.3.2. *L. monocytogenes* İzolasyon Metotları

Süt ve ürünlerinden *L. monocytogenes* izolasyonunda kullanılabilen metotlar kültürel olmayan, kültürel ve hızlı metotlar olarak sınıflandırılabilir (Çelik ve Temiz 1991, İşleyici ve Sancak 2000).

2.3.9.3.2.1. Kültürel Olmayan İzolasyon Metotları

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Tekniği

Teknik, bir enzimin bilinen bir antijen veya antikora kovalent bağlanması, sonra enzim bağlı materyalin örnekle tepkimeye sokulması ve daha sonra enzime özel substrat eklenerek enzim etkinliğinin hem nicel hem de nitel olarak tespitine dayanmaktadır (Reid ve ark 2006). ELISA tekniğini Wagner ve Bubert (1999), *L. monocytogenes*'in izolasyonunda, Palumbo ve ark (2003), gıdalardan, çevreden ve klinik vakalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarını serotiplendirmede kullanmışlardır.

Fluorescence Antibody (FAT) Tekniği

Tekniğin esası, fluorojenik ve kromojenik özellikteki bir boya ile (örn., akridin orange, nötral red, fosfatidilinositol) boyanmış hücrelerin ihtiva ettiği deoksiribo nükleik asit (DNA) ve ribo nükleik asit (RNA) miktarlarına bağlı olarak farklı renklerde ve yoğunlukta fluoresans vermesidir (Cherry ve Moody 1965, İşleyici ve Sancak 2000).

Polymerase Chain Reaction (PCR) Tekniği

PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi temeline dayanan in vitro bir tekniktir (Arı 2008). PCR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Brehm-Stecher ve Johnson 2007, Liu ve ark 2008).

2.3.9.3.2.2. Kültürel İzolasyon Metotları

Listeria izolasyonunda kullanılan kültürel teknikler, zenginleştirme ve izolasyon aşamalarından oluşmaktadır (Curtis 1999). Selektif zenginleştirme aşamasında *Listeria* besiyerlerinin bileşimindeki suplementler, *Listeria* spp. dışındaki mikroorganizmaların üremesi üzerine inhibitör etkide bulunur. *Listeria* besiyerlerinin bileşimindeki akriflavin enterokokların, sikloheksimid maya ve küflerin, nalidiksik asit Gram negatif bakterilerin gelişimini engeller. Bu suplementler *Listeria* spp.'lerin üreme ve gelişmeleri için uygun ortam oluşturur (Donnelly ve Nyachuba 2007). Bunun yanı sıra besiyerinin bileşiminde bulunan ve *Listeria* bakterileri tarafından kullanılan bazı maddeler (örn., eskulin, ferrik amonyum sitrat) izolasyon aşamasında tipik renkli veya zonlu kolonilerin oluşmasında ve dolayısıyla selektif ayırımı etkilidirler (İşleyici ve Sancak 2000).

Food and Drug Administration (FDA) Tekniği

FDA tekniğinde, selektif inhibitörler (suplement) ilave edilmeden, hasar görmüş *Listeria* bakterilerinin onarılmasını sağlamak için 4 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmektedir. *Listeria* spp. varlığı yönünden araştırılacak numuneden 25 g ya da ml, 225 ml'lik *Listeria* Enrichment Broth zenginleştirme ortamında homojenize edilir. Suplement ilave edilmeden 30 °C'de 4 saat, suplementli 44 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında zenginleştirme ortamından McBride Agar, Oxford Agar, PALCAM Agar veya LPM Agar gibi selektif bir katı besiyerine ekilir. LPM Agar'da 30 °C'de, diğer agarlarda ise 35 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Selektif agarlarda gelişen tipik en az beş koloniden, Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'a ve identifikasyon aşamalarına geçilir (Curtis 1999, Hitckins 2003, Donnelly ve Nyachuba 2007).

International Dairy Federation (IDF) Tekniği

IDF tekniğinde, 25 g ya da ml numune, 225 ml IDF Selective Enrichment Broth'da homojenize edilir. 30 °C'de 48 saatlik ön zenginleştirmeyi takiben PALCAM ve/veya Oxford Agar'a ekim yapılır. 30 °C'de 24-48 saat inkübe edilir. Selektif agarlarda gelişen tipik en az beş koloniden, Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'a ve identifikasyon aşamalarına geçilir (Donnelly ve Nyachuba 2007).

International Standardization Organisation (ISO) Tekniği

ISO tekniğinde, yarı selektif ön zenginleştirme için 25 g ya da ml numune, 225 ml ½ gücündeki Fraser Broth'da inkübasyona bırakılır. 30 °C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben PALCAM ve/veya Oxford Agar'a ekim yapılır. Bunun yanı sıra tam gücündeki 10 ml Fraser Broth içeren bir tüpe zenginleştirme brothundan 0,1 ml aktarılır. 35-37 °C'de 24 saat

inkübasyonu takiben PALCAM ve/veya Oxford Agar'a ekim yapılır. Selektif agarlarda 30-37 °C'deki inkübasyonun 24. ve 48. Saatlerinde tipik en az beş koloniden, Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'a ve identifikasyon aşamalarına geçilir (Curtis 1999, İşleyici ve Sancak 2000).

Soğukta Zenginleştirme Tekniği

İnkübasyonun gerçekleştirildiği 4 °C'de *L. monocytogenes*'in ortamdaki sayısı arttığı gibi mikroflorada yer alan diğer bakterilerin gelişimi hiç olmamakta ya da önemsenmeyecek düzeyde olmaktadır (Çelik ve Temiz 1991, Donnelly ve Nyachuba 2007). *Listeria* varlığı yönünden araştırılacak olan 50 g ya da ml numune, 450 ml Nutrient Broth'da homojenize edilir. Homojenizasyon sonrası 4 °C'de 8 haftaya kadar inkübasyona bırakılır. Sırasıyla bir, dört ve sekiz hafta sonunda soğukta zenginleştirme ortamından 1 ml, 9 ml selektif buyyon (örn., nutrient buyyon) içeren tüplere aktarılır. 35 °C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben LPM Agar, Gum-Based Nalidixic Acid Medium ya da modifiye Mcbride's Agar gibi selektif besiyerlerinden birisine ekim yapılır. Selektif besiyerlerinde üreyen kolonilerden tipik olanlar değerlendirilerek identifikasyon aşamalarına geçilir (Çelik ve Temiz 1991, İşleyici ve Sancak 2000). Eld ve ark (1993), listeriozisten ölen hayvanların kavrularında soğukta zenginleştirme tekniğiyle, IDF tekniğini *L. monocytogenes*'in izolasyon oranları bakımından karşılaştırmak amacıyla kullanmışlardır. Araştırmacılar IDF tekniğinin, soğukta zenginleştirme tekniğine kıyasla daha hızlı ve spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.9.4. Hızlı Teknikler

Mikroorganizmaların, klasik kültür teknikleriyle gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonunun uzun zaman alması önemli bir sorundur. Hızlı teknikler, kısa raf ömrüne sahip gıdaların tüketim noktalarına sunulmadan önce *L. monocytogenes* varlığı bakımından araştırılmalarında önem arz etmektedir (Çelik ve Temiz 1991, İşleyici ve Sancak 2000).

2.3.9.4.1. Antijen Antikor Reaksiyonlarına Dayalı Hızlı Teknikler

Genellikle ticari olarak aynı esas temel alınarak üretilen birçok test kiti bulunmaktadır. Bunlar arasında; Unique *Listeria* Tecra, VIP *Listeria* Biocontrol Systems, Clearview *Listeria* Oxoid, *Listeria* Tek Organon Technique, *Listeria* VIA Tecra, Assurance *Listeria* EIA Biocontrol Systems, Transia *Listeria* Diffchamb, Pathalert *Listeria* spp. + *L. monocytogenes* Merck, Vidas bioMerieux ve EIA Foss Electric kitleri sayılabilir (Wagner ve Bubert 1999).

Immuno Magnetic Separation (IMS) Tekniği

Manyetik taşıyıcılar üzerinde tutulmuş antikörlerin (örn., monoklonal veya poliklonal antikörler, lektinler ya da aglütininler) hedef mikroorganizma hücrelerini tutabilme prensibine dayanmaktadır. Numuneye ön zenginleştirme yapılır. Antikörleri içeren süspansiyon ile karıştırılır. Karışım manyetik uygulama ile ayırım ve konsantrasyon işlemine tabi tutulur. Metot ön zenginleştirme işleminden sonra 30 dk. içerisinde tamamlanabilmektedir (İşleyici ve Sancak 2000, Brehm-Stecher ve Johnson 2007).

Clearview (Oxoid) Hızlı Test Kiti

Bu yöntemde *Listeria* spp. kontaminasyonunu belirlemek amacıyla H antijeninin B tipi aranır. Numuneden 25 g ya da ml alınır ve ½ yoğunluktaki 225 ml Fraser Broth ile homojenize edilir. 30 °C’de 21-24 saat inkübasyona bırakılır. Kültürden 0,1 ml, 10 ml Buffered *Listeria* Enrichment Broth besiyerine aktarılır. 30 °C’de 21-24 saat inkübasyona bırakılır. Tüp sarsılmadan ve karışmamasına özen göstererek üst kısımdan 2 ml alınır. O antijenlerinin eliminasyonu amacıyla 80 °C’deki su banyosunda 20 dk. tutulur. Soğutulan ekstraktan 135 µl alınarak test kitinin örnek alma bölmesine aktarılır. 20 dk. içerisinde mavi renk oluşumu test kitinin çalıştığını göstermektedir. Sonuç alma bölmesinde mavi çizgi oluşumu B antijeninin varlığını belirtmektedir. Dolayısıyla örnekte *Listeria* spp. Olduğunu ifade etmektedir. Standart bir katı besiyerine ekim yapılarak sonucun doğrulanması ve tür identifikasyonu gerçekleştirilir (Oxoid 2011).

Singlepath (Merck) Hızlı Test Kiti

Numuneden 25 g ya da ml, 225 ml Fraser Broth içerisinde homojenize edilir. *Listeria* spp.’lerin stres faktörlerinden etkilendiği ya da hasar gördüğü tahmin ediliyorsa Fraser Broth besiyeri öncelikle 30 °C’de 4 saat supplementsiz inkübe edilir. Sonra supplement ilave edilir. 30 °C’de 20 saat ön zenginleştirme yapılır. Kültürden 0,1 ml, 9,9 ml Buffered *Listeria* Enrichment Broth besiyerine ya da tam güçlü Fraser Broth’a aktarılır. 30 °C’de 18-24 saat inkübe edilir. Kültürden tüpe 1-2 ml alınır. 100 °C’deki su banyosunda 15 dk. tutulur. Soğutulduktan sonra 160 µl Singlepath *Listeria* kitine uygulanır. 20 dk. sonunda kontrol bölmesinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test bölmesinde de kırmızı şerit görülmesi numunede *Listeria* spp. olduğunu ifade etmektedir. Standart bir katı besiyerine ekim yapılarak sonucun doğrulanması ve tür identifikasyonu gerçekleştirilir (Merck 2011).

Pathalert (Merck) Hızlı Test Kiti

H antijenleri yüksek inkübasyon sıcaklıklarında gelişmemektedir. Dolayısıyla H antijenlerinin tespitine yönelik testlerde yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu yöntemde *Listeria* bakterilerine özgü p60 ekstraselüler proteininin tespiti amaçlanmaktadır. Yöntemin *L.*

monocytogenes ve *Listeria* spp. tespitine yönelik iki çeşidi vardır. *L. monocytogenes* tespiti için numuneden 25 g ya da ml alınır. ½ yoğunluktaki 225 ml Listeria Enrichment Broth ya da PALCAM Broth besiyerinde homojenize edilir. 37 °C’de 16-24 saat inkübasyona bırakılır. Kültürden 0,1 ml, 10 ml tam yoğunluktaki Listeria Enrichment Broth ya da PALCAM Broth besiyerine aktarılır. 37 °C’de 22-24 saat inkübasyona bırakılır. Kültürden tüpe 1 ml alınır. O antijenlerinin eliminasyonu amacıyla 95°C’deki su banyosunda 10 dk. tutulur. 14000 rounds per minute (rpm)’de 1 dk. santrifüjlenir. Sıvı kısım mikrotitrasyon pleytlerine aktarılır. ELISA okuyucusunda, 450 nm’de değerlendirilir (İşleyici ve Sancak 2000, Merck 2011).

2.3.9.5. *Listeria monocytogenes*’i Genotiplendirme Metotları

Listeriozise neden olan gıda maddesinden izole edilen *L. monocytogenes* izolatının, üretim hattının herhangi bir noktasından izole edilen izolat ile aynı ya da benzer olduğunu ortaya koymak önem arz etmektedir. Kontaminasyon kaynaklarının saptanabilmesine olanak sağlayan bu durum, genotiplendirme metotlarının uygulanmasıyla mümkün olabilmektedir. Genotiplendirmeye kontaminasyon kaynaklarının tespitinin yanı sıra izolatların klonal ilişkileri de açıklanabilmektedir (Fugett ve ark 2007). *L. monocytogenes*’in genotiplendirilmesinde geleneksel fenotipik metotlar (örn., serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme, antibiyotik duyarlılık testi) ve moleküler genotipik metotlar [örn., Arbitrarily-Primed PCR (AP-PCR) (Louie ve ark 1996), Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) (Dhanashree ve ark 2003), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Lew ve Desmarchelier 1992), Ribotyping (Jeffers ve ark 2001), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Louie ve ark 1996)] kullanılmıştır.

2.3.9.5.1. Geleneksel Fenotipik Genotiplendirme Metotları

Geleneksel alt tiplendirme yöntemleri iş yükü fazla, uzun zaman alan, değişken sonuçlar verebilen metotlardır.

Serotiplendirme

L. monocytogenes hücre yüzeyinde farklı antijenik yapılar bulunmaktadır. Antijenik yönden farklılığı sağlayan bu yapılar flagella ve fimbria gibi ekstraselüler organeller, membran proteinleri, lipoteikoik asitler gibi birçok farklı yüzey yapıları tarafından üretilmektedir. Serolojik yöntemlerle bu farklılıkları belirlemek mümkündür. Serotiplendirmede esas, O ve H

antijenlerinin faktör antiserumları ile *L. monocytogenes*'in alt tiplerinin ortaya konmasıdır (Graves ve ark 2007). Serotiplendirme amacıyla, günümüze kadar farklı firmalar tarafından (örn., Eurobio, Denka Seiken, Difco Bacto) üretilen her bir antijen türüne spesifik aglutininleri içeren antiserumlar kullanılmıştır.

Bakteriyofaj Tiplendirme (Faj Tiplendirme)

L. monocytogenes izolatları standart bir faj seti kullanılarak direnç ve duyarlılıkları bakımından tiplendirilebilmektedir. Yüksek ayırım gücü nedeniyle faj tiplendirme metotları serotiplendirme ile birlikte, moleküler tiplendirme metotlarından önce sıkça kullanılmıştır (Graves ve ark 2007).

Bakteriyosin Tiplendirme

Bakteriyosinler genellikle sentezlendiği bakterinin genetik yapısına yakın bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterirler. Hedef ve translokasyon sistemlerinin spesifikite göstermesi nedeniyle bakteriyosinlerin yalnız benzer reseptör ve translokasyon sistemine sahip olan az sayıda hedefi tanıdığı düşünülmektedir (Akkoç ve ark 2009). Bu özelliklerinden faydalanılarak mikroorganizmaların alt tiplendirmelerinde kullanılabilirler.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

L. monocytogenes izolatları antibiyotiklere farklı duyarlılık ya da direnç cevapları verebilmektedir. Bu farklılık epidemiyolojik olarak önem arz etmektedir. İzolatların bu özelliklerinden faydalanılarak alt tiplendirme yapılabilir (Graves ve ark 2007).

2.3.9.5.2. Moleküler Genotipik Metotlar

Moleküler alt tiplendirmelerde yöntemleri *L. monocytogenes*'in epidemiyolojisinin anlaşılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemler son zamanlarda yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu DNA temelli metotlar; bakteriyel DNA restriksiyon sindirim enzimleri kullanılarak, DNA fragmentlerinin bant desenlerinin oluşturulmasını ve bakteriyel alt tanımlamaların yapılmasını amaçlar (Saunders ve Wiedmann 2007).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP, genomik DNA'nın tümünün parçalanmasından elde edilen restriksiyon fragmentlerinin selektif PCR ile amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. AFLP; DNA'nın restriksiyonu ve oligonükleotid adaptörlerinin bağlanması, restriksiyon fragmentlerinin selektif amplifikasyonu ve amplifiye fragmentlerin jel analizinden oluşur. Yöntem, edinilmiş sekans bilgisine gerek duyulmadan herhangi bir kaynaktaki DNA'dan parmak izi üretmek için kullanılabilmektedir (Graves ve ark 2007).

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE)

MEE, metabolik enzimlerin elektroforetik mobilite farklılıklarının ortaya konması esasına dayanmaktadır (Graves ve ark 2007). MEE yöntemi; insan, hayvan ve çevresel kaynaklardan (Boerlin ve Piffaretti 1991) elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının tiplendirmesinde kullanılmıştır.

Chromosomal DNA Restriction Endonuclease Analysis (REA)

Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kromozomal DNA'nın belirli bölgelerinden kesilmesiyle uygulanan bir metottur. Bu enzimler yüksek özgülüklerinden dolayı kromozomal DNA'nın istenen bazlardan kesilmesini ve DNA'nın agaroz jel profilinin ifade edilmesini sağlamaktadırlar. Metotta karşılaşılabilen en büyük problem yüzlerce benzer DNA profillerinin karşılaştırılmasında ortaya çıkmaktadır (Graves ve ark 2007).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP; DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesime uğratıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğin yorumlanması esasına dayanmaktadır. RFLP analizi, bakteriyel kromozom ve ekstra kromozomal DNA'nın veya viral genomun restriksiyon profillerini belirlemede kullanılmaktadır. Yöntem; DNA'nın izolasyonu, DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesi olmak üzere dört temel aşamada gerçekleştirilmektedir. RFLP yönteminde, PCR ile amplifiye edilen çeşitli suşlara ait hedef sekanslarla, restriksiyon fragmentlerinin oluşturduğu bantların karşılaştırılması yapılmaktadır (Swaminathan ve Matar 1993).

Ribotyping

Ribotiplendirme, suşların RFLP yöntemiyle tanımlandığı bir çeşit Southern hibridizasyon analiz tipidir. Southern blot analizleriyle yalnızca spesifik kromozomal lokusla bağlantılı olan kısmi restriksiyon fragmentleri belirlenir. Bu nedenle çok az miktardaki DNA fragmenti analiz edilir. Ribotiplendirme, nitroselüloz ya da naylon membran üzerindeki jel matriks üzerinde elektroforetik olarak ayrıştırılmış kromozomal DNA restriksiyon fragmentlerinin taşınmasını içerir. DNA fragmentlerinin immobilizasyonundan sonra 16S+23S ribozomal RNA (rRNA) veya rekombinant DNA (rDNA) problemleriyle membran uygun bir şekilde işaretlenir. Çünkü, rRNA'ları kodlayan genler oldukça korunmuşlardır. *E. coli* rRNA'sı veya *E. coli*'nin klonlanmış ribozomal operon klonu (*rrnB*) *L. monocytogenes*'i işaretlemede kullanılabilir. Genelde, ribotip ürünleri, suşların in vitro ve in vivo pasajlarından sonra oldukça dayanıklı ve üretilebilirlerdir. Bu nedenle, epidemiyolojik veya filogenetik çalışmalar için en uygun metot olarak kullanılabilir (Graves ve ark 2007).

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Yöntem; araştırılan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş tek bir 9-10 base pair (bp) oligonükleotid parçasının, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanması ve PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır (Graves ve ark 2007). RAPD tekniğinin PCR aşamasında rastgele dizilimdeki primerler kullanılarak, bu primerlerin RAPD'in yapışma fazı esnasında tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanması sağlanır. Her bir RAPD primeri aynı PCR döngüsünde farklı lokuslardan farklı sayılarda DNA fragmentelerini çoğaltma potansiyeline sahiptir. Diğer bir ifadeyle farklı primerler farklı RAPD polimorfizmlerini üretebilmektedir. Amplifikasyonla elde edilen çoğaltma ürünü, radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Örneklerin hepsinde bulunan RAPD bantları monomorfik olarak kabul edilir. Diğer örneklerde bulunmayan ya da farklı mobilite sergileyenler polimorfik olarak tanımlanır. Elde edilen RAPD bantlarında sergilenen polimorfizmler, örnekler arasındaki genetik ilişkilerin ortaya konmasında önem arz etmektedir (Devrim ve Kaya 2006).

Repetitive Element Based Subtyping (REB)

PCR'in tekrarlayan element temelli alt tiplendirme metodu olan bu yöntemde kullanılan primerler kısa tekrarlayan dizilerden oluşan ekstrasjenik ya da genel interjenik rRNA oligonükleotidleri özelliklerindedir. Baz dizilimleri, etkili çoğaltılan DNA parçacıkları arasında, iki dizilimin birbirine çok yakın yerleşmesini sağlamak üzere bakteriyel kromozom etrafında birçok bölgede tipik olarak bulunurlar (Graves ve ark 2007). Van Kessel ve ark (2005), tekrarlayan element temelli alt tiplendirme metodunu kullanmışlardır.

Selective Restriction Fragment Amplification (SRFA)

SRFA metodunun esası, genomik DNA'nın restriksiyon enzimiyle kesilmesi sonucu oluşan DNA parçalarının bir grubunun selektif amplifikasyonuna dayanır. İki varyasyonu bulunmaktadır. Birinci durumda iki farklı restriksiyon enzimi ve amplifikasyon için iki primer kullanılmaktadır. İkinci durumda ise tek enzim ve tek primer kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan yöntemde bakteriyel DNA ekstrakte edilerek saflaştırılmakta ve iki adet restriksiyon enzimiyle kesilmektedir. Restriksiyon ürünü olan DNA segmentleri her bir enzim için hazırlanmış olan adaptörlerle bağlanmaya sokulmaktadır. Oluşan DNA'nın amplifikasyonunu takiben amplifikasyon ürünü jel elektroforezine tabi tutulur (Yağcı 2011).

DNA Macrorestriction Analysis by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE Uygulamalı DNA Makro Restriksiyon analizi; enzimatik olarak parçalanan ve hücrel proteinleri sindirilen kromozomal DNA içeren bakteri hücrelerinin agaroz jelde gömülerek değişken alanlı jel elektroforezine tabi tutulması ve DNA fragmentlerinin ayrılarak tanınması

işlemidir. PFGE Uygulamalı DNA Makro Restriksiyon analizi, 40 kb'den daha büyük DNA fragmentlerinin tanınmasına olanak sağlamaktadır. Genellikle 1 mb'den daha büyük doğrusal çift iplikli DNA molekülleri, jelin por büyüklüğünün doğrusal DNA'nın jelde göç edebilmesi için yeterli olmamasından dolayı, aynı hızla göç ederler. Bu durum, DNA fragmentlerinin benzer bant profilleri sergilemesine neden olmaktadır. Dolayısıyla fragment uzunlukları farklılıklarının görüntülenmesini engellemektedir. Por büyüklüğü, konsantrasyonu % 0,1 olan agaroz kullanılarak artırılabilen ancak bu durumda jel dayanıksızlaşarak kırılabilir bir yapı almakta ve kullanımı güçleşmektedir. Bu problem, 1984 yılında geliştirilen PFGE tekniği ile çözülmüştür. Schwartz ve Cantor tarafından geliştirilen PFGE, restriksiyon enzim analizlerinde kullanılan agaroz jel elektroforezinin jel üzerindeki elektrik alanının yönünün değiştirilebilmesine olanak sağlamaktadır. PFGE uygulamasında, DNA molekülleri belirli zaman aralıklarında birbirlerine farklı açıda iki elektriksel alan etkisinde bırakılır. Standart jel elektroforezinden en belirgin farkı, uygulanan elektrik alanının sabit olmaması, ayırma sırasında yönünün ve şiddetinin tekrarlanan biçimde değiştirilebilmesidir. DNA molekülleri bir elektriksel akıma uygun hareket ederken, kısa bir süre sonra diğer akıma uygunluk göstermek zorunda kalırlar. Sonuçta küçük moleküller elektriksel alan değişimlerine daha çabuk uyum sağladıklarından daha hızlı hareket ederler (Graves ve ark 2007).

2.3.9.6. Hayvan deneyi

Farelerde (subkutan ve intraperitoneal) ve tavşanlarda (intravenöz) deneysel Listeriosis oluşturulabilir. Farelerde otopside, karaciğerde multiple fokal nekrozlara rastlanır ve etken karaciğer, dalak ve kalp kanından kolayca izole edilebilir. Tavşanlarda otopside, karaciğerde ve daha az olarak da dalak ve miyokardiumda fokal nekrozlar bulunur. Ayrıca, *L. monocytogenes*'in kesin identifikasyonu için tavşan gözünde Anton testi uygulanabilir (Arda ve ark 2005).

2.3.10. Tedavi

Aydın ve ark (2006)'ye göre, hastalar ayrılıp temiz bir yere alındıktan sonra, zaman kaybetmeden antibiyotiklerle sağaltıma alınırlar. Ne kadar erken sağaltıma başlanırsa (özellikle sinir sistemi arazları belirmeden önce) kurtulma şansı da o oranda artar. Hayvanlara silaj yem giderek azaltılarak verilir veya tamamıyla kaldırılır. Birçok antibiyotiklere duyarlıdır. Özellikle klortetrasikin en etkili olanları arasındadır. Aynı amaçla diğer geniş

spektrumlu antibiyotikler hayvanın dayanabileceği en yüksek dozlarda kullanılır. Eđer varsa hayvanlara damar içi immun serum verilir.

2.3.11. Koruma

Hayvanlara iyi bir bakım ve beslenme uygulanır. Her türlü genel ve özel koruyucu önlemler alınır. Hastalar ve hastalıktan Şüpheli olanlar derhal ayrılır. Aktif immunizasyon sağlamak için yapılan l ve canlı aŐıllardan henüz iyi bir sonuç alınamamıŐtır. Hastalık insanlara da bulaŐtıđından hayvan bakıcılarının, veteriner hekimlerin ve diğer ilgili ŐahıŐların çok dikkatli bulunmaları gerekir. İnfeksiyon çıkan yerlerde çok iyi bir dezenfeksiyon uygulanır, altlıklar yakılır, aborte olmuŐ l hayvanlar, plasenta ve uterus akıntılarını açıkta bulundurulmaz, yakılır veya gömülür. DıŐarıdan içeri kontrolsüz hayvan sokulmaz. İnfeksiyon kaynakları ortadan kaldırılır ve portrler ayıklanır (Arda ve ark 2005).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Araştırmamızda, Aydın ili ve çevresinde bulunan çeşitli işletmelerdeki mastitis problemi gösteren 200 adet hayvandan aseptik ve tekniğine uygun olarak 10'ar ml süt numunesi alınarak soğuk zincirde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirildi. Süt örnekleri, Listeria izolasyonu çalışmasından önce California mastitis testine (CMT) tabi tutulmuştur. Kit içerisindeki bölmeye 3 ml süt ve aynı oranda CMT ayracı katılacak ve hafifçe döndürüldükten sonra renk değişimi ve yoğunluğuna göre reaksiyonlar negatif, zayıf pozitif, orta dereceli pozitif ve kuvvetli pozitif olarak değerlendirilmiştir. İdentifiye edilen suşlarda virulans genine spesifik primerler kullanılarak suşların genotipik identifikasyonu Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. İzolasyon Besiyerleri

3.1.2.1. Ön zenginleştirme besiyeri

UVM Modified Listeria Enrichment Broth (BD Difco-222330)

Pankreatik hidrolize kazein	5 g
Proteoz Pepton No. 3	5 g
Sığır eti ekstraktı	5 g
Maya ekstraktı	5 g
NaCl	20 g
Di-sodyum fosfat	9.6 g
Monopotasyum fosfat	1.35 g
Eskulin	1 g
Nalidixic Asid	0.02 g
Akriflavin HCl	12 mg

3.1.2.2. Asıl zenginleştirme besiyeri

Fraser Broth Base (BD Difco-211767) ve Fraser Broth Katkısı (BD Difco-211742)

Pankreatik hidrolize kazein	5 g
Proteoz Pepton No. 3	5 g
Sığır eti ekstraktı	5 g
Maya ekstraktı	5 g
NaCl	20 g
Di-sodyum fosfat	9.6 g
Monopotasylum fosfat	1.35 g
Eskulin	1 g
Nalidixic Asid	0.02 g
Akriflavin HCl	24 mg
Lityum Klorid	3 g
Fraser Broth Katkısı	
Ferrik Amonyum Sitrat	0.5 g

3.1.2.3. Selektif katı besiyeri

PALCAM Medium Base (BD Difco-263620) ve PALCAM Antimikrobik Katkısı (BD Difco-263710)

Pankreatik hidrolize kazein	8.9 g
Proteoz Pepton No. 3	4.4 g
Maya ekstraktı	4.4 g
Triptik hidrolize sığır kalbi	2.7 g
Mısır nişastası	0.9 g
Di-sodyum fosfat	9.6 g
NaCl	4.4 g
Mannitol	10 g
Dekstroz	0.5 g
Eskulin	1 g

Ferrik Amonyum Sitrat	0.5 g
Lityum Klorid	15 g
Fenol Kırmızısı	0.08 g
Akriflavin HCl	5 mg
Polimiksin B Sülfat	0.01 g
Agar	15.3 g
PALCAM Antimikrobik Katkısı	
Seftazidim	40 mg

3.1.3. Kullanılan Solusyonlar ve Ayraçlar

3.1.3.1. Kaliforniya Mastitis Test Ayraçı (Immucell®) 16 oz.

Alkil Benzen Sülfonat
pH indikatörü

250 mL konsantre ayraç, 1 L steril distile su içinde çözdürüldü. Ayraç, süt ile karıştırılarak enfeksiyonun derecesine göre klinik mastitis semptomu hayvanların sütleri toplandı.

3.1.3.2. İndol ayraçı

P-Dimethylaminobenzaldehyde	10 g
Isoamyl alcohol	150 ml
HCl (konsantre)	50 ml

3.1.4. PCR

3.1.4.1. PCR'da kullanılan solüsyonlar ve ayraçlar

TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base	121,1 g
-----------	---------

Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8.0 ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE	50 ml
Distile su	950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanmıştır.

Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O	10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanmıştır.

Tris (1M)

Tris Base	121 g
-----------	-------

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklav edilmiştir.

NaCl (1M)

NaCl	58,44 g
Distile Su	800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M)	10 ml
EDTA(0,5 M)	2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlanmıştır.

MgCl₂, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer 1 (100 mM (Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 10X Taq Buffer 2 ((NH₄)₂ SO₄) 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanılmıştır.

Ethidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka %1' lik ethidium bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan %2' lik agaroz jelin içerisine 5 µl miktarında eklenerek kullanılmıştır.

Agaroz Jel

Agaroz (Sigma)	2 g
TBE (0,5X)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırılmış ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutulmuştur. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde dökülmüş ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilmiştir.

Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas®) kullanılmıştır.

3.1.4.2. Primerler

PCR yöntemiyle *L. monocytogenes* belirlenmesinde kullanılan primerler Tablo 4.'de verilmiştir.

Tablo 4. PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları (Pangallo ve ark 2001).

Primer Çifti	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Hedef Gen	Büyüklik (bp)
inlB-F	CTGGAAAGTTTGTATTTGGGAAA	İnternalin B	343
inlB-R	TTTCATAATCGCCATCATCACT	prekürsör	

3.1.5. Cihazlar

3.1.5.1. Termal Döngüleme Cihazı

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.2. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi VilberLourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.6. Pozitif Kontrol

Bakteriyel identifikasyon ve PCR aşamalarında *L. monocytogenes* ATCC® 19111 suşu kullanılmıştır.

3.1.7. DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu amacıyla genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılmıştır.

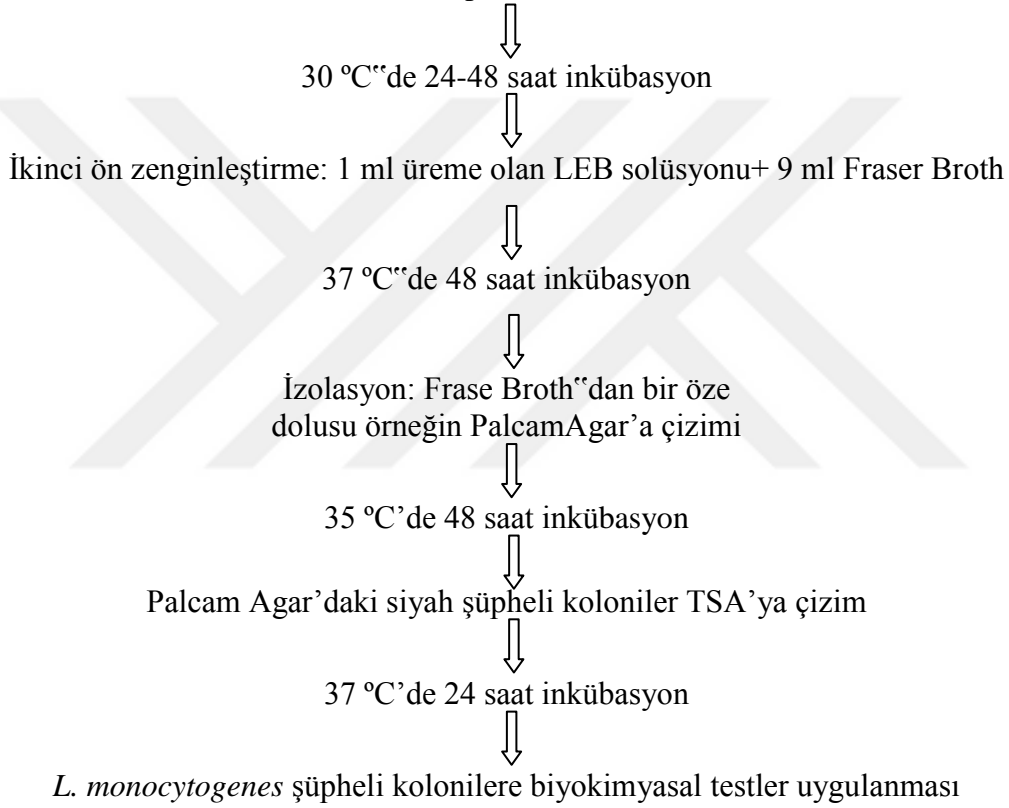
3.2. Yöntem

3.2.1. *L. monocytogenes* İzolasyon ve İdentifikasyonu

L. monocytogenes izolasyonu için FDA standart metodu kullanılmıştır (Hitckins 2003). Araştırmamızda bazı basamaklarda modifikasyonlar yapılmıştır. *L. monocytogenes* izolasyonu için 2,5 ml süt örneği, 22,5 ml LEB (Listeria Enrichment Broth- supplement ilaveli)

içerisine konuldu ve 2 dakika boyunca süspansiyon edildi. Ardından 30 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 1 ml LEB süspansiyonu Fraser broth besiyerine ikinci ön zenginleştirme olarak inoküle edildikten sonra 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Fraser broth kültürü, Palcam besiyerine pasajlandıktan sonra 35 °C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra siyah şüpheli koloniler Triptik soy agara ekildi ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSA da üreyen *L. monocytogenes* şüpheli kolonilere biyokimyasal testler uygulandı (Şekil 1) .

Örnek Hazırlama ve Selektif Zenginleştirme : Numune 2,5 g + 22,5 ml Listeria Enrichment Broth.(suplement ilaveli)



Şekil 1. *Listeria monocytogenes*’in izolasyon ve identifikasyon basamakları

3.2.2. *Listeria monocytogenes*’in Fenotipik İdentifikasyonu

Tryptic Soy agarda üreyen koloniler, tipik *Listeria* kolonileri olup olmadığı yönünden incelendi. Bu amaçla şüpheli kolonilere öncelikle Gram boyama, katalaz, oksidaz ve Sulfat Indole Motility medium besiyerinde hareket testi uygulandı. Tür düzeyinde identifikasyon amacıyla kanlı agarda hemoliz, nitrat redüksiyon testi, MR-VP testi, karbonhidrat fermentasyon testleri ve Christie Atkins Munch Peterson (CAMP) testi uygulandı.

Gram boyama

Şüpheli kolonilerden hazırlanan preparat kristal viyole ile 1 dk. boyandı. Distile suyla yıkandıktan sonra lugol ile 30 sn. muamele edildi. Preparat saf etil alkol ile 10-15 sn. dekolorasyon işlemine tabi tutuldu. Distile suyla yıkandı. Safranin ile 30 sn. boyandı. Mikroskopta 100'lük objektifte immersiyon yağı yardımıyla incelendi. Mor renkle boyanmış Gram pozitif, kısa çubuk ya da kokobasil tarzında görünen bakteri hücreleri *Listeria* sp. şüpheli olarak değerlendirildi.

Katalaz testi

Lam üzerine % 3'lük H₂O₂ solüsyonundan birkaç damla alındı. İğne uçlu öze yardımı ile şüpheli *Listeria* kolonisinden alınarak karıştırıldı. Gaz oluşumu katalaz reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi.

Oksidaz testi

Şüpheli *Listeria* kolonisinden öze yardımı ile bir koloni oksidaz test kiti üzerine alındı. Renk değişimi gözlenmemesi oksidaz reaksiyonu negatif ve *Listeria* pozitif olarak değerlendirildi.

Hareket testi

İğne uçlu öze yardımı ile şüpheli *Listeria* kolonisinden yarı katı Sulfate Indole Motility medium besiyerine dik olarak batırılıp inoküle edildi ve 25 °C'de 2-5 gün inkübasyona bırakıldı. Şemsiye tarzındaki üremeler hareket pozitif olarak değerlendirildi.

Kanlı agarda hemoliz

Tryptic Soy Agar'da üremiş kolonilerden iğne uçlu öze yardımıyla alınarak besiyeri tabanına yakın fakat tabana değmeyecek şekilde agarı parçalamadan kanlı agara ekim yapıldı. Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* ve negatif kontrol olarak *L. innocua* referans suşları kullanıldı. 24-48 saat inkübe edildi. Kanlı agarda üreyen koloniler hemoliz özellikleri bakımından ışık altında incelendi. Ekim çevresinde hemoliz zonu oluşturan koloniler şüpheli olarak değerlendirildi.

Nitrat redüksiyon testi

Şüpheli kolonilerden Nitrate Broth'a inoküle edildi ve 35 °C'de 2-5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda önce 0,2 ml A test çözeltisi ve sonra 0,2 ml B test çözeltisi ilave edildi. Çözeltilerin broth yüzeyinde temas ettiği kısımda kırmızı renk oluşması nitratın

nitrite indirgenmediğini dolayısıyla nitrat redüksiyon testinin pozitif olduğunu göstermektedir. Rengin oluşmadığı durumlarda çinko tozu ilave edilerek 5 dakika beklendi. Kırmızı viyole renk oluşması nitratın hala mevcut olduğunu ve nitrite dönüşmediğini gösterdi.

Metil Red-Voges Proskauer testi

MR-VP besiyerine şüpheli kültürler inokule edildi ve 37 °C’de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Metil Red indirgenmesini belirlemek amacıyla dört damla Metil Red solüsyonu damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak değerlendirildi. Voges Proskauer testi için ise 0,5 ml O’Meare ayırıcı konulup 37 °C’de su banyosunda 4 saat bırakıldı, pembe renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi.

Karbonhidrat fermentasyon testleri

Steril %5’lik dekstroz, eskulin, maltoz, ramnoz, mannitol ve ksiloz karbonhidrat çözeltilerinin her birinden steril karbonhidrat besiyerine 1 ml aktarıldı. Şüpheli kolonilerden bu tüplere inokulasyon yapıldıktan sonra 35 °C’de 2-7 gün inkübe edildi. Sonuçlar, Tablo 5’e göre değerlendirildi.

Tablo 5. *Listeria monocytogenes*’in karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları

Biyokimyasal Testler	Glikoz	Eskulin	Mannitol	Ksiloz	Ramnoz	Maltoz
<i>Listeria monocytogenes</i>	+/-	+	-	-	+	+

CAMP testi

Koyun kanlı agar plağına β-hemolitik *S. aureus* (ATCC 25923) ve *R. equi* (ATCC 6939) kültürlerinden birbirine karşıt olacak ekildi. *R. equi* ve β-hemolitik *S. aureus* arasında kalan kısma birbirine paralel ve iki yandaki bu iki mikroorganizmanın çizimlerine temas etmeyecek şekilde şüpheli izolatlar çizim yöntemiyle ekildi. 35 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. Plaklardaki hemoliz standartlara göre değerlendirildi.

3.2.3. *Listeria monocytogenes*'in Genotipik İdentifikasyonu

DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacıyla genomik DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılmış ve aşağıda belirtilen prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir.

Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:

*Bir öze dolusu listeria kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı.

Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C'de bekletildi. 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70'lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

3.2.4. PCR

Master Miksin Hazırlanışı: Araştırmamızda *L. monocytogenes* identifikasyonu için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 25 µl toplam hacimde olacak şekilde, 2.5 µl PCR Buffer, 10 mM deoksinükleotid triphosphate (dNTP)'den 200 µM, 250 nM primerlerden 1'er µl, Taq polymerase (1.5 U) 0.25 µl, template DNA 5 µl ve 14.25 µl distile su (ddH₂O) ilavesi ile hazırlanmıştır (Pangallo ve ark 2001) (Tablo 6).

Tablo 6. Mastermiks hazırlanma oranları (Pangallo ve ark 2001)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (μ l)
PCR Buffer	2.5 μ l
Taq polymerase (5 U)	0.25 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
<i>inlB-F</i> (250nM)	1 μ l
<i>inlB-R</i> (250nM)	1 μ l
Template DNA	5 μ l
ddH ₂ O	14.25 μ l
TOPLAM	25 μ l

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 μ L'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 20'şer μ l hazırlanan mastermiksden ilave edilmiştir. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan template DNA'dan 5'er μ l alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağzıları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlanmıştır. *inlB-F* ve *inlB-R* primerlerine özgü hazırlanan mastermiks PCR analizlerinde kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramı (Pangallo ve ark 2001) Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Pangallo ve ark 2001).

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	2 dk
Denatürasyon	35	94°C	45 sn
Bağlanma		60°C	45 sn
Uzama		72°C	90sn
Son Uzama	1	72°C	8 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

3.2.5. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklmesi

PCR işlemi üzerine elde edilen ürünlerden 10' ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye solusyonu ile karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, % 1.8'lik agaroz jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir.

3.2.6. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 15 dakika ve sonrasında 40V 500A akımda 60 dakika yürütülmüştür.

3.2.7. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarılmıştır. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirmiştir. UV ışığı üstünde fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirilmiştir.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapılmıştır. PCR analizinde, *L. monocytogenes* için 343 bp uzunluğundaki bant oluşumları aranmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Araştırmamızda Aydın ili ve çevresinde bulunan çiftliklerden CMT pozitif 200 adet süt örneği toplanmıştır. Toplanan süt örnekleri ile ilgili bilgiler Tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 8. Süt Örneklerinin Alınan Çiftliklere Göre Dağılımları

Örneklerin Alındığı Yerler		CMT pozitif örnek sayısı	Örnekleme yapılan Sığırlarınırkı	Sığırların Yaş Ortalaması	Sığırların Mastitis Derecesi Ortalamaları	<i>L. monocytogenes</i> İzole Edilen Çiftlikler
Nazilli	Çiftlik 1	15	Holştayn	4	Orta	0
	Çiftlik 2	15	Holştayn	4	Orta	1
	Çiftlik 3	13	Holştayn	4	Yüksek	2
	Çiftlik 4	12	Holştayn	3	Orta	0
Efeler	Çiftlik 1	15	Holştayn	2	Yüksek	0
	Çiftlik 2	15	Holştayn	4	Orta	2
	Çiftlik 3	13	Simmental	2	Orta	0
	Çiftlik 4	12	Holştayn	3	Orta	0
Söke	Çiftlik 1	20	Holştayn	3	Yüksek	1
	Çiftlik 2	17	Holştayn	3	Orta	0
	Çiftlik 3	17	Holştayn	4	Orta	1
Çine	Çiftlik 1	12	Holştayn	2	Orta	1
	Çiftlik 2	10	Holştayn	2	Yüksek	2
	Çiftlik 3	14	Holştayn	3	Orta	1

Laboratuvara getirilen örneklere yapılan fenotipik identifikasyon metotları sonucunda 200 adet süt örneğinin 11 (% 5,5)’inden *L. monocytogenes* identifiye edilmiştir. *L.*

monocytogenes identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler ile ilgili bilgiler Tablo 9’da belirtilmektedir.

Tablo 9. *L. monocytogenes* suşları kullanılarak yapılan bazı biyokimyasal testlerin sonuçları

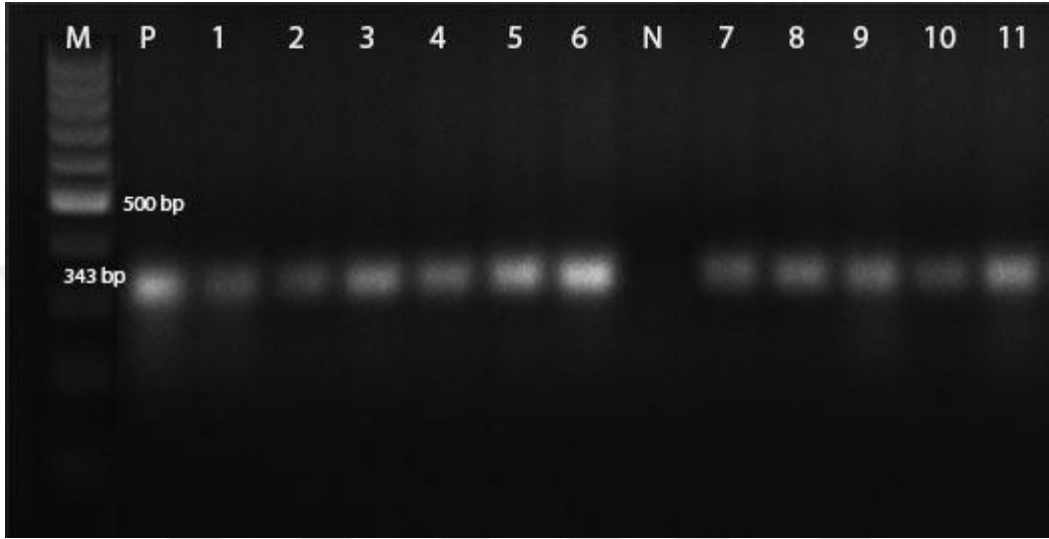
Testler	<i>Listeria monocytogenes</i>
35 °C’de üreme	+
Katalaz	+
Hareket (25°C’de)	+
Nitrat redüksiyonu	-
β-Hemoliz	+
CAMP Test (<i>S. aureus</i>)	+
CAMP Test (<i>R. equi</i>)	-
Mannitol	-
Ksiloz	-
Ramnoz	+
Maltoz	+
Eskulin	+
Glikoz	+
Oksidaz	+

4.2. PCR Bulguları

İzole edilen 11 adet(% 5.5) adet *L. monocytogenes* suşunun moleküler olarak doğrulanması amacıyla *L. monocytogenes* spesifik inLB geni primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile aynı örnekleri incelendiğinde izolatlar, inLB geni açısından pozitif olarak bulunmuş ve *L. monocytogenes* olarak doğrulanmıştır (Tablo 10). PCR ürünlerine yapılan jel elektroforez görüntüsü Resim 1’de sunulmuştur.

Tablo 10. PCR Çalışması Sonunda İzolasyon Yüzdesi

PCR Hedef Patojenler	İzole Edilen Suşların Sayısı (adet)	İzolasyon Yüzdeleri (%)
<i>L. monocytogenes</i>	11	5,5



Resim 1. *L. monocytogenes* inlB spesifik gen için yapılan PCR sonuçları **M:** 100 bp DNA ladder, **P:**Pozitif kontrol (*L. monocytogenes* ATCC 19111), **N:**Negatif Kontrol, **1-11:**inlB geni pozitif örnekler

Araştırmamızda toplamda 4 ilçede bulunan 14 çiftlikten 200 adet örnek toplanmıştır. Bu örneklerden *L. monocytogenes* izolasyonu 8 adet çiftlikten gerçekleştirilmiştir. Nazilli'den 3 (% 28), Efeler'den 2 (% 18), Söke'den 2 (% 18), Çine'den 4 (% 36) adet olmak üzere 11 adet *L. monocytogenes* izole ve tanımlenmiştir. *L. monocytogenes* tanımlama dağılımı incelendiğinde Çine ilçesinden en yüksek oranda izolat elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Gıda kaynaklı patojenlerin başında *L.monocytogenes* en önemli yer tutmaktadır. Bütün *Listeria* türleri topraktan, çürümüş sebzelerden, silajlardan, lağım sularından, sulardan, hayvan yemlerinden, taze ve işlenmiş etlerden, çiğ sütlerden, peynirlerden, mezbaha atıklarından ve asemptomatik insan ve hayvan portörlerden izole edilmektedirler. Çevrede bu ölçüde yaygın bulunması, *Listeria* türlerinin gıda üretimi ve çevresel prosedürlerden gıdalara girişini arttırmakta ve yaygınlaştırmaktadır. *Listeria* türlerinin psikrotrofik doğasından dolayı, bütün türler buzdolabı derecelerinin de dahil olduğu tüm derecelerdeki yiyeceklerde üreyebilme özelliğine sahiptirler. Bu yüzden yaygın ve tekrarlayan *Listeriozis* vakaları pastörize süt, peynir, sebze salataları ve et ürünleri gibi işlenmiş farklı gıdalarda görülmektedir.1985 yılında ABD ve İsviçre' de *L. monocytogenes* bulaşmış taze peynir ürünlerinin tüketilmesine bağlı olarak ölümlerin görülmesi bu bakteriye önem verilmesine neden olmuştur. *L. monocytogenes*'in neden olduğu hastalıklar grip benzeri rahatsızlıklardan başlayıp menenjitte kadar değişen pek çok şekilde görülür. Septisemi, hamilelerde düşük yapma ve ölü doğum *L. monocytogenes* 'in semptomları olarak karşımıza çıkmaktadır (Farber ve Peterkin, 1991). *L. monocytogenes*, sporadik ve epidemik *listeriosis* vakalarının nedeni olan gıda kaynaklı bir patojendir (Farber ve Peterkin, 1991). Özellikle çocuklar, yaşlılar ve immunsupresif hastalar (özellikle kanserli, AIDS'li ve şeker hastalığı bulunan) risk grubu içinde yer almaktadırlar (Paul ve ark 1994). *Listeriozis* düşük insidansa sahip olmasına rağmen, % 20-30 oranlarında ölüme sebebiyet vermektedir ve insanlar için büyük bir sorun teşkil etmektedir (Skogberg ve ark 1992).

Listeria türleri çiğ ve işlenmemiş gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Schlech 2001). Çiğ sebze, çiğ süt, peynir ve taze ve dondurulmuş etler gibi gıdalar, üretildikleri tesisler ve üretim şartları nedeniyle *L. monocytogenes* ile kontamine olabilmektedir. Soğuk parçalar veya hazır etler, peynirler ve diğer süt ürünleri gibi yenmeye hazır gıdalar da kontaminasyon için ideal kaynaklardır (Bortolussi 2008). *L. monocytogenes* vakumlu olarak paketlenmiş gıda ürünlerinde de üreyebilmektedir (Henning ve Cutter 2001). Bu patojenin en yüksek insidansı kırmızı ve beyaz etler ile deniz ürünlerinde oluşmaktadır (Farber ve Peterkin 1991). *L. monocytogenes* kontaminasyonu, özellikle kırmızı et, kanatlı eti, deniz ürünleri ve süt ürünleri gibi gıdaların piyasadan toplanmasına neden olan önemli mikrobiyolojik etkenlerden biridir (Jemmi ve Stephan 2006).

Listeria cinsi, gram pozitif spor oluşturmeyen bakteri grubudur. DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına göre Listeria cinsi içinde 7 türün bulunduğu ortaya çıkarılmıştır: Bunlar içinde sadece *L. monocytogenes* insanlara patojendir. Diğer türler olan *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* (*L. grayi subs. grayi*) ve *L. murrayi* (*L. grayi subs. murrayi*) insanlara patojen değildir, sadece *L. ivanovii* farelere patojendir. *L. monocytogenes*'in patojen olan ve olmayan tipleri vardır. Bunlardan patojen olmayanlar *L. innocua* türü içinde toplanmışlardır (Rocourt ve ark 1982, Rocourt ve ark 1983). Bu türler içinde *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* hemolitik türlerdir ve insan patojenitesi ile ilişkilidirler (Jacquet ve ark 1992). Gıda kaynaklı listeriosis vakalarının içerdiği türlerin başında *L. monocytogenes* gelmektedir. Nadir olarak da patolojik olaylarda *L. ivanovii*, bazı meningitis vakalarında da *L. seeligeri*'nin izole edildiği bildirilmektedir (Lovett ve Twedt 1988). *L. monocytogenes*'in geniş çaplı epidemilerde görülmesinde kontamine gıdalar önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle bu gıdalar içinde taze sebzeler, süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri önemli bir yer tutmaktadırlar (Schuchat ve ark 1991).

Listeria türleri, fakültatif anaerobik, 0.4-1.5 mm ebatlarında, spor oluşturmeyen, kapsülsüz ve 10-25 °C'lerde hareketli basillerdir (Rocourt 1994). Listeria türleri doğada çok yaygındır. Listeria türleri çevresel kaynaklardan, topraktan, akarsu ve göllerden, su, lağım, silaj örneklerinden, taze sebze ve meyvelerden, insan ve hayvan dışkılarından izole edilebilmektedir. Doğada bu bakterinin bitkilerde saprofit olarak bulunduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bitkisel ve hayvansal gıdalarda Listeria bulunması bir anlamda kaçınılmazdır. Bu nedenle özellikle ruminantlar *L. monocytogenes*'in seyrinde fekal-oral siklusunda önemli bir rol oynamaktadırlar (Fenlon 1999).

Gıdalarda Listeria aranması veya sayılması üzerinde pek çok çalışmalar yapılmasına karşın Listeria halen gıda mikrobiyolojisinde en zor belirlenen bakteriler arasındadır. Bunun nedeni Listeria 'nın gıdalarda çoğu kez az sayıda olmasına karşın çok sayıda refakatçi bakteri ile birlikte olmasıdır. Listeria türleri öncelikle selektif katı besiyerlerinde oluşturdukları tipik koloniler ile tanımlanırlar. Daha sonra ise biyokimyasal ve serolojik testler ile doğrulama ve/veya tür tayini yapılır. Parantez içindeki + ve - işaretleri Listeria için reaksiyon sonucu olmak üzere cins bazında doğrulama için hareket (+), oksijen gereksinimi (fakültatif), 35 °C'de gelişme (+), katalaz (+), H₂S (-), glikozdan asit oluşturma (+), MR (+), VP (+), indol (-), sitrat (-), üre (-) testleri yapılabilir. Cins doğrulaması yapıldıktan sonra *L. monocytogenes*, hemoliz, ramnoz ve ksiloz testleri ile diğer türlerden ayrılır. Listeria tanımlanmasında en yaygın olarak kullanılan testlerden birisi de CAMP testidir (Holt ve ark 1994).

Birçok bakteriyel patojeni tanımlamak için kullanılan geleneksel yöntemler etkenlerin selektif besiyerlerinde veya hücre kültürlerinde üretilmeleri ve daha sonra da fenotipik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla biyokimyasal testlerin yapılmasına dayanmaktadır. Bu klasik yöntemler, oldukça yavaş ve zahmetlidir. Hayvanlara ait infeksiyöz hastalıkların önemi, onların ulusal ekonomi üzerine olan olumlu ya da olumsuz etkilerine dayanmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal patojenleri tanımlamak için daha duyarlı, daha özgül ve daha hızlı yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Tam amacıyla birçok faydalı nükleik asit problemleri ve immünojenik tanı yöntemleri geliştirilmiştir, ancak bu tekniklerin birçok eksiklikleri mevcuttur. *Listeria* ciddi ekonomik kayıplara neden olan daha da önemlisi insan sağlığını tehdit eden organizmalardır. İnsanlara bulaşması daha çok süt ve süt ürünleri ile olmaktadır. Bu ürünlerin insanlara ulaşmadan önce gerekli kontrollerinin yapılması çok önemlidir. Klasik tanımlama yöntemleri uzun, güvenilirliği sınırlı ve maliyeti daha yüksektir. Çabuk bozulan ürünler olduğu için bu testlere ayrılan zamanın kısa ve kolay olması gerekir. Moleküler tekniklere dayanan yöntemlerin başında gelen PCR, en iyi bilinen ve adapte olabilen, son zamanlarda kullanımı yaygınlık kazanmış bir tekniktir. DNA sekanslarını büyütme, uzunluğunu küçültme veya çıkarma, zenginleştirme ve mikro organizmalardan izolasyon etmede kullanılabilir. Ayrıca hızlı ve güvenilir sonuçlar için tercih edilmektedir (Kwok ve Higuchi 1989).

Abay ve Aydın (2005) tarafından Sivas ilinin Gemerek ilçesindeki süt sığırcılığı yapılan özel bir işletmeye ait sağlıklı sığırlardan 2002 yılının Ekim ve 2003 yılının Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında alınan 100'er adet (Toplam 400 adet) dışkı örneklerinde *Listeria* spp. varlığı araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, ilk izolasyonda Ekim ayında 100 dışkı örneğinden, 52'si (% 52), Ocak ayında 55'i (% 55), Nisan ayında 31'i (% 31) ve Temmuz ayında 30'unun (% 30) *Listeria* spp. yönünden pozitif bulunduğu ve bu pozitif numunelerden Ekim, Ocak, Nisan ve Temmuz aylarında sırasıyla 7, 7, 4 ve 3 tanesinden *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmiştir.

Öcal ve arkadaşları (2008) yaptıkları bir çalışmada, 100 ineğe ait örneklerin serolojik incelemesinde; brusellozis'in % 19, listeriozis'in % 37 ve toksoplazmozis'in % 53 oranında seropozitif olduğu tespit etmişlerdir.

Rawool ve ark (2007) tarafından Hindistan'da yapılan çalışmada, mastitisli 169 inek ve 74 bufalodan alınan süt örnekleri incelenmiş, inek süt örneklerinden (%0.6) ve bufalo süt örneklerinden (%1.4) 1'er örnekte *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Çalışmadaki bulgular ile Rawool ve ark'ın bulguları paralellik göstermektedir. Hindistan'da süt ineklerinden toplanan 2060 süt örneği ile yapılan diğer bir çalışmada ise, 139 (%6.74) *Listeria* spp. izolasyonu

sağlanırken, *L. monocytogenes* izolasyonu 105 (%5.1) olmuştur (Kalorey ve ark 2008). Parihar ve ark (2007) tarafından Hindistan'da yapılan çalışmada sütbesiciliği yapılan çiftliklerden sağlanan 123 süt örneği *Listeria* spp. yönünden analiz edilerek, 30'undan (%24.4) *Listeria* spp. izole edilmiştir. İdentifikasyon sonucunda bunların, 22'sinin (%17.87) *L. monocytogenes*, 4'ünün (%3.25) *L. seeligeri*, 2'sinin (%1.63) *L. innocua* ve 2 (%1.63)'sinin *L.welshimeri* olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında Hindistan'da gerçekleştirilen bu çalışmada oldukça yüksek oranda izolasyon sağlanmıştır.

Holko ve ark (2002) 60 peynir ve 30 çiğ süt örneğini kültürel ve Nested PCR yöntemiyle incelemişler; kültür yöntemi-24 saatlik zenginleştirme sonrası 12, 48 saatlik zenginleştirme sonrası 18 pozitif sonuç alınırken PCR ile de 18 örneğin pozitif tespit edildiğini bildirmişlerdir. Kültür yönteminde işlemler 5-10 gün sürmekte oysa PCR iki gün gibi kısa bir sürede sonuçlanmaktadır.

Kültürel yöntemlerle izole ve tanımlanmış 16 *Listeria* izolatının PCR yöntemi ile, 27S, 14V, 19V, 242V ve 244V numaralı izolatları (%31.25) pozitif olarak tespit edilmiştir. Rawool ve ark'nın yaptıkları çalışmada izole ettikleri 5 *Listeria* izolatına iap genini hedef alan PCR uygulamışlar ve 3 izolatta pozitif sonuç almışlardır. Ayrıca virülensi belirleyen diğer genleri, *plcA*, *prfA*, *actA* ve *hlyA*'yı hedef alan PCR işlemlerinin hiçbirisinde tek başına tam pozitiflik sağlanamamıştır. Bu çalışma özellikle saha suşları ile yapılan ve virülens genlerini hedef alan PCR çalışmalarında her *Listeria* izolatında kesin pozitif sonuç alınamayabileceğini göstermektedir. PCR ile pozitifliği ispatlanamayan izolatların farklı saha suşları olabileceği veya iap geninde farklılıklar olabileceği anlaşılmaktadır.

Dümen ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada İstanbul ve Trakya bölgelerinden toplanan 300 adet süt ve 400 adet diğer süt ürünlerini *L. monocytogenes* yönünden referans yöntemler ile analiz etmişlerdir. Analiz edilen toplam 300 adet süt örneğinden 12 adedinden *L. monocytogenes* tanımlanmıştır. *L. monocytogenes* izolatlarına PCR analizi yapılmış ve örneklerin tamamı *L. monocytogenes* pozitif olarak doğrulanmıştır. İzolatların serotiplendirme prosedürü uygulanmış ve etkenlerin 4d serotipine dahil oldukları belirlenmiştir.

Çalışmamızda biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi ile tanımlanmış 11 adet *L. monocytogenes* suşunun tamamında (% 100) inlB geninin saptanması, ilgili gen diziliminin kullanılmasının saha suşlarının tespit edilmesinde oldukça faydalı ve yüksek güvenilirlik taşıdığı ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

Abay S, Aydın F. Sağlıklı sığırların dışkılarından *Listeria* spp. izolasyon ve identifikasyonu. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2005, 14 (3): 191-197.

Adzitey F, Huda N. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(25):2848-2855.

Akkoç N, Şanlıbaba P, Akçelik M. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. *EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2009, 25(2):59-70.

Anonim 1. Çiğ Süt Standardı. 1994, TS 1018, Ankara.

Anonim 2. Çiğ süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. 14.02.2000-23964 nolu Resmi Gazete, 2000, 2000/6 Nolu Tebliğ.

Anonim 3. Center for Disease Control and Prevention. Adres: <http://www.cdc.gov>, Erişim tarihi: 15.10.2016

Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Leloğlu N. Özel Mikrobiyoloji: *Listeria* İnfeksiyonları, s.110-124. Medisan Yayınevi, Ankara, 2005.

Arı İ. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Temizkan G, Arda N, editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Üçüncü Baskı. İstanbul, Nobel Kitabevleri Ltd. Şti, 2008. p. 101-09.

Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esenal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar): *Listeria* İnfeksiyonları, s.145-163. İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006.

Barbuddhe S, Hain T, Chakraborty T. Comparative Genomics and Evolution of Virulence. In: Liu D, editors. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Press, 2008. p. 311-35.

Başpınar H, Batmaz ES. Hayvancılık Bilgisi, s.5. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Eskişehir, 2006.

Baykal M. Sütte Bulunan Bakteriler. Adres: <http://www.gidacilar.net/sutte-bulunanbakteriler.html>, 2008 Erişim tarihi: 15.10.2016.

Besler H, Ünal S. Ankara'da Satılan Sokak Sütlerinin Bazı Vitaminler Açısından değerlendirilmesi ve Ev Koşullarında Uygulanan Kaynatmanın Süreye Bağlı Olarak Vitaminlere Olan Etkisi. IV Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Bildiri Kitabı, 2006.

Bessesen MT, Luo Q, Rotbart HA, Blaser MJ, Ellison RT. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56:2930-2932.

Bhunia AK. Foodborne Microbial Pathogens. First Edition. New York, Springer Science Business Media, 2008. p. 165-82.

Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 22:153-158.

Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, s.257. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1993.

Blowey R, Edmondson P. Mastitis control in dairy herds. An Illustrated Practical Guide. Farming Press Books. Ipswich, 1995.

Boerlin P, Piffaretti JC. Typing of Human, Animal, Food, and Environmental Isolates of *Listeria monocytogenes* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57(6):1624-29.

Bortolussi R. Listeriosis: a primer. *Canadian Medical Association Journal*, 2008, 179(8): 795-797.

Breer C, Schopfer K. Listeria and food. *Lancet*, 1988, 2:1022.

Brehm-Stecher B, Johnson EA. Rapid Methods for Detection of Listeria. In: Ryser ET, Marth EH, editors. Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition, New York: CRC Press, 2007. p. 257-81.

Brown TA. Essential Molecular Biology: A Practical Approach, p.47-68. Oxford University Press, New York, 1991.

Cherry WB, Moody MD. Fluorescent-Antibody Techniques in Diagnostic Bacteriology. *Bacteriology Reviews*, 1965, 29(2):222-50.

Ciulla TA, Sklar RM, Hauser SL. A simple method for DNA purification from peripheral blood. *Analytical Biochemistry*, 1988, 174: 485-488.

Coşkun M, Akyüz N, Bakırcı İ. Süt ve Mamullerinin Toplumumuzun Beslenmesindeki Yeri ve Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1990, 1(1); 166-173, Van.

Coşkun M. Farklı Metotlarla Üretilen Otlu Peynirlerde Olgunlaşma Süresi Boyunca Meydana Gelen Değişmeler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 1995, Van.

Curtis GDW. Listeria/Detection by Classical Cultural Techniques. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology, First Edition, Academic Press, 1999. p. 1199-1207.

Çağlar A, Tunçtürk Y, Bakırcı İ. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan *Listeria monocytogenes*'in Patojenitesi ve Önemi. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. p. 86-103, 2000, Tekirdağ.

Çelik S, Temiz A. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyon Yöntemleri. *Gıda*, 1991, 16(3):183-88.

De S, Singh RK, Gupta PK, Palia S, Butchaiah G. Genotyping of dairy animals using DNA from milk somatic cells. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2000, 70 (9):944-946.

Devrim AK, Kaya N. RAPD Tekniği ve Biyokimya Alanında Kullanımı. *KÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2006, 121:97-101.

Dhanashree B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Typing of *Listeria monocytogenes* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. *Indian Journal of Medical Research*, 2003, 117:19-24.

Donnelly CW, Nyachuba DG. Conventional Methods to Detect and Isolate *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Third Edition. New York: CRC Press, 2007. p. 215-56.

Dümen E, Issa G, İkiz S, Bağcıl F, Özgür Y, Kahraman T, Ergin S, Yeşil O. Determining existence and antibiotic susceptibility status of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products, serological and molecular typing of the isolates. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2011, 17:111-119.

EFSA (European Food Safety Authority). The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 2010, 8(1):1496.

Eld K, Danielsson –Tham ML, Gunnarsson A, Tham W. Comparison of a Cold Enrichment Method and the IDF Method for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Animal Autopsy Material. *Veterinary Microbiology*, 1993, 36(2):185-89.

Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Ankara, 2007.

Farber JM, Peterkin PL. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiology Reviews*, 1991, 55: 476-511.

Fenlon DR. *Listeria monocytogenes* in the Natural Environment, s. 21-37. Marcel Dekker Inc, New York, 1999.

Fox PF, McSweeney PLH. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional Publishers, London, 1998.

Fugett EB, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as well as Widely Distributed PFGE Types. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(3):865-73.

Furrer B, Candrian U, Hoefelein C, Luethy J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 40:372-379.

Gahan CGM, Collins JK. Listeriosis: biology and implications for the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 1991, 4:89-93.

Golsteyn T, King EJ, Burchak RK, Gannon VPJ. Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57:2576-2580.

Gönç S, Kılıç S. Beyaz Peynirde *L. monocytogenes* Patojeninin Aranması Üzerine Bir Araştırma. *Gıda*. 2002, 27: 425-429.

Graves LM, Swaminathan B, Hunter SB. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, London, New York: CRC Press, 2007. p. 283-305.

Güven M. İnek, Koyun ve Keçi Sütlerinden Üretilen ve Farklı Materyallerde Olgunlaştırılan Tulum Peynirlerinin Özellikleri Üzerinde Karşılaştırmalı Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 1993.

Henning WR, Cutter C. Controlling *Listeria monocytogenes* in small and very small meat and poultry plants. Adres: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/Nis/Outreach/Listeria.html>, 2001, Erişim Tarihi: 28.04.2016.

Hird DW, Genigeorgis C. Listeriosis in food animals: clinical signs and livestock as a potential source of direct (non-foodborne) infection for human, s.31. Elsevier, Amsterdam, 1990.

Hitckins AD. *L. monocytogenes*. Chapter 10. In: FDA Bacteriological Analytical Manual Online. 2003, Erişim adresi: <http://www.cfsan.fda.gov>, Erişim tarihi: 07.11.2016.

Hof H. History and Epidemiology of Listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 35: 199-202.

Holko I, Urbanova J, Kantikova M, Pastorova K, Kmet V. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. *Acta Veterinaria Brno*, 2002, 71:125-131.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams TS. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, s.566-567. William and Wilkins, Baltimore, USA, 1994.

İşleyici Ö, Sancak YC. Süt ve Süt Ürünlerinde Listeria Problemi ve İzolasyon Yöntemleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. p. 422-31, 2000, Tekirdağ.

Jacquet C, Aubert S, Elsolh N, Rocourt J. Use of rRNA Gene Restriction Patterns for the Identification of *Listeria* species. *Systematic Applied Microbiology*, 1992, 15:42-46.

Jeanpierre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(22): 9611.

Jeffers GT, Bruce JL, McDonough PL, Scarlett J, Boor KJ, Wiedmann M. Comparative Genetic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Human and Animal Listeriosis Cases. *Microbiology*, 2001, 147: 1095-104.

Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue scientifique et technique-Office International des Epizooties*, 2006, 25(2): 571-580.

Johns MB, Paulus-Thomas JE. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Analytical Biochemistry*, 1989, 180: 276-278.

Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB. *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. *Journal of Food Control*, 2008, 19:109-112.

Kehrli ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77: 619-627.

Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*, 1991, 44:360-365.

Kınık Ö, Gönç S, Akalın AS. Çiğ Sütte Patojen Mikroorganizmalar. Birinci Baskı. Bornova, 1998.

Koçan D, Halkman AK. *Listeria monocytogenes* ve Listeriozis. *Gıda*, 2006, 31, 3: 133-40.

Kuhn M, Goebel W. Molecular Virulence Determinants of *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, London, New York: CRC Press, 2007. p. 111-57.

Küçüköner E, Tarakçı Z. Van ve Yöresinde Üretilen Cacığın (Otlı Çökelek) Bazı Özelliklerinin Araştırılması. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Geleneksel Süt Ürünleri, Milli Produktivite Yayınları, 621:175-184, Ankara, 1998.

Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 339:237-238.

Lew AE, Desmarchelier PM. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Listeria monocytogenes* and its Application to Epidemiological Investigations. *International Journal of Food Microbiology*, 1992, 15(4):347-56.

Lipkin E, Shalom A, Khatib H, Soller M, Friedmann A. Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76: 2025-2032.

Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55:645-659.

Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, Devenish J, Yao J, Schlech W, Simor A. Comparison of Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(1): 15-19.

Lovett J, Twedt R. Listeria. Outstanding Symposia in Food Science and Technology, *Food Technology*, 1988, 8:188–191.

McSweeney PLH, Fox PF. Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Components, s.97. Springer Publishers, New York, 2008.

Merck. Singlepath Listeria. Rapid test for the detection of Listeria in foods. Erişim adresi: http://www.merckchemicals.com/singlepathlisteria/MDA_CHEM104142/p_qFGb.s1LXiIAAAEWpuEfVhTI?WF_SimpleSearch_NameOrID=singlepath&BackButtonText=search+results Erişim Tarihi: 22.09.2016.

Montgomery GW, Sise JA. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1990, 33:437-441.

Mullenbach R, Lagoda P, Welter C. An efficient salt–chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends in Genetics*, 1989, 5(12):391.

Niederhauser C, Candrian U, Hofelein C, Jermini M, Buhler HP, Luthy J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58:1564-1568.

Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2005, 2:115–129.

Oxoid. Rapid Food Tests. Oxoid Listeria Rapid Test. Erişim adresi: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=FT0401&c=UK&lang=EN. Erişim Tarihi: 22.09.2016

Öcal N, Babür C, Yağcı BB, Macun HC, Çelebi B, Kılıç S, Yağcı İP. Kırıkkale yöresinde süt sığırlarında Brusellozis, Listeriozis ve Toksoplazmozis'in seroprevalansı ve birlikte görülme sıklığı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 14 (1): 75-88, 2008.

Özgül F, Başpınar E. Keçi Sütü Somatik Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform ve Chelex 100 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 2004, 11(1): 16-20.

Palumbo JD, Borucki MK, Mandrell RE, Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Identification of Mixed-Serotype Cultures by Colony Immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(2): 564-71.

Pangallo D, Kackov E, Kuchta T, Drahovsk H. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction oriented to inlB gene. *New Microbiologica*, 2001, 24: 333-339.

Parihar VS, Barbuddhe SB, Chakurkar EB, Danielsson-Tham ML, Tham W. Isolation of *Listeria* species from farm bulk milk at the receiving dairy plant and cervico-vaginal swabs from dairy cows in Goa. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, 2007, 28 (1):1-5.

Paul ML, Dwyer DE, Chow C, Robson J, Chambers I, Eagles G, Ackerman V. Listeriosis a Review of Eighty-Four Cases. *Medical Journal of Australia*, 1994, 160:489-93.

Peiris I. *Listeria monocytogenes*, a Food Borne Pathogen. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Master Thesis, 2005.

Pinner RW, Schuchat A, Swaminathan B, Hayes PS, Deaver KA, Weaver RE, Plikaytis BD, Reeves M, Broome CV, Wenger JD. Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. *Journal of American Medical Association*, 1992, 267:2046.

Rawool DB, Malik SVS, Shakuntala I, Sahare AM, Barbuddhe SB. Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 113:201-207.

Rocourt J, Alonso JM, Seeliger HPR. Virulence Compare'e des Cinq Groupes Ge'nomiques de *Listeria monocytogenes* (sensu lato). *Annals of Microbiology*, 1983, 134:359-64.

Rocourt J, Buchrieser C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Third Edition. New York: CRC Pres, 2007. p. 1-20.

Rocourt J, Grimont F, Grimont PAD, Seeliger HPR. DNA Relatedness Among Serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato. *Current Microbiology*, 1982, 7:383-88.

Rocourt J. *Listeria monocytogenes* the state of the science. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 1994, 14:70-82.

Rossen L, Holmstrom K, Olsen JE, Rasmussen OF. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, 14:145-152.

Saiki KR, Gelfand HD, Stoffl S, Scharf JS, Higuchi R, Horn TG, Mullis BK, Erlich AH. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase. *Science*, 1988, 239:487-494.

Saunders BD, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Third Edition. New York: CRC Pres, 2007. p. 21-53.

Schlech WF. Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 31(3): 770-775.

Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1991, 4:169-83.

Skogberg K, Syrjanen J, Jahkola M, Renkonen OV, Paavonen J, Ahonen J, Kontiainen S, Ruutu P, Valtonen V. Clinical Presentation and Outcome of Listeriosis in Patients with and without Immunosuppressive Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 1992, 14: 815-21.

Starbuck MAB, Hill PJ, Stewart GSA. Ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 1992, 15:248-252.

Swaminathan B, Matar GM. Molecular Typing Methods. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. First Edition. Rochester: Mayo Foundation Pres, 1993. p. 26-50.

Tayar M, Şen MKC. Hayvansal Ürünler Teknolojisi, s.60-67. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Eskişehir, 2007.

Uysal HK, Anđ Ö. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen *Listeria* Türleri, s.163-169. İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, İstanbul, 2003.

Ünal RN, Besler HT. Beslenmede sütün önemi, Klasmat Matbaacılık, Ankara, 2008: 13-18.

Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, Perdue ML. Subtyping *Listeria monocytogenes* from Bulk Tank Milk Using Automated Repetitive Element–Based PCR. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(12):2707-12.

Wagner M, Bubert A. *Listeria*/Detection by Commercial Enzyme Immunoassays. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*, First Edition, Academic Pres, 1999. p. 1207-14.

Wagner M, McLauchlin J. Biology and Pathogenicity, Biology. In: Liu D, editors. *Handbook of Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Pres, 2008. p. 3-25.

Weber A, Potel J, Schafer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. Investigations on the occurrence of *L. monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. *Zentrabl Hygiene Umweltmed*, 1995, 198:117-23.

Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri. Erişim adresi: <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/149.pdf>. Erişim Tarihi 2016.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı: SAYIN, Melih

Uyruk: T.C

Doğum yeri ve tarihi: Ankara 01.07.1977

Telefon: 5325481078

E-mail: melsay77@mynet.com

Yabancı Dil: İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	07/2007
Lisans	AÜ Veteriner Fakültesi	08/2000
Lise	Aydın Lisesi	07/1994

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2001-2016	TSK	Subay/Binbaşı