

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN İLİ TULUM PEYNİRLERİNDE  
*LISTERIA* SPP. İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU**

**Hazırlayan  
Mustafa Gürkan AZAK**

**Danışman  
Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Haziran 2011  
KAYSERİ**

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN İLİ TULUM PEYNİRLERİNDE  
*LİSTERİA* SPP. İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU**

**Hazırlayan  
Mustafa Gürkan AZAK**

**Danışman  
Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi  
tarafından TSY-10-3098 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2011  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı: Mustafa Gürkan AZAK**

**İmza :**

## YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Erzincan İli Tulum Peynirlerinde *Listeria* spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Mustafa Gürkan AZAK



Danışman

Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ



Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr.Fuat AYDIN

Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ danışmanlığında Mustafa Gürkan AZAK tarafından hazırlanan "Erzincan İli Tulum Peynirlerinde *Listeria* spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erziyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

16 06 2011

#### JÜRİ

Üye : Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Üye : Doç. Dr. Semih GÜMÜŞSOY

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ



#### ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve .....kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve eğitimim süresince bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan tez danışman hocam ERÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ'a laboratuvar çalışmalarım ve tezimin hazırlanması esnasında sonsuz destek ve katkılarından dolayı Dr. Zafer CANTEKİN'e, değerli arkadaşım Necati ÖZPINAR'a ve araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarım: Prof. Dr. Fuat AYDIN, Doç Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY, Yard. Doç. Dr. Seçil ABAY'a ve tez projemi destekleyerek maddi olanak sağlayan ERÜ Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında manevi destek ve anlayışlarını esirgemeyen eşim Zeynep AZAK ve kızlarım Çağla, Damla ve Doğa AZAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Mustafa Gürkan AZAK**

**Kayseri, Mayıs 2011**

# ERZİNCAN İLİ TULUM PEYNİRLERİNDE *LİSTERİA* SPP. İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

Mustafa Gürkan AZAK

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2011

Danışman: Prof.Dr. Hüseyin KILIÇ

## KISA ÖZET

Bu çalışmada, Erzincan ilinde üretilen ve satışa sunulan, Erzincan Tulum Peynirlerinin, *Listeria monocytogenes* varlığı yönünden konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla 100 adet tulum peyniri materyal olarak kullanılmıştır. *Listeria* spp. izolasyonunda ISO 11290-1/A1-2004 metodu kullanılmıştır. Elde edilen *Listeria* spp. izolatlarının genus ve tür düzeyinde identifikasyonu ise sırasıyla *iap* gen bölgesi ve *listeriolysine* gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda tulum peynir örneklerinin 3'ü (% 3) *Listeria* spp. yönünden pozitif olarak saptanmış ve izolatların tamamı PZR ile *L. monocytogenes* olarak identifiye edilmiştir.

Bu çalışmada, Erzincan ilinde, önemli bir tüketim potansiyeline sahip Erzincan Tulum Peynirlerinde *L. monocytogenes* varlığının saptanması sebebiyle bölgede etkenle bulaşık tulum peyniri tüketiminin, halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Peynir, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, PZR

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *LISTERIA* SPP. FROM TULUM CHEESE  
OF ERZİNCAN CITY AND REGION**

**Mustafa Gürkan AZAK**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Veterinary Microbiology**

**M.Sc. Thesis, June 2011**

**Supervisor: Prof.Dr. Hüseyin KILIÇ**

**ABSTRACT**

The aim of this study is to investigate *Listeria monocytogenes* existence in Erzincan Tulum Cheese produced and sold in Erzincan city by conventional and molecular methods

For this purpose, 100 Tulum Cheese specimens are used as a starting material. The isolation of *Listeria* spp. was done by using ISO 11290-1/A1-2004 method. The genus and species level identification of obtained *Listeria* spp. isolates were performed by Polimerase Chain Reaction using specific primers in *iap* and *listeiolysine* gene region, respectively. In the light of the search results, 3 % of the analyzed Tulum Cheese specimens were found as *Listeria* spp. positive and all of these isolates were identified as *L. monoytogenes* by using PCR.

In this work, the existence of *L. monocytogenes* were determined in Erzincan Tulum Cheese which has high consumption potential in Erzincan territory, therefore it is concluded that the consumption of infection carrying Tulum Cheese can generate risk in public health.

**Keywords:** Cheese, *Listeria* spp., *L. monoytogenes*, PCR



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK .....	i
KABUL ONAY SAYFASI .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT... ..	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. TARİHÇE .....	3
2.2. <i>LİSTERİA</i> SPP. ....	4
2.2.1. Taksonomi .....	4
2.2.2. Morfoloji .....	4
2.2.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.2.4. Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) Testi .....	6
2.2.5. Virulens Faktörleri .....	6
2.2.6. Epidemiyoloji .....	7
2.2.7. Doğal Yaşam Yerleri.....	8
2.2.8. Tarımsal Alanlar .....	9
2.2.9. Gıdaların Bulunduğu Çevreler ve Gıdalar Arasındaki İlişkiler .....	11
2.2.10. Hayvanlarda Listerialar .....	11
2.2.11. İnsanlarda Listerialar .....	12
2.3. <i>LİSTERİA</i> TÜRLERİNİN İZOLASYONU.....	13
2.3.1. FDA BAM ve ISO 11290.....	14
2.3.2. USDA/FSIS ve AOAC/IDF.....	14
2.3.3. Kromojenik Besiyerleri .....	15

**Sayfa no**

2.4. MOLEKÜLER YÖNTEMLER .....	15
2.4.1 DNA Hibridizasyonu .....	15
2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	15
2.4.3. Tiplendirme .....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
3.1. GEREÇ .....	17
3.1.1. Örneklerin Toplanması.....	17
3.1.2. Standart Suş.....	17
3.1.3. <i>Listeria</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar .....	17
3.1.4. Primerler.....	19
3.2. YÖNTEM.....	20
3.2.1. <i>Listeria</i> spp. İzolasyonu .....	20
3.2.2. <i>Listeria</i> spp. İdentifikasyonu .....	20
3.2.2.1 Fenotipik Testler .....	20
3.2.2.2 <i>Listeria</i> Rapid Test .....	21
3.2.2.3 Moleküler Testler .....	22
3.2.2.4. Agaroz Jel Elektroforez.....	24
4. BULGULAR .....	25
4.1. İZOLASYON SONUÇLARI .....	25
4.1.1. <i>Listeria</i> spp. İzolasyonu .....	25
4.2. LİSTERİA RAPİD TEST.....	26
4.3. LİSTERİA SPP. İDENTİFİKASYONU .....	26
4.3.1. Moleküler Analiz Sonuçları.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
6. KAYNAKLAR .....	34
ÖZGEÇMİŞ	

**KISALTMALAR**

MR/VP	: Methyl Red/Voges Proskauer
TSA	: Tryptic soy agar
CAMP	: Christie, Atkins, Munch-Petersen
<i>inlA</i>	: İnternalin A
<i>inlB</i>	: İnternalin B
<i>hly</i>	: Haemolysin
LEB	: Listeria Enrichment Broth
FB	: Fraser Broth
UVM	: University of Vermont Medium
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 4.1.</b> <i>Listeria</i> spp. İzolasyon Sonucu.....	25
<b>Tablo 4.2.</b> <i>Listeria</i> spp. İzolatlarının <i>Listeria</i> Rapid Test Sonucu.....	26
<b>Tablo 4.3.</b> Moleküler Analiz Sonucu.....	26
<b>Şekil 4. 1 :</b> <i>Listeria</i> Selektif Agar' da <i>Listeria</i> spp.Görünümü .....	27
<b>Şekil 4. 2 :</b> <i>Listeria</i> Selektif Agar' da <i>Listeria</i> spp.Görünümü .....	27
<b>Şekil 4.3 :</b> <i>Listeria</i> Rapid Test kiti pozitif örnek.....	28
<b>Şekil 4.4 :</b> <i>Listeria</i> spp. İzolatlarının PCR ile Doğrulanması .....	28
<b>Şekil 4.5 :</b> <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının PCR ile Saptanması.....	29

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Peynir üretimi süt endüstrisinde en fazla çeşitlilik gösteren alanı oluşturmaktadır. Günümüzde sayısı binlerle ifade edilen peynirin, ülkemizde elliye aşkın çeşidinin bulunduğu tahmin edilmektedir. Söz konusu ürünlerin bir kısmı unutulmaya yüz tutmuş, bir kısmı ise aile tipi işletmelerde üretilerek yöre pazarlarında satılmak suretiyle ayakta kalmayı başarmıştır (1, 2).

Tulum peyniri zengin bir protein, yağ, kalsiyum ve fosfor kaynağı olmasının yanı sıra, özellikle ulaşım imkanlarının sınırlı olduğu bölgelerde sütün yerinde değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır. Ülkemizde üretilen peynirler içinde önemli bir yeri olan tulum peyniri, üretim miktarı bakımından beyaz peynir ve kaşar peynirinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Tulum peynirleri üretim bölgelerine göre Erzincan (Şavak), Dicle ve Çimi tulum peynirleri gibi değişik yöresel isimlerle anılmaktadır (3).

Peynirler yararları yanı sıra, yüksek besin içerikleri ile olumsuzluklara da yol açan mikroorganizmalar için iyi bir besin ortamıdır. Önemli besinlerimizden birini teşkil eden peynirler çeşit, ambalajlama ve saklama durumlarına göre az veya çok mikroorganizma yükü bulundurabilirler. Patojen *Listerialar* özellikle de *L. monocytogenes* hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalık oluşturduğundan önemli

zoonoz hastalıklardan kabul edilmektedir. *Listerialar* doğada, gıdalarda, insanlar, hayvanlar ve bitkilerde bulunurlar. *Listeriaların* saprofit olarak yaşadıkları yerler çürümüş bitki yığınları olup, aynı zamanda onların doğal yaşam çevreleridir. Ayrıca nemli ve kuru çevre şartlarında, toprak ve bitkilerde aylarca canlı kalabilirler (4,5). Günümüzde *Listeriaların* insanlara ve hayvanlara daha çok gıda kaynaklı olarak bulaştıklarına dair yaygın bir kanı bulunmaktadır. Ancak *Listerialar*, vertikal, zoonotik, nosokomial gibi farklı yollardan kolaylıkla bulaşabilmektedir (6).

Patojen *Listeriaların* insanlara bulaşması, tarımsal alanlardan, diğer çevrelerden ve gıdalardan alınmaları ile olur. Ancak bunlar arasında çoğunlukla gıdalar, özellikle iyi pişirme işlemi uygulanmamış olan ve hazır yiyecekler önem taşımaktadır. *Listerialar* başta süt ve süt ürünleri olmak üzere et ve et ürünleri gibi hayvansal gıdaların yanı sıra sebze ve salatalar gibi bitkisel gıdalardan da bulaşabilmektedir. Patojen *Listeriaların* gıdalarla bulaşabilmesi için yüksek dozlarda alınması gerekmektedir ( $>10^9$ ). Ancak bazen yüksek dozlarda alınmalarına rağmen bağışıklığa bağlı olarak hastalık oluşmamaktadır. Her ne kadar insanlarda *Listeria* vakalarına diğer hastalıklara nispeten az rastlanılsa da geçmişte *Listeria* salgınları belirlenmiştir (7). İnsanlarda Listeriozis, meningitis, sepsis ve erken ölü doğumlarla karakterize bir hastalık oluşturur. Geçmişte belirlenen en büyük salgınlardan birisi Amerika Birleşik Devletlerinde 142 kişinin ölümü ve 93 ölü doğum vakasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (8).

Erzincan Tulum Peynirleri bölgede yoğun olarak tüketilmektedir, özellikle son yıllarda diğer bölgelerimizde de tanınmaya başlanmış ve bu peynire talep artmıştır. Buna bağlı olarak da eskiden sadece çiftçiler tarafından geleneksel olarak üretilirken günümüzde tulum peyniri üretimi amacıyla daha büyük işletmeler açılmıştır ve Erzincan Tulum Peyniri bölge halkı açısından önemli bir ekonomik kazanç yolu olmuştur.

Bu çalışmada, Erzincan bölgesinde, önemli bir tüketim potansiyeline sahip Erzincan Tulum Peynirlerinde, halk sağlığı açısından risk oluşturan önemli patojenler arasında yer alan *Listeria monocytogenes* varlığının incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TARİHÇE

*Listerialar* ilk olarak Almanya’da 1891’de hasta hayvanlardan izole edilmiştir. Bunun ardından ise İsveç’te 1911 yılında bir tavşanın karaciğerinden, 1917 ve 1920 yıllarında da hastaların omurilik sıvılarından *Listeria monocytogenes* izole edildiği bildirilmiştir. Ancak, bu bakterilerin tam olarak tanımlanması Murray, Webb ve Swann’ın 1926 yılında hamster ve tavşanlarda çıkan bir salgında etkeni izole etmeleriyle olmuştur. Murray, Webb ve Swann, buldukları küçük, Gram pozitif çomakçık şeklindeki bu bakteriyi ilk olarak “*Bacterium monocytogenes*” olarak adlandırmışlardır. Pirie, 1927 yılında Güney Afrika’da yaşayan kemirgenlerde bu Gram pozitif basillerden izole ettiğini açıklamış; bulduğu bu bakteriyi cerrah Lord Lister’in anısına “*Listerella hepatolytica*” olarak adlandırmıştır. Bu bakterinin adı 20. yüzyıl ortalarına doğru dolaşım sisteminde monositogenezis yaptığından dolayı “*Listeria monocytogenes*” olarak değiştirilmiştir ve günümüzde de bu isim kullanılmaktadır (9). *Listeria* türlerinden *Listeria grayi* 1948 de, *Listeria murrayi* 1966 yılında belirleninceye kadar uzunca bir süre *Listeria monocytogenes* tek tür olarak düşünülmüştür. İnsanlarda ilk Listeriosis vakası 1936 yılında bildirilmiştir. İlk gıda kaynaklı Listeriosis vakası ise 1953 yılında bildirilmiştir. Hastanın *Listeriaların* sebep olduğu mastitisli bir ineğin

sütünü içmek suretiyle *Listeria monocytogenes* etkenlerini almış olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca bu etkenlerin ikiz hamileliği bulunan bir annenin bebeklerinin ölü doğmasına sebep olduğu da bildirilmiştir (6). Kanada’da 1983 yılında kontamine gıdalarla insanlara bulaşan salgın hastalıkların ortaya çıkması, bilim dünyasının dikkatlerinin *Listerialar* üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur (10). *Listerialar* genusu içerisinde en iyi bilinen türler *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria İvanovii*, *Listeria grayi*dir. Ayrıca bu türlerin yanı sıra 2 adet daha yeni identifiye edilmiş tür 2009 ve 2010 yıllarında rapor edilmiştir. Bu türler *Listeria Marthi* ve *Listeria Roccurtia* dir. *Listeria Grayi* diğer *Listeria* türlerine göre son derece uzak bağlantılar içerir. *Listeria İvanovii* ve *Listeria monocytogenes*in her ikisinde memelilerde patojen iken, *Listeria İvanovii*inde nadiren ve predominant olarak ruminantlardada hastalıklara sebebiyet verdiği görülmüştür. *Listeria Monocytogenes* hayvan ve insanlarda hastalık yapan pek çok *Listeria* türüyle yakından ilgilidir. Ayrıca fakültatif bir patojen olan *Listeria Monocytogenes* toprakta ve çürümüş bitkilerde yaşayabilmektedir. Fakat onun bir kez hayvana yada insana konak olarak girmesi gereklidir. Bundan dolayı şiddetli hastalıklara sebebiyet verebilir. Sağlıklı bireylerde nadiren kontak invaziv listeriosisler görülüyor iken kontak listeriosis için yüksek risk grubu oluşturanlar yaşlı , bebek, hamile bayanlar ve immün sistem yetersizliği olan bireylerdir.

## **2.2. LİSTERİA SPP**

### **2.2.1. Taksonomi**

*Listerialar* Taksonomide, Brochotrix cinsine oldukça yakındır. Son yıllarda yapılan 16S ribozomal RNA çalışmaları *Listeriaların* sınıflandırmada Lactobacilluslar ile Bacilluslar arasındaki yeri işgal ettiğini göstermiştir. Bilim adamları tarafından Brochotrixler ile yakın genetik ilişkide oldukları ve böyle sınıflandırmaları gerektiğine kanaatine varılmıştır (11). Günümüzde taksonomide *Listeria* genusu içerisinde en iyi bilinen türler *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L.ivanovii*, *L. grayi*’dir (12). Bu türlerden *L. monocytogenes*, *L.ivanovii* ve *L. innocua* patojen türlerdir. *L. ivanovii* ve *L. innocua*’nın hayvanlar için patojen olduğu bildirilmesine rağmen, *L.ivanovii*’nin insanlarda nadiren hastalıklardan izole edildiği bildirilmiştir. *L. grayi*, *L.grayi subsp. murrayi* ve *L.grayi subsp. grayi* ve *L.ivanovii* de *L. inanovii subsp. ivanovii* ve



*L.ivanovii subsp. iondiniensis* olmak üzere ikişer alt türe sahiptirler. *Listeria monocytogenes* hem insanlar hem hayvanlar için *Listerialar* arasında en önemli patojen tür olarak kabul edilir. Ayrıca *L. monocytogenes*'in, gıda kaynaklı patojen bakteriler arasında da en önemlilerinden biri olduğu ve pek çok kaynakta bildirilmektedir (13).

*Listerialar* tabiatта yaygın olarak bulunmalarından dolayı, sütlere, gıdalara ve yem bitkilerine kolaylıkla bulaşabilmektedir. Bu sebeple *Listeria* enfeksiyonlarında bulaşma kaynağının tespitini yapabilmek oldukça güçtür (13).

### 2.2.2. Morfoloji

*Listerialar*, 0.5-2 µm x 0.4-0.5 µm boyutlarında, gram pozitif ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır. Mikroskopik görünimleri sporsuz, çomakçık şeklindedir (13,14). Hareket kabiliyetlerini 20-28 °C sıcaklıklarda gösterirken, 35-37 °C derece sıcaklıkta ise hareket yeteneklerini kaybetmektedirler. Taze kültür ortamlarında Gram pozitif olarak görünmelerine ve kapsülleri olmamasına rağmen, bazı çalışmalarda mukopolisakkarit bir katmana sahip oldukları bildirilmiştir (15-17). Psikrotrofik mikroorganizmalar olup, 0 °C ile 45 °C (optimum 37 °C) sıcaklık aralığında çoğalabilmektedirler. Bu bakteriler için optimal su aktivitesi değeri 0.97 dir. *Listerialar* yüksek adaptasyon yeteneklerine sahip olmalarından dolayı, çok değişik ortamlarda yaşayabilmektedirler. Örneğin, yüksek tuz yoğunluklarında (%10), geniş pH (pH 4.4 - 9.4) ve sıcaklıklarda hayatta kalabilmektedirler (9).

*Listerialar* yarı katı ortamlarda 37 °C de, 24 saatte düzensiz koloniler oluştururlar ve üremeleri yüzeyden 3-5 mm şemsiye benzeri bir görünüm oluşturur. *Listerialar*, nutirent agarda 24-48 saatlik inkubasyonlarda, 0.5-1.5 mm çapında yuvarlak şeffaf, etrafı tamamen belirgin koloniler oluştururlar. Tryptic soy agarda (TSA) hem iyi ürerler hem de tipik koloniler oluştururlar. Koyun kanlı agar başta olmak üzere diğer temel besi yerlerinde de kolaylıkla üreyebilirler (9).

### 2.2.3. Biyokimyasal Özellikleri

*Listeriaların* identifikasyonunda Gram boyama, hareketlilik, üreaz, H<sub>2</sub>S, indol, oksidaz testi, Methyl Red/Voges Proskauer (MR/VP), eskülin hidrolizi, katalaz testi, glukoz, hemoliz, mannitol, cylose ve rhamnose ve Christie, Atkins and Munch-Peterson (CAMP) testleri kullanılmaktadır. *Listerialar*, Gram pozitif düzgün çomak şeklinde, üreaz, H<sub>2</sub>S, indol, oksidaz negatif, Methyl Red/Voges Proskauer (MR/VP), eskülin hidrolizi, katalaz pozitif, glukoz ve salisinden gaz oluşturmadan asit oluşturan bakterilerdir (18).

*Listerialar* 20-28 °C sıcaklıkta hareketlidirler. Bu hareketliliklerini, oda ısısında inkube edilmiş 8-24 saatlik genç sıvı kültürlerde (tryptone soya yeast extract broth) asılı damla metoduyla veya yarı katı agarda 20-28 °C de inkube edilmiş kültürlerde çıplak gözle görmek mümkündür. Yarı katı agarda hareketliliklerinden ötürü şemsiye benzeri bir alan oluştururlar *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* türleri birçok memeli alyuvar hücrelerini lize ederek, hemoliz oluşturabilirler (18).

### 2.2.4. Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) Testi

CAMP testi, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* gibi hemolitik *Listeria* türlerinin ayrımında kullanılan başlıca testtir. Bu testte β-hemolitik *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* suşu kanlı agara birbirine paralel olacak düz bir çizgi şeklinde ekilir. Şüpheli *Listeria* kültürleri de bu çizgiler dik olacak şekilde birbirine değmeden tek çizgi olarak ekilir ve 35 °C de 24-48 saat inkubasyona bırakılır. *L. monocytogenes*, *S.aureus* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur. *R. equi* tarafından herhangi bir hemoliz oluşturmaz, *L. ivanovii* ise *R. equi* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur. *L. seeligeri* ise *L. monocytogenes*'e göre daha zayıf bir hemoliz oluşturmaktadır (17,19).

### 2.2.5. Virulens Faktörleri

*L. monocytogenes*, kendine özgü özellikleri bulunan ve hücre içinde yaşayan patojen bir bakteridir. İnsan ve hayvan vücudunda oluşturulan çok çeşitli savunma ve baskı faktörlerinden kaçış mekanizmalarına sahiptir. Örneğin; bulaşmış olduğu gıdaların konakçısı tarafından alınmasıyla konakçının sindirim sisteminde proteolitik enzimlerle asidik bir pH ile (yaklaşık pH 2), safra tuzlarının etkisi ve konakçının savunma hücrelerine karşı koyabilmektedir (20).

*L. monocytogenes*, internalin ismi verilen protein yardımıyla fagositleri ve diğer tüm doku hücrelerini istila edebilme yeteneğine sahiptir. İnternalin A ve B (*inlA* ve *inlB*) proteinleri infeksiyonun başlangıçta, etkenin hücrelere tutunması ve yaşamını sürdürmesine yardımcı olan başlıca proteinlerdir. Patojen *Listeriaların* konakçı hücresine girdikten sonra ilk yaptıkları iş, tek membranlı vakuollere yerleşmektedir. Tek membranlı vakuolleri listeriolysin O proteinleri ile lize etmektedirler. LLO, haemolysin (*hly*) geni tarafından kodlanan patojen *Listeriaların* virulensini belirleyen başlıca proteindir. *Listeriaların* hücre içinde çoğalabilmesi için ortamla 1 saatlik süre yeterlidir (21).

### 2.2.6. Epidemiyoloji

Paojen *Listerialar* özellikle de *L. monocytogenes*, hem hayvanlarda hem insanlarda hastalık oluşturduğundan önemli zoonoz hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. *Listerialar*, doğada (toprak, sular, lağım suları, atık sular, gübreler), gıdalarda (yemler, otlar, silajlar, sebzeler, bitkiler, et, süt ve bunlardan elde edilen gıda ürünleri), insanlarda, hayvanlarda ve hayvanların atık yavrularında, vajinal akıntılarda, fetal membranlarda, süt idrar ve gaitalarında, çürümüş sebzeler, deniz ürünlerinde yaygın olarak bulunurlar (15-17). *Listeriaların* saprofit olarak yaşadıkları yerler yani çürümüş bitki yığınları olup, aynı zamanda onların doğal yaşam çevreleridir. Ayrıca nemli ve kuru çevre şartlarında, toprak ve bitkilerde aylarca canlı kalabildikleri görülmüştür (22). Günümüzde *listeriların* insanlara ve hayvanlara daha çok gıda kaynaklı olarak bulaştıklarına dair yaygın bir kanı bulunmaktadır. Ancak *Listerialar*, vertikal (anneden çocuğuna), zoonotik (hayvanlardan insana) nosokomial (hastane orijinli) gibi farklı yollardan kolaylıkla bulaşabilmektedir (9).

Gıda endüstrisinde yapılan çeşitli hijyen düzenlemelerinden sonra *listeriosis*'in insidensinin düştüğü görülmüştür. En yüksek enfeksiyon oranı yeni doğanlar ile 60 yaşından büyüklerde görülmektedir. Tüm vakaların %30'unu hamile kadınlar ve 10-40 yaş arasındaki insanlar oluşturmaktadır. Ayrıca, gebelikle ilgili olmayan hastaların %70'i yaşlı insanlar, yeni doğan bebekler, bağışıklık sistemini baskılayan ilaç kullananlar veya bu sistemi baskılayan bir hastalığa sahip olanlar (AIDS gibi) *listeriosis*'e daha duyarlılardır. Ancak patojen *Listerialar* tüm insanlarda hastalık

oluşturabilirler. Hamile kadınlarda, ölü doğumlara, erken doğumlara ya da abortuslara sebep olabilirler (23).

Süt, peynir, tereyağı, tütülenmiş balık, yenmeye hazır domuz eti, sosis, et, hindi eti gibi gıdalar yenerek çeşitli yıllarda bakteriyemi ve meningitis ile sonuçlanmış *Listeria* salgınları bildirilmiştir. Ayrıca yenmeye hazır gıda ürünler arasında kontaminasyonun en çok olduğu gıda grubu kanatlı ürünleri oluşturmaktadır (24).

İnsanlara gıda kaynaklı ya da diğer yollarla *L. monocytogenes* bulaşabilir. Diğer yollarla bulaşma anneden çocuğa plasenta ya da doğum kanalı yoluyla olabilir. Yeni doğan bebeklerin kontamine olmuş sularda banyo yaptırma yoluyla da *L. monocytogenes*, bulaşabilmektedir. Enfekte hayvanlara doğrudan temas ile çiftçi ve veteriner hekimlerde lokalize kutanöz enfeksiyonlar oluştuğu bildirilmiştir (25).

Listeriosis genellikle gelişmiş ülkelerde önem kazanmış bir hastalık durumundadır. İlk zamanlar *Listeriaların* buldukları yerlerin tespitine yönelik araştırmalar yapılırken, son yıllarda ise çalışmalar doğada yaşayan patojen *Listerialar* ile insanlardan izolasyonu yapılan *Listerialar* arasındaki genetik ilişkilerin araştırılmasına yönelmiştir (26).

### **2.2.7. Doğal Yaşam Yerleri**

*Listerialarda* ilgili yapılan çalışmaların büyük bölümü *Listeriaların*, gıdalar, çiftlikler ve bunlarla ilişkili yerlerden izolasyonu konularına odaklanmıştır (27). Ancak çevre ve tarımsal olmayan mekanlarda *Listeriaların* araştırıldığı çalışmalar az da olsa bulunmaktadır. Son zamanlarda tabiat veya çiftlik dışındaki çevrelerde de insan Listeriosis vakalarına rastlandığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar da tespit edilen *Listeriaların* insanlar için hastalık kaynağı olabileceği görülmektedir (25).

Welshimer ve Donker'in 1971 de yaptığı çalışmada tarımsal araziler dışındaki alanlarda ilkbahar döneminde %6 oranında *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmektedir (59). Daha sonra Güney Almanya'da yapılan başka bir çalışmada mısır bitkisinde %9.7, çimenlerde %13.3, tarım arazilerinde %12.5, tarımsal olmayan arazilerde %44, otlaklarda %15.5, ormanlarda %21.3 ve vahşi hayvanların beslendiği bölgelerde %23.1 oranında *Listeria* spp. tespit edildiği bildirilmiştir (25). Başka bir çalışmada ise topraktan hiç *L. monocytogenes* izole edilemediği bildirilmesine rağmen, silaj ile

beslenen koyun ve sığırların gezindiği bölgelerdeki topraklardan izole edildiğini ve bu bölgelerdeki toprak ve bitkilerin *L. monocytogenes* kaynağı olarak hayvanlar için önemine işaret edilmiştir.(28).

İki yıl süren tabiat ve şehirdeki alanların karşılaştırıldığı *Listerialar*la ilgili bir diğer çalışmada ise *L. monocytogenes*'in şehir alanlarındaki varlığı % 7.5, tabiattaki varlığı ise % 1.4 oranında bulunmuştur (29). *Listerialar*ın doğal yaşam çevresinin tarımsal araziler dışındaki çevre olduğunu bildiren pek çok bilimsel çalışma mevcuttur (27,28).

*Listerialar*ın toprakta 295 gün canlı kalabildiğini gösteren çalışmanın yanında bir diğer çalışmada ise steril veya steril olmayan toprakta (doğal), suda, kış şartlarında doğada - 15 °C den 45 °C'ye kadar bir sıcaklık aralığında hayatta kalabildiği ve çoğalabildiği bildirilmiştir. Örneğin, 10<sup>5</sup> cfu/ml *Listeria* bakterisi verilmiş steril bir toprakta 154 gün yaşayabilmesi, tabiata ve tarımsal alan olmayan yerlerde ne kadar uzun süre hayatta kalabildiğini göstermektedir (25).

### 2.2.8. Tarımsal Alanlar

Hayvanlarda ilk *Listeria* izolasyonundan bu yana, pek çok kez evcil ve vahşi hayvanlardan *Listeria* spp. izole edildiği bildirilmiştir. Bu hayvanlar çoğunlukla sığırlar, koyunlar ve keçiler, yani çiftlik ruminantlarıdır. Bu sebeple *Listerialar* hakkında edinilmiş bilgilerin büyük kısmı ruminantlar ve ruminant çiftliklerinde *Listerialar*ın ekolojisine ve varlığına dayalı olmaktadır. *L. monocytogenes*'in prevalansı ruminantlarda ve ruminant çiftliklerinde değişiklik göstermesine rağmen en yüksek prevalans silaj ile beslenen sığırlarda gözlemlenmiştir (30).

Çiftlik çevreleri ve çiftlik hayvanları bu sebeplerden dolayı *L. monocytogenes* için önemli bir kaynak ve potansiyel bir rezervuar olabilir (27).

Patojen *Listerialar*ın silaj yemlerindeki varlığı ve ruminantların bulunduğu çevredeki fekal bulaşması, havanlar arasında ve çiftlik çevresinde yaşayan insanlara bulaşma için en önemli sebep olarak gösterilmektedir. Patojen *Listerialar* fekal olarak kolaylıkla bitkilere ve bitkilerin bulunduğu çevreye bulaşabilir ve bu bitkiler hayvan yemi ya da insan gıdası olarak tüketilebilir (13).

Herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen pek çok sığırın dışkısında *Listerialara*, özellikle de *L. monocytogenes* bakterilerine rastlanabilir. Öte yandan küçük ruminantların dışkılarında genellikle daha az oranda *Listeria* belirlenmiş ve bunlarında silaj yemleriyle beslendiklerinde patojen *Listerialara* maruz kaldıkları bildirilmiştir(24).

İnsan Listeriosislerinde olduğu gibi hayvan Listeriosis vakalarında da gıda-yem kaynaklı, özellikle silajlanmış yemlerin tüketimine, kısmen de doğru bir şekilde fermente edilmemiş yemlere bağlı bir hastalık durumu mevcuttur. Silaj ile besleme ve fekal yolla bulaşan *L. monocytogenes*, ruminatlarda Listeriosis hastalığına sebep olan yüksek risk faktörleridir (27). Ruminantların beslenmesinde silaj yemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Eğer doğru bir şekilde fermentasyon gerçekleşmişse, silaj yemlerinde patojen *Listeriaların* ve diğer mikroorganizmaların inhibe etmeye yardımcı olan bir pH ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) vardır. Doğru bir fermentasyon yapılmamış silaj yemlerinde pH yaklaşık  $\geq 5.5$ 'tir. Bu ortamda kolaylıkla patojenler ve çürüme bakterileri çoğalabilir. Silaj yapılmadan önce mısır tarlaları, vahşi hayvanlar veya çiftlik hayvanları tarafından fekal bulaşma vasıtasıyla patojen *Listerialar* ile bulaşmış olabilir. Bu şekilde herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın mısırlardan yapılan silajda doğru bir fermentasyon oluşturulmadığı takdirde, patojen *Listerialar* yoğun olarak bulunabilir (27).

Ruminantlar dışında pek çok hayvanda veya tarım arazileri dışındaki çevrelerde yaşayan hayvan türlerinden de *Listerialar* izole edilmiştir. *Listeriaların* izole edildiği hayvanlar arasında kuş, domuz, at, kümes hayvanları ve diğer evcil havanlar, balıklar bulunmaktadır (30-32).

Ruminantların yetiştirildiği ya da diğer çiftlik hayvanlarının yetiştirildiği çiftliklerde *Listeriaların* yaygın olarak yaşamasından ve bu alanlarda yapılan gıda üretim-işleme faaliyetleri yapıldığından dolayı bu yerlerde hazırlanmış gıdalara bulaşma, bu gıdaların da insanlar tarafından tüketilmesiyle, insanlara bulaşması daha kolay olmaktadır. Örneğin *L. monocytogenes*, ile kontamine olmuş çiğ sütün tüketilmesiyle insanlara bulaşabilir. Çoğu Listerosis vakasında, tarımsal çevreden kaynaklanan bulaşmadan daha çok, çiğ olarak gıdaların tüketilmesiyle bulaşmanın olduğu bildirilmiştir. Patojen *Listeriaların* prevalansı çiğ gıdalarda % 1.1-85.7 oranlarında bulunabilmektedir (25).

İnsanlardan izole edilen *L. monocytogenes* izolatları ile topraktan, tarımsal alanlardan, hayvan dışkılarından izole edilen *L. monocytogenes*, izolatları arasında bir ilişki olduğunu, dolayısıyla tarımsal çevrenin ve çiftliklerin insan ve hayvanlardaki Listeriosis ile bir bağı olduğunu gösteren pek çok çalışmada gösterilmiştir (27,29).

### 2.2.9. Gıdaların Bulunduğu Çevreler ve Gıdalar Arasındaki İlişkiler

*Listeriaların* gıdalarda, özellikle hayvansal gıdalar ve yenmeye hazır gıdalarda bulunduğunu gösteren pek çok araştırma bulunmaktadır (13,25,33). Günümüzde ise gıdalardaki *Listeriaların* buluşma kaynağını ve hangi *L. monocytogenes* alt tipleri olduğunu göstermeye yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Moleküler tiplendirme çalışmalarında *L. monocytogenes* 1/2b ve 4b gıdalarla ilişkili izolatlarda ve insanlarda hastalık oluşturan izolatlar arasında oldukça yaygın olduğu bildirilmektedir (33). Gıda izolatları ile insanlardan izole edilen izolatlar arasında virulens genlere bakılarak yapılan (*inlA*, *iap*, *hly*, *prfA*) çalışmalarda ve tiplendirmelerde farklı *L. monocytogenes* alt tiplerinin insanlardaki Listeriosis'ten sorumlu olduğu bildirilmiştir. Gıda işleme ve perakende çevrelerden *L. monocytogenes*'in izole edildiği tiplendirme çalışmalarında insanlardaki izolatlarla bu çevrelerdeki izolatların birbirleriyle ilişkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (25).

### 2.2.10. Hayvanlarda *Listerialar*

Hayvanlarda Listeriosis çok çeşitli hastalıklar şeklinde görülmektedir. *L. monocytogenes* koyun, keçi ve sığırlarda ensefalitis, abortus, septisemi, endoftalmitis, sığırlarda mastitis, at, kedi ve köpeklerde abortus ve nadiren de olsa ensefalitis, domuzlarda septisemi *L. ivanovii* koyun ve sığırlarda abortus, *L. innocua* ise koyunlarda meningoensefalitis yapmaktadır. Kuşlar genellikle subklinik taşıyıcılar olmasına rağmen, sporadik vakalar olmasına rağmen septisemi ve meningoensefalits rapor edilmiştir. Avian Listeriosis, Salmonellosis veya viral hastalıkların sonucunda olarak ikincil olarak ortaya çıkabilir (15).

Çiftlik hayvanlarından özellikle ruminantlar, *Listeriaların* kırsal çevredeki fekal-oral siklusunda (dışkıyla kontamine olan gıdaların ağız yoluyla alınması) anahtar rol oynamaktadırlar (34). İyi fermente edilmemiş hayvan yemlerindeki patojen *Listeriaların* varlığı uzun zamanlardan beri bilindiğinden dolayı, silajlı yem ürünleriyle hayvanları

beslemek önemli düzeyde risk oluşturmaktadır (35). Ayrıca yapılan çalışmalarda sığır çiftliklerinin insan veya hayvanlardaki *Listeriaların* çevreye yayılmasında ve hastalığın ortaya çıkmasında, küçük ruminantlara göre daha etkin bir rol oynandığı bildirilmiştir (27).

Monfort ve ark. (36), kabuklu deniz hayvanlarında % 53, Barbudde ve ark. (37), Hindistan'da toplam 201 adet koyun ve keçilere ait süt ve et örneklerinde % 17.64 , Kalorey ve ark. (38), sığır sütlerinde % 6.75 oranında *Listeria* spp. varlığını bildirmiştir. Türkiye'de hayvanlarda *Listeriaların* varlığı bilim adamları tarafından bildirilmiştir. Şahin ve ark. (39), Kars ve bölgesindeki koyunlarda görülen abortlardan *L. ivanovii* izole etmişlerdir. Aygün ve ark. (40), Hatay bölgesinde 157 adet koyun sütü örneğinden % 8.23 oranında *Listeria* spp. izole ettiklerini bildirmiştir.

### 2.2.11. İnsanlarda *Listerialar*

*Listeria* spp. dayanıklı bakterilerdir, pH, sıcaklık ve tuz koşulu gibi gıda üretim sürecinde uygulanan pek çok muameleye dayanabilecek yetenektedirler ve sıklıkla insanlar kontamine olan bu gıdaları tüketerek enfekte olurlar. Bazen insan midesinde, *L. monocytogenes* asidik ortamın üstesinden gelerek bağırsaklara geçer ve vücudun diğer kısımlarına göç ederler (ör, karaciğer, dalak, beyin, fetüs ve plasentaya ait dokular gibi), burada üremeye devam ederler ve konakçıda çeşitli reaksiyonları ve klinik hastalıkları teşvik ederler. Sonuç olarak, hamile kadınlarda, listeriozis hafif grip benzeri semptomlar oluşturabilir (ateş, baş ağrısı gibi) ya da belirti vermeksizin kalabilir, sıklıkla enfekte fetüs, düşük olur (abort) ya da bebeklik döneminde neonatal listeriozis görülür (41).

Gebe olmayan ve yeterli bağışıklığı bulunmayan bireylerde, menenjit ve meningoensefalit gelişebilir. *L. monocytogenes*'in yol açtığı listeriozis yüksek oranda mortaliteye sahip olduğu bildirilmiştir (yaklaşık %30) (41).

*L. monocytogenes* enfeksiyonları genellikle sporadiktir, epidemik listeriozis salgınları zaman zaman meydana gelmektedir. İnsan listeriozisinin sezonluk olmasına rağmen hazır gıdalardan ise bakterinin sezona bağlı olmadan izole edildiği bildirilmiştir (42).



Hamile kadınlarda, %17-24 arasında klinik listeriozis görülebilmektedir ve bu listeriozisli hamile kadınların önemli kısmında (%28'den fazla) spontan abort ya da ölü doğum (gebelikte 16-35 haftalar arasında fetal kayıp olmakta) görülebilmektedir (43).

Epidemik ve sporadik listeriozis vakalarının toplam bebek ölümlerinin %20-30'sinden sorumlu tutulduğu bildirilmiştir. Enfekte anneler, belirti göstermeyebilirler ya da grip benzeri hastalığa sahip olabilirler, nadiren merkezi sinir sistemi hastalıkları gelişir. ABD'de yapılan bir çalışmada ise *L. monocytogenes* serotip 4b hamile kadınlardaki listeriozisin ortak nedeni olarak gösterilmektedir (43).

Bebeklerde doğumu izleyen ilk 48 saatte hayatta kalan listeriozisli bebeklerde sıklıkla, ağır neonatal septisemi ve menenjit gelişir, bu durum granulomatosis infantiseptica olarak bilinir, yaygın granuloamlardan oluşmuş mikroapseler ile karakterizedir ve mortalite oranı yüksektir (yaklaşık %30) (41).

### **2.3. LİSTERİA TÜRLERİNİN İZOLASYONU**

Günümüzde Lisreriaların izolasyonu yeni metotların geliştirilmesiyle oldukça kolaylaştırılmıştır. İzolasyonda dikkat edilmesi gereken durum *Listeriaların* izole edileceği ortam veya örneklerdir. Örneğin *Listerialar* steril ortamlardan alınan numunelerden örneğin; kan, beyin omurilik sıvısı, amniyotik sıvısı, plasenta yada kulak sıvıabları vb. doğrudan selektif besi yerlerine ekimi yapılarak kültürü yapılabilir. *Listeriaların* ekildikleri ortama alışabilmeleri için bir gece 35°C de inkube edilmeleri gerekmektedir. Ancak dışkı, çevresel örnekler ve gıda örnekleri izolasyon için kullanılacak olursa, selektif zenginleştirmeye gerek duyulmaktadır. Eğer çok farklı mikroorganizmaların bulunduğu bir örnekle çalışılıyorsa, diğer bakterileri elimine etmek için immunomagnetik separasyon da yapılabilir (44).

*Listeriaların* izolasyonunda iki anahtar konu vardır. Bunlardan biri zaman, diğeri ise zarar görmüş, zedelenmiş *Listeria* hücrelerinin geri kazanılması konusudur. Gıdalardan ve diğeri materyallerden *Listeriaların* izolasyonunda, önceki zamanlarda bu bakterilerin düşük sıcaklıklardaki üreme kabiliyetlerinden yararlanılıyordu. Ancak bu yöntemle *Listeriaların* izolasyonu haftalar alıyordu ve de zarar görmüş *Listeria* hücreleri ortamın stresinden dolayı geri kazanılamıyordu. Ayrıca izolasyonda yarışmacı bakterilere,

mantar vb. gibi ajanlara karşı *Listerialara* bir avantaj sağlamak için acrifilavin ve nalidixic asit gibi bazı kimyasallar tüm standart metotlarda kullanılmaktadır (44).

### **2.3.1. FDA BAM ve ISO 11290**

FDA BAM yalnızca içerisinde zenginleştirme basamağı içeren bir metottur. Bu zenginleştirme basamağında acrifilavin, nalidixic asit ve cycloheximide selektif ajanlarını içeren *Listeria* Enrichment Broth (LEB) kullanılır. LEB'de 30°C de 48 saat inkübe edilir ve ardından Oxford, PALCAM, MOX gibi selektif *Listeria* agara ekim yapılır (45).

ISO 11290 metodu ise iki aşamalı zenginleştirme basamağı içermektedir. İlk aşama zenginleştirmede Half Fraser Broth (Half FB) kullanılmaktadır. Half FB'de 24 saat 30°C de inkübe edilir. İkinci aşamada zenginleştirme için Fraser Broth (FB) kullanılır. FB ajanlardan acrifilavin ve nalidixic asit kimyasal ajanlarına ilaveten  $\beta$ -D- glukozidaz aktivitesini ölçmek için eskülin de içerir. FB'de 36-48 saat 37°C de inkübasyon yapılır. Daha sonra Oxford ya da PALCAM agara geçilir (45).

### **2.3.2. USDA/FSIS ve AOAC/IDF**

USDA'nın metodu sıklıkla et, yumurta, kanatlı ve çevresel örneklerden *Listeria* izolasyonunda kullanılmaktadır. Bu metot iki zenginleştirme aşaması içermektedir. İlk zenginleştirme adımında acrifilavin, nalidixic asit içeren University of Vermont Medium (UVM) kullanılır. UVM'de 30°C de 24-36 saat inkübe edilir. İkinci adımında acrifilavin, nalidixic asit ve eskülin içeren FB kullanılır. FB'de 37°C de 24-36 saat inkübasyon yapılır. Daha sonraki aşamada moxalactam ve colistin sulphate içeren modified Oxford (MOX) agara ekim yapılır (46).

Süt ve ürünlerinden *Listeria* izolasyonunda tercih edilen metot ise AOAC/IDF metodur. Bu metot bir zenginleştirme basamağı içermektedir. Acrifilavin ve nalidixic asit içeren LEB besiyerinde 36-48 saat 30°C de inkübe edilir ve ardından Oxford agara seçilir (46).

### 2.3.3. Kromojenik Besiyerleri

*Listeriaların* izolasyon ve identifikasyon sürelerinin uzunluğu ve güçlüğü besi yeri üreten firmaları, kromojenik besiyeri arayışına sevk etmiştir. Yapılan çalışmalarla son yıllarda “RAPID’L.MONO, ALOA, BCM *Listeria monocytogenes*” gibi isimlere sahip kromojenik besi yerleri üretilmiştir. Kromojenik besi yerlerinin ortak özellikleri kısa süre içinde, genellikle 24-48 saat içinde *Listeria* spp. veya *L. monocytogenes* için hızlı, spesifik identifikasyon imkanı vermeleridir. Kromojenik besi yerlerinin, standart besi yerlerine göre izolasyon performanslarının daha iyi olduğu ve daha hızlı sonuca gidildiği pek çok literatürde bildirilmiştir (47,48).

## 2.4. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Günümüzde moleküler tekniklerle *Listeriaların* identifikasyonu gittikçe popüler bir konu olmaktadır. Moleküler teknikler arasında DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ön plana çıkmaktadır.

### 2.4.1 DNA Hibridizasyonu

Gıdalarda *Listeriaların* aramasında kullanılan en basit moleküler yöntemdir. Kimyasal bir ışık veren DNA probları ile ilk izolasyon agarlarından *L. monocytogenes* kolonilerinin tespiti mümkündür. Radyoaktif özelliğe sahip bir maddenin probları ile hedef DNA üzerindeki kendine özgü bölgesine bağlanır. Serbest kalınca radyoaktif madde floresan ışık vermeye başlar ve bu floresanın ölçülmesiyle teşhis yapılır. Yüksek bir spesifiteye sahip bu metot ile 30 dakika içinde sonuç almak mümkündür.

### 2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bilim dünyası PZR ile tanıştığında beri, PZR’nin bütün moleküler uygulamalara çok büyük etkisi olmuştur. *Listerialara* özgü virulens genleri ya da ribozomal bölgeleri hedefleyen primerler (16S ve 23s rRNA genleri, intergenic bölgeler, hly, inlA, inlB, iap, hypersensitivite geni, aminopeptidaz geni ve putativetranscriptional regulator geni gibi) ile hem tür bazında hem de cins bazında PZR ile identifikasyonlar yapmak mümkündür (44). PZR analizi 24-48 saatlik zenginleştirmelerden sonra yapılır. Doğrudan örneklerden yapılan PZR sonuçları doğru sonuçlar vermemektedir. Doğrudan örneklerden yapılamaması, örneklerde PZR’yi inhibe eden faktörlerin bulunması ve

bunların kolaylıkla bertaraf edilmemesinden kaynaklanmaktadır. Bütün bunlara rağmen yeni teknikler geliştirildikçe doğrudan örneklerden *Listeria* identifikasyonuna yönelik çalışmalar artmaktadır (49).

PZR karışımına bir adet değil de, çoklu primer çiftlerinin eklenmesiyle yapılan metodun adına multipleks PZR denilmektedir. Multipleks PZR metoduyla, çoklu primer setleri kullanılarak aynı anda aynı örnek için birden fazla patojen taranabilmektedir. Örneğin; *Listeria* ve *Salmonella* (50) ya da bütün *Listeria* türlerini tek PZR analizinde aranması mümkündür (51). Çoklu primer setlerinin kullanıldığı diğer PZR yöntemi ise nested PZR dir. Spesifite ve sensitivitenin artırılması amaçlanan gıda, çevre, kan ve süt örneklerinden *Listeria* taramasında, aynı hedef için farklı primerler kullanılmaktadır (52). Multipleks PZR de dikkat edilmesi gereken nokta, seçilen hedef genin seçilen türler için tek olmasının gerekliliğidir (44).

### **2.4.3. Tiplendirme**

*Listeriaların* sebep olduğu salgınlarda, suşların çeşitliliğini çıkarmak, epidemiyolojisini ortaya koymak, populasyon genetiğini görmek gibi sebeplerle tiplendirme yapılmaktadır. Tiplendirme metotları fenotipik ve genotipik (moleküler ya da DNA) tiplendirme olarak temelde iki ayrılır. Fenotipik tiplendirme olarak serotiplendirme, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) ve esterase yöntemlerini sayılabilir. Moleküler tiplendirme metotları ise pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), ribotiplendirme, random amplification polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), PZR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), repetitive element PZR (rep-PZR) ve DNA sekanslama şeklinde sayılabilir. Fenotipik tiplendirmenin düşük bir ayırım gücü ve üretilebilirliği vardır. Moleküler tiplendirmelerde, yüksek duyarlılık, ayırım gücü ve üretilebilirlik vardır. *Listeria* salgınlarda iyi bir alt tiplendirme yapabilmek için iki ya da daha fazla moleküler ya da fenotipik tiplendirme tekniğini birlikte kullanmak gerekmektedir (18).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. GEREÇ

#### 3.1.1. Örneklerin Toplanması

Bu araştırmada materyal olarak Erzincan ilinde üretilen ve satışa sunulan 100 adet Erzincan tulum peyniri kullanıldı. Örnekler aseptik koşullarda yaklaşık 200'er gram alınarak laboratuara getirildi ve aynı gün işleme tabi tutuldu.

#### 3.1.2. Standart Suş

Bu çalışmada, izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sırasında kontrol suş olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'ndan temin edilen *L. monocytogenes* 1/2b suşu kullanıldı.

#### 3.1.3. *Listeria* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

##### **Buffered *Listeria* Selective Enrichment Broth (BLEB) (Merck 1.11.398)**

Peptone	5,0 g/L
Peptone from casein	5,0 g/L

Yeast extract	5,0 g/L
Meat extract	5,0 g/L
NaCl	20,0 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35 g/L
Esculin	1,0 g/L
Lithium chloride	3,0 g/L

Dehidre besiyeri distile su içinde 57,4 g/L olacak şekilde ısıtılarak çözüldü ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edildi. (55).

#### **Oxford *Listeria* Selective Agar (Merck 1.107004)**

Peptone	23,0 g/L;
Starch	1,0 g/L;
NaCl	5,0 g/L;
Agar-agar	13,0 g/L
Esculin	1,0 g/L;
Ammonium iron(III) citrate	0,5 g/L;
Lithium chloride	15,0 g/L.

Dehidre besiyeri, 29,25 g/500 mL olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritildi ve içinde manyetik taş ile birlikte otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edildi. Otoklav çıkışı 45 °C'a soğutulup üzerine 1 mL steril distile su içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı (Oxford *Listeria* Selective Supplement; Merck 1.07006) ilave edildi. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılıp steril petri kutularına 12,5 ml kadar döküldü (55).

#### **Peptonlu Fizyolojik Su**

Pepton	1,0 g/L
NaCl	85,0 g/L
Distile Su	1000 ml

Karışım 121 °C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanıldı (55).

**Blood Agar Base (Merck 1.10886)**

Nutrient substrate	20,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Dehidre besiyeri 40 g olacak şekilde 1 L distile su içinde 1-2 dk kaynatılarak tümüyle çözüldürüldü ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Bazal besiyeri 45 °C'a soğutuldu ve manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılırken üzerine steril defibrine koyun kanı % 5 oranında ilave edildi (55).

***Listeria* Rapid Test Kiti**

Oxoid *Listeria* Rapid Test (FT0401)

**Oksidaz Test Çubuğu**

Oksidaz test çubuğu (Merck 1.13300).

**3.1.4. Primerler**

*Listeria* spp' yi saptamak amacıyla *iap* gen bölgesine spesifik primerler kullanıldı (Bubert ve ark. 1992)

Lis 1A: ATGAATATGAAAAAAGCAA

Lis 1B: TTGGCTTCGGTCGCGTATAA

*L. monocytogenes*'i saptamak amacıyla ise *listeriolysine* gen bölgesine spesifik primerler kullanıldı. (Border ve ark. 1990)

LM1: CCTAAGACGCCAATCGAA

LM2: CGCTTGCAACTGCTC

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. *Listeria* spp. İzolasyonu

İzolasyon amacıyla, ISO 11290-1/A1-2004 metodu çerçevesinde 25 g peynir örneği, 225 ml ½ konsantrasyonda (inhibitörleri yarım konsantrasyonda içeren) Half Fraser Broth (Merck 1.10398.0500) içeren stomacher poşetleri içerisine konularak stomacherde orta hızda 2 dk homojenize edildi. Poşetler, ön zenginleştirme amacı ile 30 °C 'da 24 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edildi. Daha sonra ön zenginleştirme kültüründen 0.1 ml alınarak, 10'ar ml'lik tüplere tam kuvvette hazırlanan Fraser brothlara (Merck 1.110398.0500) aktarıldı. Fraser brothlar 37°C'de 2 gün aerobik şartlarda inkübe edilerek selektif zenginleştirme aşaması tüplerde gerçekleştirildi. Son aşamada, bu kültürden alınıp öze yardımıyla polymyxin - acriflavine - lithium chloride - ceftazidime - esculin – mannitol içeren *Listeria* selektif agara çizme yöntemiyle ekim yapılarak petriyer 37°C'de 24 saat süre ile aerobik ortamda inkübe edildi (53).

### 3.2.2. *Listeria* spp. İdentifikasyonu

İzole edilen *Listeria* şüpheli kolonilerin fenotipik testlerle identifikasyonu amacıyla şüpheli izolatlara, Gram boyama, hareket muayenesi, hemoliz aktivitesi, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı.

#### 3.2.2.1 Fenotipik Testler

##### Gram Boyama

Bir lam üzerine damlatılan bir damla serum fizyolojik tuzlu su içinde *Listeria* Selective Agar'dan alınan şüpheli koloniler homojenize edildi. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez alevden geçirilerek tespit işlemi gerçekleştirildi. Preparat kristal moru çözeltisi (GBL 5026/01) ile 2-3 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Daha sonra iyot çözeltisi (GBL 5026/02) 1-2 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine damla damla denatüre alkol çözeltisi (GBL 5026/03) damlatılarak dekolore edildi. Distile su ile yıkandı ve safranin çözeltisi (GBL 5026/03) ile 30 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifte incelendi (54).



### **Katalaz Testi**

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'in % 3'lük solüsyonundan temiz lam üzerine bir damla damlatıldı ve katı besiyerinden öze ile alınan koloni lam üzerindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlası ile karıştırıldı. Bir-iki saniye içerisinde kabarcık şeklindeki gaz oluşumunun gözlenmesi ile katalaz reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi (15).

### **Oksidaz Testi**

Bu testte ticari oksidaz stikler kullanıldı (Merck 1.13300). Oksidaz stikler üzerine *Listeria* Selective Agar'da üretilen saf ve taze kültürlerinde bir koloni alınarak öze ile sürüldü. Bu işlemi takiben bir iki dakika içerisinde stikler üzerinde kolonilerin sürüldüğü yerde mavi-mor rengin oluşması pozitif renk değişiminin olmaması ise negatif olarak değerlendirildi (55).

### **Hareket Muayenesi**

Temiz bir lam üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su damlatıldı. Şüpheli izolattan bir koloni alınarak bu suda homojenize edildi. Üzerine lamel kapatılarak lam lamel arası hazırlanan preparat immersiyon objektifinde incelendi. Hareket muayenesinde 25°C'de aktif hareketin olması ve 37°C'de hareketin olmaması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

### **Hemoliz Testi**

*Listeria* Selective Agar'da izole edilen *Listeria* şüpheli kolonilerden kanlı agara tek koloni olacak şekilde ekim yapılarak saf kültürleri elde edildi. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan koloniler etrafında hemoliz zon oluşumunun gözlenmesi hemoliz pozitif olarak değerlendirildi (55).

#### **3.2.2.2 Listeria Rapid Test**

Fenotipik testlerle *Listeria* spp. izolasyonu yapılan örneklerle doğrulama amacıyla bir diğer yöntem olarak Oxoid *Listeria* Rapid Test (FT0401) uygulandı. Bu amaçla ön zenginleştirme işleminden sonra örneklerden 1 ml alınarak Selective Enrichment Supplement, (SR0141) içeren 10 ml lik Oxoid Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) Base, (Oxoid CM0897) içerisine inoküle edilerek 30 °C de aerobik koşullarda

24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerinin üst kısmından 2 ml örnek alınarak steril tüplere aktarıldı. Bu tüplerde 80 °C de ki su banyosunda 20 dk bekletilerek flagella antijenlerinin açığa çıkması sağlandı. Tüpler soğutulduktan sonra her bir örnekten 135 µl alınarak Oxoid Listeria Rapid Test kiti üzerindeki örnek bölmesine damlatıldı. 20 dakika içerisinde tüp kitlerin pozitif kontrol pencerelerinde mavi renkli çizgi oluşumu görüldü ve örnek okuma pencerelerinde aynı şekilde mavi renkli çizgi oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (56).

*Listeria* Selective Agar, biyokimyasal testler ve Listeria Rapid Test sonucu pozitif olan numunelerden elde edilen Listeria izolatlarına moleküler testler uygulandı.

### **3.2.2.3 Moleküler Testler**

#### **DNA Ekstraksiyonu**

Listeria kolonilerinden DNA ekstraksiyonu için Proteinaz K yöntemi kullanıldı (17). Bu yöntemde şüpheli koloniden alınarak 300µl distile su içerisinde hazırlanan yoğun süspansiyonların üzerine 300µl K-tamponu (20mM Tris pH 8.0+150mMNaCl+10mM EDTA+%0.2 Sodyum dodesil sülfat) ve 200 µg/ml Proteinaz K ilave edildi. Sonra 56 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Proteinaz K' nın inaktivasyonu için 10dk. kaynatma işlemine tabi tutuldu. Kaynatmadan sonra fenol ekstraksiyon işlemine geçildi. Süspansiyona 600 µl Tris-HCl ile satüre edilmiş fenol ilave edilerek ve elle 5 dk. çalkalandı. 13.000 rpm 10 dk. santrifüj ilave edildi. Tüpün üst tarafında biriken süpernatant kısmı mikropipet yardımıyla dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe alındı. Ekstraksiyon işlemine yeni tüpe alınan süpernatant kısım ile devam edildi. Daha sonra piresipitasyon amacıyla süspansiyona 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etanol ilave edilerek -20 °C'de 2 saat bekletildi. Ardından yüksek devirde (116000 g.) 10 dk. santrifüj edildi. Elde edilen tortu önce 300 µl miktarındaki %90'lık ve daha sonraki %70'lik etanol ile her basamakta 5 dk. santrifüj işlemi uygulanarak yıkandı. Geriye kalan tortu 100 µl distile su ile sulandırıldı ve moleküler işlemlerde DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi (17).

### ***Listeria* spp. İdentifikasyonu için PZR**

*Listeria* spp. identifikasyonu için yapılan PZR tekniğinde Bubert ve ark.'ın (51), geliştirdiği metot temel alınarak kullanıldı. Bu amaçla *iap* gen bölgesine spesifik primer çifti kullanıldı. (Lis1A, Lis1B). PZR amplifikasyonu 94 °C'de 3 dk. ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 45 saniye denaturasyon, 55 °C'de 1 dk. bağlanma ve 72 °C'de 1 dk. uzama safhası olmak üzere toplam 30 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C de 5dk. ekstra sentez işlemi yapıldı (34). Çoğaltılan PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ultraviole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (MBI Fermentas SM 0321) kullanıldı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 1454 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *Listeria* spp. pozitif olarak kabul edildi (51).

### ***L.monocytogenes* İdentifikasyonu için PZR**

*L. monocytogenes* identifikasyonu için yapılan PZR tekniğinde, Border ve ark. (1990) 'ın (57), geliştirdiği yöntem kullanıldı. Bu amaçla *Listeriolysin* genine spesifik primer çifti (LM1 ve LM2) kullanıldı. PZR amplifikasyonunda 94 °C'de 4 dk. ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 30sn. denaturasyon, 52 °C'de 60 sn. bağlanma ve 72 °C'de 90 sn. uzama safhası olmak üzere toplam 30 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. Çoğaltılan PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ultraviole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (MBI Fermentas SM 0321) kullanıldı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 702 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *L.monocytogenes* pozitif olarak değerlendirildi.

#### **3.2.2.4. Agaroz Jel Elektroforez**

##### **Agaroz Jelin Hazırlanması**

Amplifikasyon sonrasında oluşan ürünlerin değerlendirilmesi için %1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel hazırlanırken tampon solüsyon olarak 0,5x TBE tamponu kullanıldı. Agaroz 50 ml TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra, 3 µl ethidium bromid ilave edilerek, jel elektroforez tablasına döküldü. Beş mm

kalınlığında dökülen agaroz üzerine elektroforez tarağı takılarak, jelin katılaşması için 30 dakika beklenildi. Bu süre sonunda taraklar jele zarar vermeden çıkartıldı (58).

### **Elektroforez İşlemi**

Jel elektroforez tablası elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, elektroforez tankının içerisine TBE tampon solüsyonu jelin 1 mm üstüne gelecek kadar ilave edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 5 µl alınarak, 2 µl 6x loading dye ile karıştırıldı. Bu karışımın hepsi jele yüklendi. DNA örnekleri 100 voltta 70 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu (58).

### **Görüntüleme İşlemi**

Jeldeki örnekler bilgisayarlı UV transillüminatör kutusu içine yerleştirilerek görüntülendi ve fotoğrafları çekilerek termal printerden kopyaları alındı (58).

## 4. BULGULAR

### 4.1. İZOLASYON SONUÇLARI

#### 4.1.1. *Listeria* spp. İzolasyonu

Çalışmada, 100 adet Erzincan tulum peynirinden ISO 11290-1/A1-2004 metodu ile yapılan *Listeria* spp. izolasyonunda, 3 numune *Listeria* spp. yönünden pozitif olarak saptandı. *Listeria* spp. izolatlarının tamamı Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, 25°C'de hareketli, 37°C'de hareketsiz olarak tespit edildi.

**Tablo 4.1.** *Listeria* spp. İzolasyon Sonucu

Numune Cinsi	Numune Sayısı	Pozitif Numune Sayısı (%)
Erzincan Tulum Peyniri	100	3 (%3)

## 4.2. LİSTERİA RAPİD TEST

Aynı zamanda bütün numuneler *Listeria* spp. varlığının incelenmesi amacıyla bir diğer yöntem olarak Oxoid *Listeria* Rapid Test (FT0401)'e tabi tutuldu. Klasik konvansiyonel metodla *Listeria* spp. izolasyonu yapılan numuneler bu test sonucunda da *Listeria* spp. yönünden pozitif olarak saptandı.

**Tablo 4.2.** *Listeria* spp. İzolatlarının *Listeria* Rapid Test Sonucu

Numune Cinsi	İzolot Sayısı	Pozitif Numune Sayısı (%)
<i>Listeria</i> spp. İzolasyonu yapılan Erzincan tulum peyniri numuneleri	3	3 (%100)

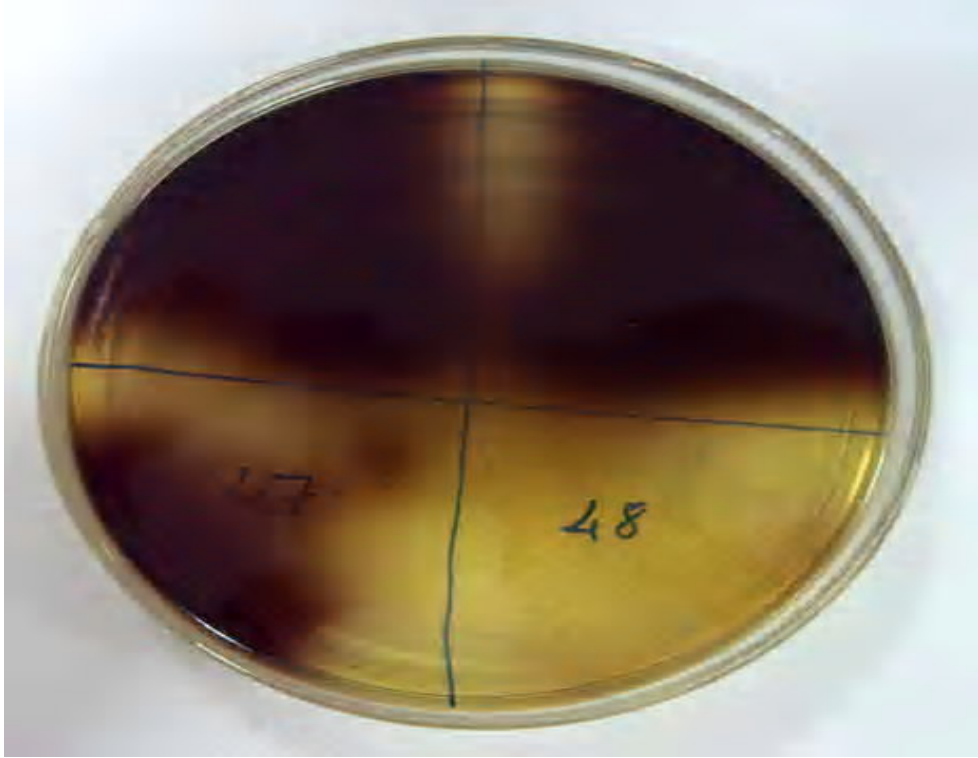
## 4.3. LİSTERİA SPP. İDENTİFİKASYONU

### 4.3.1. Moleküler Analiz Sonuçları

Fenotipik analizler ve *Listeria* Rapid Test sonucu ile *Listeria* spp. yönünden pozitif olarak saptanan *Listeria* izolatlarının doğrulanması amacıyla *Listeria* spp. spesifik primer (iap gen bölgesi) ve *L. monocytogenes*'e spesifik primer (listeriolysin gen bölgesine spesifik primerler) kullanılarak PZR işlemi yapıldı. PZR işlemi sonucunda izolatların tamamı *Listeria* spp. ve *Listeria monocytogenes* olarak saptandı. İzolatlar, genus spesifik PZR işlemi sonucunda jel elektroforez görüntüsünde, 1454 bp büyüklüğünde bantlar oluştururken, *L. monocytogenes* spesifik PZR'de ise 702 bp boyutlarında bantlar oluşturdu (Şekil 4.4.-4.5).

**Tablo 4.3.** Moleküler Analiz Sonucu

İzolot sayısı	Pozitif Numune Sayısı (%)	
	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
3	3 (%100)	3 (%100)



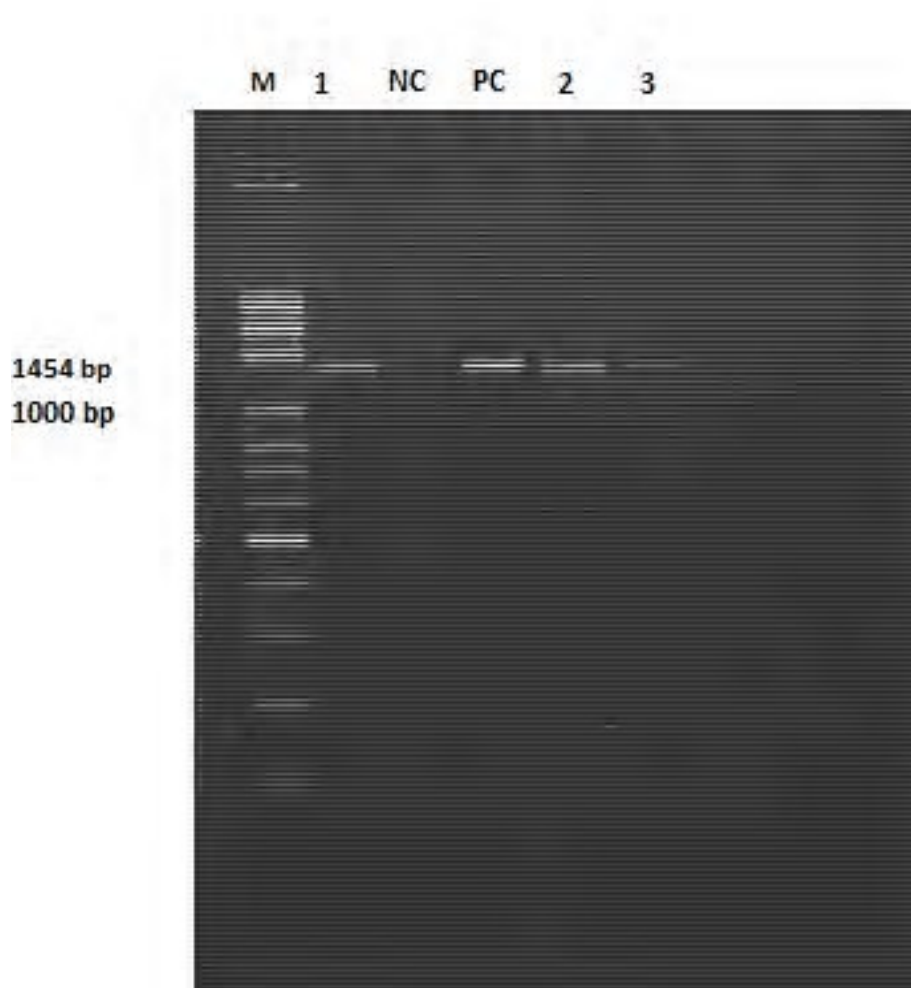
Şekil 4. 1 : *Listeria* Selektif Agar'da *Listeria* spp.Görünümü



Şekil 4. 2 : *Listeria* Selektif Agar'da *Listeria* spp.Görünümü



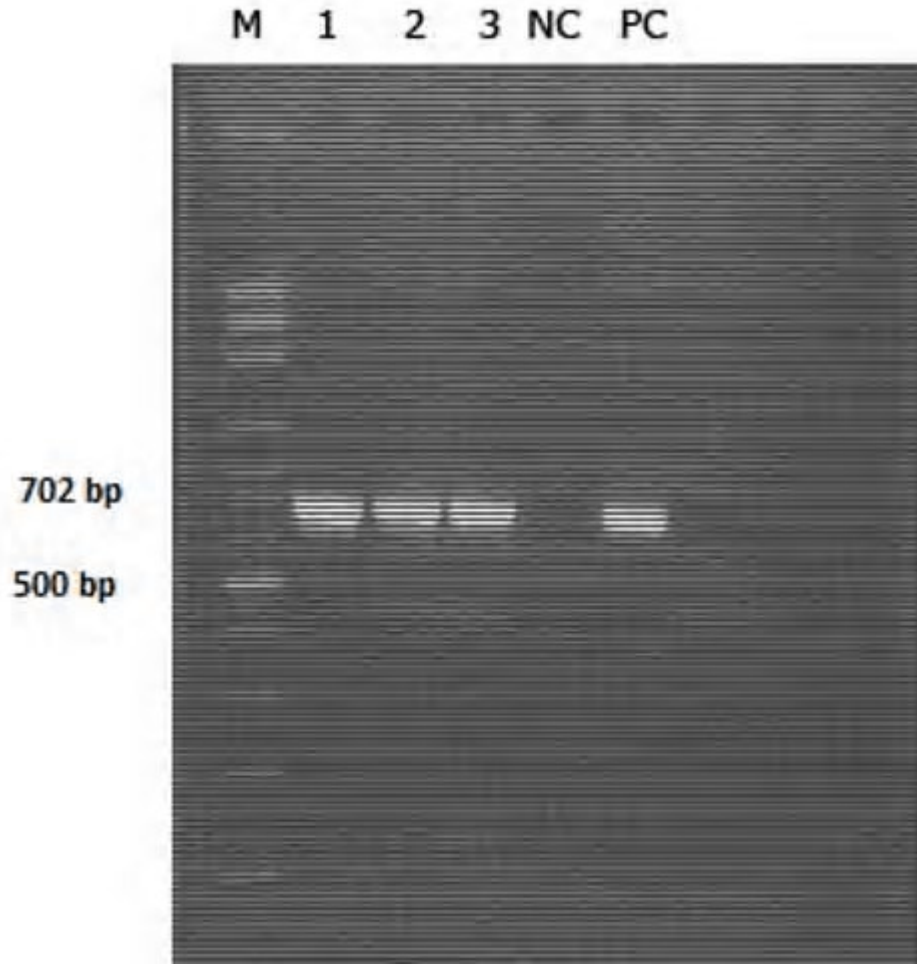
Şekil 4.3 : *Listeria* Rapid Test kiti pozitif örnek.



Şekil 4.4 : *Listeria* spp. İzolatlarının PZR ile Doğrulanması

M. Marker, NC:Negatif kontrol, PC: Pozitif kontrol (1454 bp),1,2,3 tulum peynirden izole edilen *Listeria* spp. (1454 bp)





**Şekil 4.5 :** *Listeria monocytogenes* İzolatlarının PZR ile Saptanması

M. Marker, 1,2,3: Tulum peynirden izole edilen *Listeria* spp.izolatları (702 bp), NC:Negatif kontrol, PC: Pozitif kontrol (*L. monocytogenes* (702 bp),

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tulum peyniri çiğ süttten üretilir ve ülkemizde en yaygın tüketilen semi-soft peynir türüdür. Erzincan Tulum peyniri ise yıllardır Erzincan ve çevresinde üretilmiş ve bölgesel olarak yoğun şekilde tüketilmektedir. Son yıllarda ise daha büyük çaplı üretim işletmeleri kurulmuş ve Erzincan ili dışına da pazarlanmaya başlanmıştır. Bu çalışmada araştırılan 100 adet Erzincan Tulum peyniri örneğinden 3 (%3)'ünden *Listeria monocytogenes* izole ve identifiye edildi. Türk Gıda Kodeksine göre 25 gram peynir örneğinde *Listeria monocytogenes* bulunması uygun değildir. Bu çalışmada bulunan %3'lük pozitif değer Türkiye Yasal Limitlerine göre uygun değildir (59).

Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda süt ürünlerinde *L. monocytogenes* izolasyonu ve yaygınlığı bildirilmiştir. Tümbay ve ark. (1988), 323 adet Beyaz Peynir örneğinden 11 (%3,4) 'inde *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir (60). Benzer şekilde, Sagun ve ark. (2001), Van ili ve çevre köylerinden topladıkları 250 adet çiğ süt örneği ve 254 adet de yöresel bir peynir çeşidi olan Otlu Peynir örneği kullanarak yaptıkları bir çalışmada, çiğ süt örneklerinden 6 (%2,40) tanesinin *Listeria* spp. yönünden pozitif olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Bunların ise 3 (%1,20) 'ünü *L. monocytogenes* olarak identifiye etmişlerdir. Ayrıca çalışmada kullandıkları 254 adet otlu peynir örneğinden ise 13 (%5,11) tanesinin *Listeria* spp. ve bunlarında 10 (%3,93)

tanisinin *L. monocytogenes* olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir (61). Benzer şekilde Çiftçioğlu ve Uğur (62), 105 adet Beyaz Peynir örneğiyle yaptıkları bir çalışmada örneklerin 3 adetinden, Gülmez ve Güven (63) 40 adet Çivil peyniri örneğinin bir adetinden *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Akkaya ve Alishanlı (64), ise Afyon ilinde bulunan semt pazarlarından topladıkları 100 adet beyaz peynir örneğinden 6 (%6)'sında *L. monocytogenes* izolasyonu olduğunu rapor etmişlerdir. Çolak ve ark.(65), İstanbul da çeşitli marketlerden sağladıkları 250 adet Tulum Peyniri örneği ile yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes* izolasyonunu %4,8 (12) oranında belirlemişlerdir. Kahraman ve ark. (66) 105 adet beyaz peynir, 70 adet eritme peyniri, 45 adet dil peyniri ve 60 adet kaşar peyniri olmak üzere 280 adet peynir örneği ile yaptıkları çalışmalarında, beyaz peynir örneklerinde %4,8 oranında, eritme peynirlerinde %1,4 oranında kaşar peynirlerinde %1,7 oranında *L. monocytogenes* izolasyonu olduğu, dil peyniri örneklerinden ise *L. monocytogenes* izolasyonu olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular bizim verilerimizle (%3) uyumludur. Buna karşın Çetinkaya ve ark. (67). Elazığ yöresinde üretilen taze beyaz peynir, tulum peyniri, tereyağı ve çökelekte *Listeria* türlerinin sıklığını araştırmayı amaçladıkları bir çalışmalarında perakende satış merkezlerinden 51 adet Şavak tipi beyaz peynir, 52 adet tulum peyniri, 50 adet tereyağı ve 10 çökelek olmak üzere toplam 163 adet numuneye çalışmışlardır. Bu çalışmada beyaz peynir örneklerinden bir tanesinden *L. monocytogenes* ve tuzlu tereyağı numunelerinin bir tanesinden *L. innocua* izole ettiklerini bildirmişler, ancak tulum peyniri ve çökelek örneklerinden ise izolasyon olmadığını belirtmişlerdir.

Türkiye dışındaki ülkelerde ise, farklı geleneksel peynir tiplerinde *L. monocytogenes* varlığı araştırılmıştır. Silva ve ark.(68), Brezilya ya özgü geleneksel bir peynir çeşidi olan Minas Freskal peynirlerinde *L. monocytogenes* yaygınlığını araştırmışlardır. Çalışma için peynir üretimi yapılan iki süt fabrikası seçmişler ve bu fabrikada üretim prosedürünün önemli aşamalarından örnekleme yapmışlardır. Çalışmalarında 54 adet gıda örneği, 107 adet ekipman örneği, 22 adet işçi el numunesi ve 35 adet de çevresel örnek olmak üzere toplam 218 örnek kullanmışlardır. Çalışmada toplam olarak 13 adet *Listeria* ssp. izolasyonu yapılmış ve bunların 9'unu *L. innocua*, 2'sini *L. grayi*, ve 2'sini de *L. monocytogenes* olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada günlük 10 000 litre süt işleme kapasitesi olan birinci fabrikada yapılan

çalışmada *Listeria* spp. nin çiğ süt örneklerinden %50, peynir pıhtısında %33,3, pastörize süt örneklerinde %16,7, peynir örneklerinde %16,7 ve taşıyıcı borulardan alınan örneklerin %25 oranında bulunduğunu bildirmişler, çevresel örneklerde ise *Listeria* spp. izolasyonu olmadığını belirtmişlerdir. Günlük 2000 litre süt işleme kapasitesine sahip ikinci fabrikada ise çiğ süt örneklerinde %16,7, çevresel örneklerde %17,6 oranında *Listeria* spp. izolasyonu yapılmış ve çiğ sütlerden %16,7 *L. monocytogenes* ve peynir depolama odalarının tabanından %14,3 oranında *L. monocytogenes* izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir. İzole ettikleri etkenlerin serotiplerinin gıda zehirlenmelerinde en çok karşılaşılan serotipler olduklarını belirtmişlerdir. Rudolf ve Scherer (69), Avrupa da çeşitli ülkelerden topladıkları 329 adet Avrupa red-smear peyniri örneği ve 45 adet de hard peynir örneği kullandıkları bir çalışmalarında, Avusturya orijinli örneklerde %10, Fransa orijinlilerde %3,3 oranında, Almanya orijinliler de %9,2 oranında, İtalya orijinliler de %17,4 oranında *L. monocytogenes* izolasyonu olduğunu Danimarka ve İsviçre orijinli örneklerde ise *L. monocytogenes* izolasyonu olmadığını bildirmişlerdir. Toplam olarak ise örneklerden %6,4 (21 adet) oranında *L. monocytogenes* kontaminasyonu belirlediklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, *L. monocytogenes* izolasyonunun soft ve semi-soft peynir türlerinde daha fazla karşılaşıldığını belirtmişlerdir. Makino ve ark. (70), Japonya da karşılaşılan bir gıda zehirlenmesi salgınında, 123 adet geleneksel peynir örneği ve bu peyniri tüketen 86 kişiden örnekleme yapmışlardır. Araştırmacılar bu 86 kişinin 38'inde gastro-enterit ve benzeri klinik belirtiler gözlendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada örneklerin 15'inde *L. monocytogenes* izolasyonu ve bu izolatların serotiplendirme ve PZR'a dayalı tiplendirme analizleri ile hastalardan izole edilenlerle yakın ilişkili oldukları belirlenmiş ve insanlarda hastalığa neden olan suşların bu peynirlerin tüketiminden kaynaklandığı belirtilmiştir. Menéndez ve ark. (71), Galiçya da üretilen çiğ inek sütünden yapılan tetilla peynirlerinde çalışmışlar ve 24 örneğin 2(%8,3)'inde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir. Başka bir çalışmada Olarte ve ark.(72), İspanyada taze keçi sütlerinden yapılan yöresel bir peynir çeşidi olan Kameros Peyniri ile yaptıkları bir çalışmada 18 adet örneğin sadece 1 (%5,6)'inde *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Fakat, Ashenafi (73), Etiyopya da yaptığı bir çalışmada 100 adet yöresel peynir örneğinde *L. monocytogenes* izolasyonu olmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Yunanistanda yapılan bir çalışmada

Angelidis ve ark. (74), geleneksel peynirlerde 14 örnekte *L. monocytogenes* izole edemediklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada belirlenen *L. monocytogenes* varlığı (%3) Erzincan Tulum Peynirinin çiğ süttten yapılması, ayrıca üretim ve saklama koşullarının hijyenik olmayışından kaynaklanabilir. Ayrıca ülkemizde tulum peyniri üretimi yapan küçük işletmelerin hijyenik şartlarının iyi olmayışından dolayı düşük mikrobiyolojik kalitede oldukları çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (75-78).

Bu çalışmada, Erzincan bölgesinde önemli bir besin maddesi olarak tüketim potansiyeline sahip Erzincan Tulum Peynirlerinde *L. monocytogenes* varlığının saptanması sebebiyle bölgede etkenle bulaşık tulum peyniri tüketiminin, halk sağlığı açısından risk oluşturabileceği kanısına varılmıştır. Tulum peynirinin çiğ süttten hazırlanması nedeniyle, peynir yapılacak süttün sağlıklı işletmelerden alınması yanı sıra üretim ve saklama işlemleri sırasında hijyenik tedbirlerin azami şekilde uygulanması gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Özdemir, S., Çelik, Ş., Özdemir, C. ve Sert, s., 1998. Diyarbakır'ın Karacadağ Yöresinde Mahalli Olarak Yapılan Örgü Peynirinin Mikrobiyolojik ve Kimyasal Özellikleri. Geleneksel Süt Ürünleri V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Kitabı, s 154-166, 21-22 Mayıs 1998, 154-166, Tekirdağ.
2. Uysal, H., Kavas, G. ve Kınık, Ö.. Türkiye'de Üretilen Geleneksel Süt Ürünleri. GAP I. Tarım Kongresi Bildiri Kitabı, s 247-254, 26-28 Mayıs 1999, Şanlıurfa.
3. Arıcı, M. ve Şimşek, O. Kültür Kullanımının Tulum Peynirinin Duyusal, Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerine Etkisi. Gıda, 1991 16(1), 53-62.
4. Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alişarlı, M., Güdücüoğlu, H.:( 2006) Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes*'in izolasyonu. Van Tıp Dergisi 13 (2) :36-41.
5. Carte GR., Chengappa MM, Roberts AW. 1995. Essentials of Veterinary Microbiology. Willams and Wilkins, USA.

6. Buchanan R, Lindqvist, R, Ross, T, Smith M, Tod, Whiting ,R .2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical Report. Microbiological Risk assesment series: no.5.WHO/FAO.
7. Vazquez-Boland JA, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF, Suarez G (1992). *Listeria monocytogenes* CAMP Reaction. *Clinical Microbiology Rewievs* 5(3):343.
8. Farber JM, Daley E, Coates F.( 1991) Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *J Clin Microbiol* 29:2606-2608.
9. Seeliger HP, Jones D. (1986). Genus *Listeria*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath PH, Mair NS, Sharpe, ME, Hold JG. (Editors). Williams and Willkins, Baltimore, USA.
10. Schlech WF. (1996). Pathogenesis and Immunology of *Listeria Monocytogenes*. *Pathol Biol*, 44(9):775-782.
11. Low JC, Donachie W. (1997). A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J*, 153: 9–29.
12. Rocourt J, Cossart P. (1997). *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, pp. 337–352.
13. Farber JM, Peterkin PI. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, 55:476–511.
14. Bille J, Rocourt J, Swaminathan B. (2003). *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. et al (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edn. ASM, Washington, DC, pp. 461–47.
15. Arda M, Aydın N, Minbay A, Kahraman M, Leloğlu N, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. (1999). *Özel Mikrobiyoloji*, Medisan. Ankara.
16. Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal ÖM, Paracıkoğlu J, Akan M. (2006). *Veteriner Mikrobiyoloji*. Editör: Aydın N, Paracıkoğlu J. İlke Yayınları, Ankara.

17. Hirsh DC, Zee YC. (2002). *Veterinary Microbiology*. Blackwell Publications. ABD.
18. Allerberger F. (2003). *Listeria*: Growth, Phenotypic Differentiation and Molecular Microbiology. *Fems Immunol Med Mic*, 35: 183-189.
19. Groves RD, Welshimer J. (1977). Separation of Pathogenic from Apathogenic *Listeria monocytogenes* by Three Invitro Reactions. *J Clin Microbiol*, 5; 559–563.
20. Hain T, Steinweg C, Chakraborty T. (2006). Comparative and Functional Genomics of *Listeria* spp. *J Biotechnol*, 126: 37–51.
21. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* 14(3):584-640.
22. Carter GR, Chengappa MM, Roberts AW. (1995). *Essentials of Veterinary Microbiology*, Willams and Wilkins, USA.
23. Anonim. (2004). *Microbiological Risk Assessment Series, No. 5, Technical Report* ISBN 92 4 156262:5 .WHO. Rome/Italy.
24. Lorber B. (2007). *Listeriosis*. Editor: Goldfine H, Shen H. Springer. USA.
25. Oliver HF, Wiedmann M, Boor K. (2007). *Environmental Reservoir and Transmission into the Mammalian Host, Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Editors: Goldfine H, Shen H. Springer, USA.
26. Loessner MJ. (1991). Improved Procedure for Bacteriophage Typing of *Listeria* Strains and Evaluation of New Phages. *Appl Environ Microbiol*, 57: 882–884.
27. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, Mcdonough PL, Wiedmann M. (2004). Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in The Farm Environment. *Appl Environ Microbiol*, 70:4458–4467.
28. Fenlon DR, Wilson J, Donachie W. (1996). The Incidence and Level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial processing. *J. Appl Bacteriol*, 81:641–650.



29. Sauders BD. (2005). Molecular Epidemiology, Diversity, Distribution, And Ecology of *Listeria*. PhD Thesis, Cornell University, Ithaca, NY.
30. Hayashidani H, Kanzaki N, Kaneko Y, Okatani AT, Taniguchi T, Kaneko K, Ogawa J. (2002). Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in Wild Boars in Japan. *Wild Dis*, 38(1):202-205.
31. Gudmundsdottir K, Svansson V, Aalbaek B, Gunnarsson E, Sigurdarson S. (2004). *Listeria monocytogenes* in Horses in Iceland. *Vet Rec*, 155:456–459.
32. Weber A, Pote, J, Schafer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. (1995). Studies on The Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Fecal Samples of Domestic and Companion Animals. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 198:117–123.
33. Tompkin RB. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in The Food-Processing Environment. *J Food Prot*, 65:709–725.
34. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* 14(3):584-640.
35. Donnelly CW. (2002). Detection and Isolation of *Listeria monocytogenes* from Food Samples: Implications of Sublethal Injury. *J AOAC Int*, 85: 495–500.
36. Monfort P, Minet J, Rocourt J, Piclet G, Cormier M. (1998). Incidence of *Listeria* spp. in Breton Live Shelfish. *Lett Appl Microbiol*, 26: 205-208.
37. Barbuddhea SB, Malika SVS, Bhilegaonkar KN, Kumar P, Guptab LK. (2000). Isolation of *Listeria monocytogenes* and *Anti-listeriolysin O* Detection in Sheep and Goats. *Small Ruminant Res*, 38; 151-155.
38. Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB. (2008). *Listeria* Species in Bovine Raw Milk: A large survey of Central India. *Food Control*, 19: 109–112.
39. Şahin M, Beytut E. (2006). Abortions in Sheep Due to *Listeria ivanovii* in the Kars Region. *Turk J Vet Anim Sci*, 30: 503-506.

40. Aygün O, Pehlivanlar S. (2006). *Listeria* spp. in The Raw Milk and Dairy Products in Antakya, Turkey. *Food Control*, 17; 676–679.
41. Lui D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. USA : CRC Pressby Taylor & Francis Group, LLC, 2008.
42. Voetsch AC, Angulo FJ, Jones TF, et al. Reduction in the incidence of invasive listeriosis in foodborne diseases active surveillance network sites, 1996–2003. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44: 513-520.
43. Varma JK, Samuel MC, Marcus R, et al. *Listeria monocytogenes* infection from foods prepared in a commercial establishment: A case-control study of potential sources of sporadic illness in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44: 521-528.
44. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. (2005). Methods for The Isolation and Identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A Review. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 851-875.
45. Scotter SL, Langton S, Lombard B, Schulten S, Nagelkerke N, In\_T Veld PH, Rollier P, Lahellec C. (2001). Validation of ISO method 11290 Part 1 Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Int J Food Microbiol*, 64(3) 295-306.
46. Anonim. (1995). Official Methods of Analysis. 16th edition. AOAC International, USA.
47. Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis GDW, Holzapfel WH. (2006). Comparison of Two Chromogenic Media for the Detection of *Listeria monocytogenes* with The Plating Media Recommended by EN/DIN 11290-1. *Int J Food Microbiol*, 109; 127–131.
48. Gracieux P, Roche SM, Pardon P, Velge P. (2003). Hypovirulent *Listeria monocytogenes* Strains are Less Frequently Recovered than Virulent Strains on PALCAM and Rapid‘ L. mono Media. *Int J Food Microbiology*, 83.133– 145.
49. Aznar R, Alacron B. (2003). PCR detection of *Listeria monocytogenes*: A study of Multiple Factors Affecting Sensitivity. *J Appl Microbiol*, 95: 958–966.

50. Li X, Boudjellab N, Zhao X. (2000). Combined PCR and Slot Blot Assay for Detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, 56: 167–177.
51. Bubert A, Kohler S, Goebel W. (1992). The Homologous and Heterologous Regions within The *iap* Gene Allow Genus and Species Specific Identification of *Listeria* spp. by Polymerase Chain Reaction. Appl Environ Microbiol, 58: 2625–2632.
52. Cocolin L, Manzano, M, Cantoni C, Comi G. (1997). A Nested PCR Method to Detect *Listeria monocytogenes* in Artificially Contaminated Blood Specimens. Res Microbiol, 148(6):485-90.
53. Anonymous, Horizontal Method for the detection of *Listeria monocytogenes* ISO 11290 - 1 / A1 2004.
54. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, Barış Yayınları, Bornova 1994: 188-211.
55. Halkman K. Ed: Başak A. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Anonymus Matbaacılık Ltd.Şti 2005; Ankara.
56. Bridson E.Y. The Oxoid Manual 8th edition, Oxoid Limited Hampshire, England, 1998.
57. Border P, Howard J, Plastow G, Siggins K. (1990). Detection of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Using Polymerase Chain Reaction. Lett Appl Microbiol, 11: 158-162.
58. Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
59. Türk Gıda Kodeksi (2001). Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Tebliğ No: 2001/19. Resmi Gazete; Tarih 02.09.2001, Sayı:24511.
60. Tümbay, E., Seeliger, H.P.R., İnci, R., Coşar, G., ve Langer, B. 1988, Isolation of *Listeria* from cheese in Turkey, *İnfeksiyon Dergisi* 2 (1988) (4), pp. 593–595.

61. Sagun E., Sancak Y.C., İşleyici Ö.ve Ekici K., 2001, Van ve çevresi süt ve otluk peynirlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine bir araştırma, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* **25** (2001), pp. 15–19.
62. Çiftcioglu G. ve Ugur, M. 1991, Ülkemizde tüketilen salamura beyaz peynirlerde *Listeriaların* varlığı üzerine bir araştırma, *Bildiriler, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Gıda Teknolojisi Araştırma Enstitüsü* (1991), pp. 179–190.
63. Gülmez M. ve Güven, A. 2001, Beyaz ve Çeçil peynirlerinde *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **7** (2001) (2), pp. 155–161.
64. Akkaya, L. ve Alişarlı, M (2006), Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. Varlığının Belirlenmesi. YYÜ Vet Fak Derg, 2006, 17 (1-2):87-91
65. Çolak, H., Hampikyan, H., Bingöl, B.E. ve Ulusoy, B (2007), Prevalence of *L. Monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control* 18:576-579.
66. Kahraman T., Özmen G., Özinan B. ve Göksoy, E. O.(2010), Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in different cheese types produced in Turkey", *British Food Journal*, 112 (11)1230 - 1236
67. Çetinkaya B., Ertas H.B. ve Muz A., 1999, Süt ürünlerinde *Listeria* türlerinin izolasyonu, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* **13** (1999) (2), pp. 21–25.
68. Silva I.M.M., Almeida R.C.C., Alves M.A.O., ve Almeida P.F., 2003, Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing, *International Journal of Food Microbiology* **81** (2003) (3), pp. 241–248.
69. Rudolf M ve Scherer, S.2001, High incidence of *L. monocytogenes* in European red smear cheese, *International Journal of Food Microbiology* **63** (2001), pp. 91–98.
70. Makino S.I., Kawamoto K., Takeshi K., Okada Y., Yamasaki M., Yamamoto S.ve Igimi, S., 2005 An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001, *International Journal of Food Microbiology* **104** (2005), pp. 189–196.

71. Menéndez S., Godínez R., Centeno J.A. ve. Rodríguez-Otero J.L, 2001, Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese, *Food Microbiology* **18** (2001) (2), pp. 151–158.
72. Olarte C., Sanz S., Fandos E.G. ve Torre P., 1999, Microbiological and physicochemical characterisation of Cameros cheese, *Food Microbiology* **16** (1999), pp. 615–621.
73. Ashenafi M., 1990, Microbiological quality of ayib, a traditional Ethiopian cottage cheese, *International Journal of Food Microbiology* **10** (1990) (3–4), pp. 263–268.
74. Angelidis A.S., Chronis E.N., Papageorgiou D.K., Kazakis I.I., Arsenoglou K.C. ve Stathopoulos, G.A. 2006, Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: a potential food-quality index, *Food Microbiology* **23** (2006) (1), pp. 95–100.
75. Bostan K, Ugur M. ve Aksu H., 1992, Deri ve plastik bidonlar içinde satışı sunulan tulum peynirlerinin duysal kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, *Pendik Hayvan Hastanesi Merkezi Araştırma Enstitüsü Dergisi* **23** (1992) (1), pp. 78–83.
76. Kıvanç, M. (1989). The microbiological quality of Erzincan (Savak) Tulum cheese from Turkish retail markets. *Nahrung*, 33, 895–900.
77. Kurt A. ve L. Öztekin, 1984, Şavak tulum peynirinin yapım tekniği üzerine araştırmalar, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Dergisi* **15** (1984) (3–4), pp. 65–67.
78. Tekinşen O.C, Patır B. ve Alkan M., 1993, Şavak peynirinde koliform grubu mikroorganizmalar üzerine araştırmalar, *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **9** (1993) (2), pp. 8–12.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mustafa Gürkan AZAK

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 29 Nisan 1969, Gölcük

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 446 224 40 78

email: zeynepaz1976@hotmail.com

Yazışma Adresi: 3. Ordu Karargahı

ERZİNCAN

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	1992
Lise	Gölcük BHL. Lisesi	1986

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
1993-2011	Türk Silahlı Kuvvetleri	Subay

### YABANCI DİL

Almanca