

ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIĞIR SÜTÜNDE *BRUCELLA* ve *LİSTERİA* TANISI İÇİN
PCR OPTİMİZASYONU**

ELİF YETİLMEZER

Danışman: Prof. Dr. K. SERDAR DİKER

ANKARA

2010

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIĞIR SÜTLERİNDE BRUCELLA ve LİSTERİA TANISI İÇİN PCR OPTİMİZASYONU

Elif YETİLMEZER

Ankara Üniversitesi

Biyoteknoloji Enstitüsü

Temel Biyoteknoloji

Danışman: Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Bu çalışmada, sığır sütlerinden *Brucella abortus* ve *Listeria monocytogenes* suşlarının moleküler tanısı için PCR koşullarının optimizasyonu amaçlandı. Bu amaçla, süt içerisindeki bileşenlerin PCR üzerine inhibitör etkileri ve onların neden olduğu inhibisyonlardan koruyan protokoller incelendi. Bu araştırma Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Bakterilerin sütle fiziksel ilişkilerini belirlemek için, belli sayıda bakteri ile inokule edilmiş sütün çeşitli fraksiyonlarından canlı bakteri sayımları yapıldı. Bu deneyler, *B.abortus*'un sütte homojen olarak dağıldığını gösterirken, *L.monocytogenes*'in çoğunlukla sütün yağ fraksiyonunda yoğunlaştığını ortaya koydu. Bakteriyel DNA ekstraksiyonunun optimizasyonu için, belli sayıda bakteri ile inokule edilen yağlı ve yağsız süt örneklerinde spin-kolon tekniği ve kaynatma yöntemi kullanıldı. Yağlı ve yağsız sütteki Ca iyonlarının PCR üzerindeki etkisi, PCR'da kademeli konsantrasyonda Mg iyonları kullanılarak incelendi. Tüm reaksiyonlar, test edilen parametreler dışında, her bakteri için belli bir primer seti ve belli koşullarda gerçekleştirildi.

Kaynatma ile DNA ekstraksiyon yöntemi, özellikle yağlı sütte *L.monocytogenes* olmak üzere, her iki bakterinin PCR'ında spin-kolon tekniğine göre daha iyi sonuç verdi. PCR da artan Mg konsantrasyonları ile, elektroforezde daha belirgin bantlar elde edildi. Bu sonuç, sütteki Ca iyonlarının PCR üzerinde inhibitör etkisi olduğunu düşündürdü. DNA kaynatma metodu ile ekstrakte edildiğinde, yağlı ve yağsız sütte PCR'ın *B.abortus* için minimal saptama limitleri sırasıyla 370 ve 340 cfu/ml oldu. Aynı ekstraksiyon yöntemi ile *L.monocytogenes* için yağlı sütteki minimal saptama limiti 40 cfu/ml olarak bulundu. Sonuç olarak, farklı bakterilerin süt fragmanları ile etkileşimi farklı olabileceğinden, PCR için süttten örnekleme önemli olduğu düşünüldü. Ayrıca, kaynatma ile DNA ekstraksiyonu ve Ca'a göre yüksek Mg konsantrasyonunun, sütte bakteri tanısında PCR sonuçlarını olumlu olarak etkilediği anlaşıldı.

2010, 84 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Süt, *Brucella*, *Listeria*, PCR, İnhibitör

ABSTRACT

Master Thesis

PCR OPTIMISATION FOR DETECTION OF BRUCELLA and LISTERIA IN BOVINE MILK

Elif YETİLMEZER

Ankara University

Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. K. Serdar DİKER

In this study, the optimization of PCR conditions for the molecular detection of *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes* from raw cow milk was aimed. For this purpose, the inhibitory effects of milk ingredients on PCR and protocols that reverse the inhibitory effect were investigated. This study was performed in Molecular Microbiology Laboratory of Veterinary Faculty at Ankara University.

To detect physical interactions of bacteria with milk components, live bacterial counts were done from several fractions of milk experimentally inoculated with given concentrations of bacteria. These experiments showed that, while *B.abortus* homogeneously distributed in milk, *L. monocytogenes* mostly concentrated in fatty fraction of milk. For optimization of bacterial DNA extraction, spin-column technique and boiling methods were used for milk samples with and without fat, inoculated with given concentrations of bacteria. Inhibitory effect of Ca ions in milk with or without fat on PCR was investigated by using gradient concentrations of Mg ions in PCR. All reactions were performed with a particular primer set and a given condition for each bacteria, except tested parameters.

DNA extraction with boiling method gave better results than spin-column technique in PCR with both bacteria, particularly with *L.monocytogenes* in fatty milk. With increasing concentrations of Mg ions in PCR, better bands were obtained after electrophoresis. This result suggested that Ca ions in milk had inhibitory effect on PCR. When DNA was extracted by boiling method, minimal detection limits of PCR for *B.abortus* in milk with and without fat were 370 and 340 cfu/ml, respectively. Minimal detection limit for *L.monocytogenes* with same extraction method was 40 cfu/ml of fatty milk. In conclusion, it was suggested that sampling of milk for PCR is important since the different bacteria may interact with milk fragments. In addition, DNA extraction with boiling and high Mg ion concentration relative to Ca improve the outcome of PCR for detection of bacteria in milk.

2010, 84 Page

Key Words: Milk, *Brucella*, *Listeria*, PCR, Inhibitory

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, sistemli bir şekilde çalışmayı öğreten ve hayat görüşü ile beni aydınlatan danışman hocam sayın Prof. Dr. Serdar DİKER'e çok teşekkür ederim.

Öneri ve yorumları ile hep destek olan sayın Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, çalışmamın çeşitli basamaklarında bilgisini ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, yüksek lisansa başladığımdan beri yanımda olup, yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Bülent Baş'a, Araş. Gör. Dr. Seyda CENGİZ'e, Veteriner Hekim İnci Ülkü ÇELİK'e, Uzman Biyolog Ebru TORUN'a, sonsuz sabrıyla ve ilgisiyle hep yanımda olan Emre KOÇAK'a ve son olarak uzakta olsalar da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ELİF YETİLMEZER

ANKARA, 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	6
2. 1. Sütün Bileşimi ve Genel Özellikleri	6
2.1.1. Sütün Tanımı.....	7
2.1.2. Sütün Özellikleri ve Yapısı.....	8
2.1.3. Sütün Bileşimi.....	9
2.1.4. Sütün Yağlı Maddeleri.....	10
2.1.5. Sütün Azotlu Maddeleri.....	10
2.1.6. Süt Karbonhidratları.....	12
2.1.7. Süt Vitaminleri.....	12
2.2.Brucella ve Brusellozis.....	13
2.2.1. Hayvanlarda Hastalık Yapan Türler.....	13
2.2.2. Tarihçe.....	14
2.2.3. Etiyoloji.....	14
2.2.4. Epidemiyoloji.....	16
2.2.5. Patogenesis.....	18
2.2.6. Semptomlar.....	18
2.2.7. Teşhis.....	19
2.2.7.1. Klinik teşhis.....	19
2.2.7.2. Otopsi bulguları.....	19
2.2.7.3. Laboratuvar muayeneleri.....	20
2.2.7.4. Moleküler teknikler.....	21
2.2.8. Sağaltım.....	22
2.2.9.Koruma.....	22
2.3. Listeria ve Listeriozis.....	23
2.3.1. Tarihçe.....	23
2.3.2. Etiyoloji.....	24
2.3.3. Epidemiyoloji.....	25

2.3.4. Patogenesis.....	26
2.3.5. Semptomlar.....	27
2.3.6. Teşhis.....	28
2.3.6.1. Klinik teşhis.....	28
2.3.6.2. Otopsi bulguları.....	29
2.3.6.3. Laboratuvar muayeneleri.....	29
2.3.6.4. Moleküler teknikler.....	30
2.3.7. Sağaltım.....	31
2.3.8. Koruma.....	31
2.4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	32
2.4.1. PCR Kullanım Alanları.....	33
2.4.2. Mikrobiyolojik Çalışmalarda PCR.....	33
2.4.3. PCR Temel Aşamaları.....	34
2.4.3.1. Denatürasyon.....	34
2.4.3.2. Annealing (Bağlanma).....	34
2.4.3.3. Elongasyon (Uzama).....	35
2.4.4 Magnezyum İyonunun Etkisi.....	37
2.4.5. PCR İnhibitörleri.....	38
2.5. Kaynak Özetleri.....	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1 Materyal.....	43
3.2 Yöntem.....	43
3.2.1. Bakterilerin Üretilmesi ve Kontrolü.....	43
3.2.2. Bakteri Sayımı.....	45
3.2.2.1. Kültürden direkt sayım.....	45
3.2.2.2. Süt örneklerinden sayım.....	46
3.2.3. PCR Çalışmaları.....	47
3.2.3.1. Bakterilerin hazırlanması.....	47
3.2.3.2. DNA ekstraksiyonu.....	48
3.2.3.3. Primerler.....	50
3.2.3.4. PCR karışımı.....	50
3.2.3.5. PCR optimizasyonu için hazırlanan PCR karışımı.....	50
3.2.3.6. Amplifikasyon.....	51
3.2.3.7. Elektroforez.....	52
3.2.3.8. Örneklerin görüntülenmesi.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53
4.1. Biyokimyasal Test Bulguları.....	53

4.2. Bakteri Sayım Bulguları	54
4.2.1. Kültürden direkt sayım bulguları	54
4.2.2. Farklı ön işlemden geçirilen süt örneklerinden sayım bulguları.....	55
4.3. PCR Bulguları.....	57
4.3.1. Yağlı ve yağsız süttten sayım bulguları	57
4.3.2. Kültürden direkt elde edilen <i>Listeria monocytogenes</i> 'in PCR sonuçları.....	58
4.3.3. Yağlı süttten elde edilen <i>Listeria monocytogenes</i> 'in PCR sonuçları.....	59
4.3.4. Yağsız süttten elde edilen <i>Listeria monocytogenes</i> 'in PCR sonuçları.....	60
4.3.5. Yağlı süttten elde edilen <i>Listeria monocytogenes</i> 'in farklı MgCl ₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları	61
4.3.6. Yağsız süttten elde edilen <i>Listeria monocytogenes</i> 'in farklı MgCl ₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları	62
4.3.7. Kültürden direkt elde edilen <i>Brucella abortus</i> 'un PCR sonuçları.....	64
4.3.8. Yağlı süttten elde edilen <i>Brucella abortus</i> 'un PCR sonuçları.....	65
4.3.9. Yağsız süttten elde edilen <i>Brucella abortus</i> 'un PCR sonuçları.....	66
4.3.10. Yağlı süttten elde edilen <i>Brucella abortus</i> 'un farklı MgCl ₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları	67
4.3.10. Yağsız süttten elde edilen <i>Brucella abortus</i> 'un farklı MgCl ₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Brucella</i> spp.	14
Şekil 2.2. Kristal viyole ile boyanmış <i>Brucella abortus</i>	15
Şekil 2.3. Klasik bir PCR basamaklarının şematik gösterimi	36
Şekil 4.1. FTS içindeki <i>L. monocytogenes</i> 'in 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 132 bp DNA bantları	58
Şekil 4.2. Süt içindeki <i>L.monocytogenes</i> 'in 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 132 bp DNA bantları	59
Şekil 4.3. Yağsız süt içindeki <i>L.monocytogenes</i> 'in 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 132 bp DNA bantları.....	60
Şekil 4.4. Yağlı süttten spin kolon yöntemi ile elde edilen <i>L.monocytogenes</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü	61
Şekil 4.5. Yağlı süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen <i>L.monocytogenes</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü	62
Şekil 4.6. Yağsız süttten spin kolon yöntemi ile elde edilen <i>L.monocytogenes</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü.....	63
Şekil 4.7. Yağsız süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen <i>L.monocytogenes</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü.....	63
Şekil 4.8. FTS içindeki <i>B.abortus</i> 'un 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 337 bp DNA bantları	64
Şekil 4.9. Süt içindeki <i>B.abortus</i> 'un 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 337 bp DNA bantları	65
Şekil 4.10. Yağsız süt içindeki <i>B.abortus</i> 'un 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 337 bp DNA bantları.....	66
Şekil 4.11. Yağlı süttten spin kolon yöntemi ile elde edilen <i>B.abortus</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü	67
Şekil 4.12. Yağlı süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen <i>B.abortus</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü	68
Şekil 4.13. Yağsız süttten spin kolon yöntemi ile elde edilen <i>B.abortus</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü	69
Şekil 4.13. Yağsız süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen <i>B.abortus</i> DNA'larının farklı MgCl ₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonların oluşum nedenleri ve oranları.....	7
Çizelge 2.2. Bazı memeli türlerinin süt kompozisyonu (%)	9
Çizelge 2.3. Brucella türlerinin farklı ortamlarda yaşam süreleri.....	16
Çizelge 2.4. İnsanlarda hastalık yapan Brucella türleri ve özellikleri	17
Çizelge 2.5. Listeria infeksiyonlarında insanlarda görülen başlıca formlar	28
Çizelge 2.6. İnek sütünde bulunan bazı minerallerin miktarları	39
Çizelge 4.1. <i>L.monocytogenes</i> ve <i>B.abortus</i> suşları kullanılarak yapılan bazı biyokimyasal testlerin sonuçları	53
Çizelge 4.2. <i>L.monocytogenes</i> ve <i>B.abortus</i> 'un kültürden direk sayımından elde edilen ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)	54
Çizelge 4.3. <i>L.monocytogenes</i> 'in süt örnekleriyle yapılan ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)	55
Çizelge 4.4. <i>B.abortus</i> 'un süt örnekleriyle yapılan ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması).....	56
Çizelge 4.5. <i>L.monocytogenes</i> ve <i>B.abortus</i> 'un süttten direkt sayımından elde edilen ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)	57

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
bp	baz çifti
C	Sitozin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
cfu	Colony forming unit
CMT	California Mastitis Test
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMB	Eosine Methylen Blue
FISH	Fluoresan <i>in situ</i> hibridizasyonu
G	Guanin
g	Gram
Hg	Civa
HCl	Hidrojen klorür
H ₂ S	Hidrojen sülfid
kg	Kilogram
kkal	Kilokalori
L	Litre
LEB	Listeria Enrichment Broth
LPS	Lipopolisakkarit

mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µm	Mikromolar
µM	Mikromol
NaCl ₂	Sodum klorür
NaOH	Sodyum hidroksil
PAGE	Poliakliramid jel elektroforezi
PBS	Pepton Buffer Saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir)
T	Timin
TBE	Tris Borat EDTA
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy broth
TSI	Triple Sugar Iron
VP	Voges Proskauer
°C	Celcius

1. GİRİŞ

İnsan var olduğu sürece hayati fonksiyonlarından biri olan beslenmesini sürdürmeye devam edecektir. Bu amaç için ihtiyaç duydukları besin maddelerini ya bitkisel kaynaklardan ya da hayvansal kaynaklardan temin etmek zorundadırlar. 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. Bugün 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 vd 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 (Eralp 1974, 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 infeksiyon etkenlerinin yanı sıra, sistemik infeksiyon 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 Savaşı boyunca Brusellozis, Salmonellozis ve Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmeleri halk sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerdendir. Listeriozis, çiğ sütte bulunan *Listeria monocytogenes* adlı patojen bakteri tarafından oluşturulan ve ölümcül olabilen bir hastalıktır (McSweeney ve Fox 2008).

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 infeksiyonlarda izolasyon bakımından bazı olumsuzluklara yol açarlar. Ayrıca, bazı bakteriyel ve viral infeksiyonlarda, 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. Bu gibi olgularda, immünolojik testlere dayanan indirekt 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 et al 1988, Bilhehan 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 hayvan 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 (Goossens ve Kan 1981, Brown 1991).

Süt örneklerinin toplanması, diğer bazı biyolojik materyallere göre kolay ve masrafsız olduğu için, genomik DNA'nın süttten izolasyonu için geliştirilmiş olan yöntemler daha çok tercih edilmektedir. Örneğin kan örneklerinin temin edilebilmesi için, bu konuda eğitilmiş personele ve ekipmana ihtiyaç vardır ve kanın alınması hayvanlarda önemli bir stres faktörüdür. Bu nedenle verimlerde önemli ölçüde gerilemeler saptanmıştır (Lipkin ve

ark. 1993). DNA izolasyonunda kaynak olarak süt örneklerinin kullanılması ile bu sorun büyük ölçüde aşılabilir. Çünkü sütün temin edilmesi günlük işlerden biridir ve eğitilmiş personel, özel ekipman ya da yardım gerektirmemektedir (Lipkin ve ark. 1993).

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 sütün genomik DNA örneklerinin elde edilmesi mümkün olmaktadır (Lipkin ve ark. 1993, De ve ark. 2000).

Genel anlamda bütün gıda ürünlerinde çeşitli bakteriler bulunur. Bu bakterilerin türleri ve sayıları gıdanın özelliğine göre çeşitlilik gösterir. Bazı bakteriler vücuda yararlı, bazıları ise zararlıdır. Bazı bakteriler çiğ halde bulunan gıda ürününde insan sağlığı için tehdit oluşturur. Süt ve süt mamullerinde bulunabilen patojen mikroorganizmalar ciddi sağlık problemlerine yol açar. Bu sağlık problemleri salgınlara ve ölümlere yol açabilir. Örneğin 1993 yılında Fransa'da Salmonella'dan 273 kişi etkilenmiş ve 1 kişi hayatını kaybetmiştir. 1995 yılında Malta'da Brucella patojeninden 135 kişi etkilenmiş ve 1 kişi hayatını kaybetmiştir. Yine 1995 yılında İsviçre'de Salmonella patojeninden 25 kişi etkilenmiş ve 5 kişi hayatını kaybetmiştir (Baykal 2008).

Brucellozis, birçok sığır, koyun, keçi ve domuzu enfekte eden, üremeyi azaltan ve düşüğe neden olan yaygın bir zoonozdur. 6 Brucella türünün hepsi insanlarda patojen etkiye sahiptir. Bunlar, *Brucella abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* ve *B. canis'dir*. (Corbel et al. 1984). İnsanlara bulaşması, infekte hayvanlara dokunma veya kontamine olmuş süt ve süt ürünlerini tüketme ile gerçekleşir. (Young 1983, Wallach et al. 1994). Birçok ülkede yok etme programları uygulansa da, brucellozis hala birçok ekonomik soruna neden olmayı ve halk sağlığını tehdit etmeyi sürdürüyor.

Farklı Brucella türleri genetik olarak birbirine çok benzer. Saf bir tür olan *B. melitensis*, Verger ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. (Verger et al. 1985). Klasik bakteriyolojik tanımlama metotlarını için, Brucella organizmalarının birkaç hafta boyunca üretilmesi gerekir. Tanımlama işlemi, morfolojik, biyokimyasal ve serolojik özelliklere dayanır. Bu testler güvenilirliği sınırlar. Sık sık serolojik çapraz reaksiyonlarda *Yersinia enterocolitica*

ile karışır. Bu organizmaların yüksek patojenitesi yüzünden *Brucella* kültür işlemleri mükemmel tedbirler ile yürütülmelidir. PCR gibi nükleik asit'e dayalı tanımlama metotları, gelecekte teşhis için umut vaat eden çalışmalardır. *Brucella* türlerine ait membran protein genleri (Fekete et al. 1990a, Fekete et al. 1990b, Fekete et al. 1992), 16S rRNA genleri (Herman and Ridder 1992, Romero et al. 1998), insersiyon sekansları (Bricker and Halling 1994, Rijpens et al. 1996) ve protein genleri (Baily et al 1992, ouahrabi et al. 1993) kullanılarak, PCR çalışmaları *Brucella* türlerinin tanımlanmasında kullanılır.

Listeriosis insanda nadiren görülür ve en büyük sorun hastalığın rotasının bilinmemesidir (Gahan and Collins 1991). Fakat, salgınlar ve yapılan çalışmalardaki kanıtlar ayrıca fastfood ürünlerde *Listeria* spp.'nin varlığı gösteriyor ki, gıdalarla taşınma listeriozis'in ortaya çıkmasında önemli nedenlerdendir. Süt ve süt ürünleri *Listeria monocytogenes* kontaminasyonu ile ilgili olan ilk gıdalardır ve bu enfeksiyon için en fazla rapor edilendir (Rocourt 1994). *Listeria monocytogenes* çiğ süt örneklerinde % 2-5 civarında bulunmuştur, bunlar çevresel kaynaklardan kontamine olabilir, inek dışkılarında, toprak ve samanda bulunabilir (Bickley et al 1996).

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

Brucella ve *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 metotların başında gelen PCR'in son zamanlarda kullanımı yaygınlık kazanmıştır. Hızlı ve güvenilir sonuçlar için tercih edilmektedir. Fakat *Listeria* ve *Brucella*'nın sütte PCR ile tanımlanmasının bazı zorlukları vardır. Bakteriye hedef DNA'nın izolasyonu ve prosedür uygulamalarında, gıda bileşenlerinin inhibitör etkisi yapılan çalışmanın güvenilirliğini sınırlandırır. Sütün yapısında bulunan bazı komponentler, PCR'a inhibitör etkide bulunabilir.

Bu çalışmada sığır sütüne belli konsantrasyonlarda ilave edilen *Brucella abortus* ve *Listeria monocytogenes*'den genomik DNA elde etmek amacıyla, günümüzde yaygın olarak kullanılan Spin Kolon (Qiagen ekstraksiyon) yöntemi ile maliyetinin az olması ve daha az iş gücü gerektirmesi gibi avantajlara sahip olan kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Son yıllarda geliştirilen yeni gen teknolojileri, birçok alanda olduğu gibi veteriner araştırmalarında da büyük önem kazanmıştır. Bu tip çalışmaların ilk aşaması olarak da genetik materyalin izole edilmesi önem kazanmaktadır.

Bu çalışmadaki asıl amaç, kompleks gıda matrikslerinden direk PCR ile ilgili problemlerin araştırılmasıdır. Bu, muhtemel inhibitörlerin tanımlanmasını, PCR üzerine etkilerinin test edilmesini ve onların neden olduğu inhibisyonlardan koruyan prosedürlerin planlanmasını sağlar. Öncelikle, yağ içermeyen ve yağlı süt örnekleri hazırlanır ve lipidlerin PCR amplifikasyonu üzerine etkisi test edilir. Fakat önemli bir nokta da diğer gıda bileşiklerinin PCR'ı inhibe etmesidir, mesela kalsiyum. Kalsiyum ile PCR mix'inin önemli bir iyonu olan magnezyum arasındaki inhibisyon etkisini fark edebilmek için, farklı magnezyum konsantrasyonları denenerek PCR çalışmaları yapılmıştır.

Böylece, iki farklı ekstraksiyon metodu, farklı gram özelliklerine sahip bakterilerde kullanılarak karşılaştırma imkanı sağlamıştır. Ayrıca, PCR üzerine kalsiyum ve yağın inhibitör etkileri değerlendirilmiş ve magnezyum iyonu ile PCR optimizasyonu sağlanarak bundan sonraki çalışmalara yol göstermesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. SÜTÜN BİLEŞİMİ ve GENEL ÖZELLİKLERİ

Her yaş grubundaki insanların yeterli ve dengeli beslenebilmeleri için, yüksek protein kalitesine 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 Devletlerinde kişi başına düşen günlük protein miktarının hayvansal ürünlerden sağlanan kısmı % 68, Fransa'da % 65, İsrail'de % 54' tür (Coşkun 1995).

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 yaştaki 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 (Çizelge 2.1). Bu nedenle sağımdan tüketime sunulana kadar hijyenik kurallara dikkat edilmeli, modern teknoloji ve işletme metotları dikkatli ve titiz bir şekilde uygulanmalıdır.

Çizelge 2.1. Gıda kaynaklı infeksiyon 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
Pişirme-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 tanımlamış.

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 2000).

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 sütlerin 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 1994).

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 düğümcük şeklinde parçacıklardan

oluşan lor elde edilir. Bu da sütün azotlu kısmıdır ve albümin olarak adlandırılır. Nihayet loru 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 çizelge 2.1'deki gibi yayınlanmıştır,

Çizelge 2.2. Bazı memeli türlerinin süt kompozisyonu (%) (Fox ve McSweeney 1998)

Tür	Toplam Kurumadde	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	10,9	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 lt. sütün ağırlığı 1028-1039 gr. arasında değişmektedir. Bunun yaklaşık 905 gr.1 su, 129 gr.1 kuru maddedir. Kuru maddenin ise 35 gr.1 yağ, 94 gr.1 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 lt. sütün bileşiminde ortalama, 36 gr protein, 35 gr yağ, 47 gr laktoz, 650 kalori, 1500 Vitamin A, 1,2 gr kalsiyum bulunmaktadır.

2.1.4. Sütün Yağlı Maddeleri:

Sütte bulunan lipidler basit ve birleşik lipidler olmak üzere iki grup altında incelenir. Basit lipidler (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 0,3-0,5 gr 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 (Tayar ve Şen 2007).

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) Betaloktoglobulin.....	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 grupta 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).

2.2. BRUCELLA ve BRUSELLOZİS

Brusellozis, sığır, koyun, keçi, domuz ve geyik gibi hayvanlarda genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan Brucella grubu bakterilerin oluşturduğu zoonoz bir hastalıktır. Evcil hayvanlarda bulaşıcı yavru atma hastalığı olarak bilinen bu hastalığın, coğrafik bölgelere göre değişen “Akdeniz humması”, “Malta humması”, “Kıbrıs humması”, “Dalgalı humma” ve “Bang hastalığı” gibi pek çok ismi bulunmaktadır. Hastalığa neden olan Brucella cinsi içinde 6 Brucella türünün hepsi insanlarda patojen etkiye sahiptir. Bunlar, *Brucella abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* ve *B. canis*'dir. (Corbel et al. 1984, Anonim 2005a, Terzi 2006, Erol 2007). İnsan ve hayvanlarda ‘Brusellozis’i oluşturan bu etkenler, birbirlerine morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve serolojik olarak yakın bir karaktere sahiptirler. Adlarını, ilk izole eden araştırmacıya atfen Bruce (1887)'dan alırlar. Brucella bakterileri gram negatif, kokoid, hareketsiz, sporsuz, çomakçık tarzındadır. Kapsüllü olan bazı suşları bulunmaktadır. Genelde aerobiktirler. Besi yerinde kan, serum veya protein gibi maddelerin katılmasıyla iyi bir üreme gösterirler. (Witter ve O'Mera 1970, Erol 2007).

Hastalığı alan insanlarda brusellozis grip benzeri semptomlarla seyretmekte, ateş, terleme (özellikle gece), baş ağrısı, sırt ağrısı ve fiziksel güçsüzlük şekillenmektedir. Ciddi infeksiyonlarda merkezi sinir sistemi, kalp ve genital sistemde bozukluklar ortaya çıkmaktadır Bruselloziste semptomlar infeksiyondan 8-20 gün sonra meydana gelmekte ve kronik vakalarda 1 yıla yakın sürmektedir (Leclerc et al. 2002, Terzi 2006, Baykal 2008).

2.2.1. Hayvanlarda Hastalık Yapan Brucella Türleri

Kahraman vd (2007) hayvanlarda hastalık yapan Brucella türlerini kitaplarında aşağıdaki şekilde belirtmişlerdir,

Brucella abortus: Sığırların brusellozis'in etkenidir. Koyun, keçi ve insanlara da bulaşır. Birbirinden farklı 9 biyotipi bulunur.

Brucella melitensis: Koyun ve keçilerde hastalık oluşturur. Sığırlara da bulaşır. 3 biyotipi bulunmaktadır. İnsanlar için çok önemli bir zoonozun da nedenidir.

Brucella suis: Domuzlarda Brusellozis'in etkenidir. 4 biyotipi vardır.

Brucella ovis: Koçlarda epididimitis hastalığını oluşturur.

Brucella neotomae: Ağaç ratlarından izole edilmiştir.

Brucella canis: Köpeklerde brusellozis etkenidir.

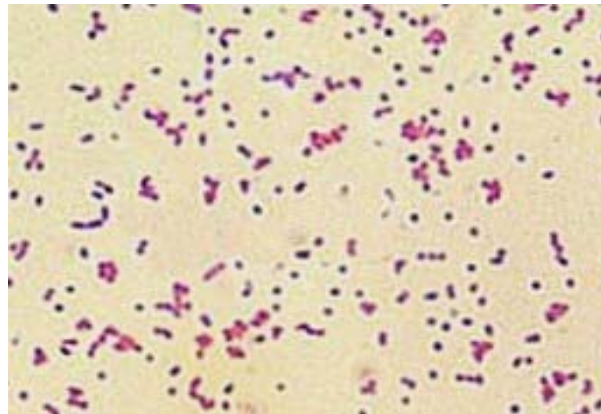
2.2.2. Tarihçe

Brusellozis, geçen yüzyılın başından beri bilinmektedir. Hastalığın bulaşıcı bir karakterde olduğu ancak 1880 yıllarına doğru anlaşılmış ve ortaya konulmuştur. Bang ve Stribolt (1895) fetal membranlar ile uterus sıvılarından saf Gram negatif basilleri ayırmışlardır.

Yurdumuzda ilk Brusellozis olgusunun saptanması Hüsamettin Kural ve Mahmut Sabit Akalın (1915) tarafından tespit edilmiştir. Hayvanlarda ise laboratuvar muayenesi sonucunda ilk Brusellozis olgusunu ortaya koyan Berke (1931) olmuştur (Arda vd 1997).

2.2.3. Etiyoloji

Küçük, kokoid, hareketsiz ve sporsuz çomakçıklar tarzındadır. Etkenin brownian hareketi oldukça belirgindir. Boyutları $0.5 \times 1 \mu\text{m}$ kadardır (Şekil 2.1). Hastalık olgularından yeni izole edilen ve S karakterindeki suşlarda kapsül tespit edilmiştir. En fazla kokobasil formunda karşımıza çıkarlar. Gram-negatiftir ancak düzensiz boyanma gösterir. (Özkuyumcu 2007).



Şekil 2.1 *Brucella* spp.(Anonim 2009a)

Etken ilk izolasyonlarında %10 CO₂'e gereksinim gösterir. Bu nedenle mikroaerofilik bir özelliğe sahiptir (Kahraman vd 2007). Hücre içi şartlara uyum sağlamıştır. Besin ihtiyaçları kompleksdir. Bazı suşlar aminoasit, vitamin, tuz ve glukoz içeren besiyerlerinde üretilirler. İnsan veya hayvan kaynaklı taze örnekler Trypticase Soy Agar (TSA) veya Kan kültür besiyerlerinde üretilirler (Özkuyumcu 2007). Besi yerlerine glukoz, ascites karaciğer ekstresi, kan, serum veya protein katılması üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Brucella etkenlerinin kültürleri için, genellikle katı besi yerleri kullanılır. Çünkü katı besi yerleri koloni oluşmasını sağladığı gibi dissosiasyonu da sınırlarlar. Bazı suşlar (*Br. abortus* biyotip-II) zorunlu serum gerektirirler. Hemolitik değildirler. Üremeleri ancak 2 günden sonra fark edilir ve maksimal gelişme 5-7 günde tamamlanır. 2-3 günlük koloniler, yuvarlak, konveks, kenarları düzgün ve 0.5 mm çapındadırlar (Arda vd 1997). (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Kristal viyole ile boyanmış *Brucella abortus*

Yansıyan ışıktaki hafif mavimsi-yeşil bir refle verirler (S formu). 6-7 günlük bir süre sonunda koloniler matlaşır ve dissosiyeye olmaya başlarlar. R koloni formundakiler yassı, daha büyük çapta, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. Sıvı besiyerinde yavaş ürerler. Homojen bir bulanıklık ve dipte de yumurta akı benzeri tortu yaparlar (Aydın vd 2006).

Brucella karbonhidratları kullanır fakat sınıflandırmada kullanılacak miktarda asit ve gaz oluşturamaz. İnsanları enfekte eden dört tür de katalaz ve oksidaz yaparlar. Birçok suş H₂S oluşturur. Nitratları nitrite indirgerler. Brucella ısıtmaya ve asitlere orta derecede hassastır (Özkuyumcu 2007).

Brucella grubu mikroorganizmalar, genellikle indol, jelatin, metil red ve VP reaksiyonları yönünden negatif bir durum göstermelerine karşılık nitrat ve katalaz pozitifdir. Şekerli besi yerlerinde gözle görülebilecek bir asit oluşumu sağlayamazlar. Suşların çoğunluğu oksidaz pozitif olup, üreaz testi hepsinde pozitifdir. Sitratlı besi yerlerinde üreme göstermezler (Aydın vd 2006).

Çizelge 2.3. Brucella türlerinin farklı ortamlarda yaşam süreleri (Kaynar 2008)

Ortam	Yaşam Süresi
Toprakta	10 hafta
Ahır tozlarında	6 hafta
Güneş ışıksız nemli toprakta	2 ay
Suda	10 hafta
Kontamine çiğ sütte 1 – 8°C	180 gün
Düşük yapmış hayvan fetusunda	75 gün
60°C	10 dakika
% 0,1 fenolde	15 dakika
Mide asidi	Öldürür
Isı, iyonize radyasyon, dezenfektanlara	Hassas
Pastörizasyon	10-15 dakika

2.2.4. Epidemiyoloji

Hastalığa süt hayvanı yetiştirilen hemen her ülkede sıkça rastlanmaktadır. Hastalık yavru atmaya, infertiliteye, genital organ infeksiyonlarına ve süt veriminin azalmasına neden olan bu hastalıkta fetüs, yavru zarları, uterus akıntıları, infekte süt ve sperma, bulaşık yem ve sular, atlarda cidago yaraları ve sığırlarda hygromalardan gelen akıntılar gibi maddeler hastalığa kaynaklık eder (Kahraman vd 2007).

Bulaşma yolları;

- İnfekte hayvanlardan direkt temas yoluyla,
- Pastörize edilmemiş ve kontamine süt ve süt ürünlerinin oral yoldan alınmasıyla,
- Solunum yoluyla,
- Oküler veya oral mukozadan penetrasyonla
- Brucella aşılama sırasında cilt yoluyla direkt inokulasyonla.
- İnsandan insana bulaşma nadirdir.
- Su ile geçiş gösterilememiştir (Kaynar 2008).

Testisleri iltihaplı olan infekte boğalar da hastalığın bulaşmasına neden olabilirler. Boğalar enfeksiyonu mekanik olarak nakletmelerinin yanı sıra kendilerinin de infekte olması sonucu, infekte sperma aracılığı ile sağlam dişilere bulaştırabilirler (Arda vd 1997).

Çizelge 2.4. İnsanlarda hastalık yapan Brucella türleri ve özellikleri (Özkuyumcu 2007)

Konak		CO ₂ İhtiyacı	H ₂ S Yapımı	Thionine	Basic Fuchsin
<i>B.abortus</i>	Sığır	+	+	-	+
<i>B.melitensis</i>	Koyun, Keçi	-	-	-	+
<i>B.suis</i>	Domuz	-	+	+	-
<i>B.canis</i>	Köpek	-	-	+	-

Doğal enfeksiyon öncelikle *Br.melitensis*den ileri gelir. Sporadik olaylarda ise enfeksiyonun etkeni *Br.abortus*'dur. Son yıllarda, Brucella vektör ve rezervuarları üzerinde çeşitli ülkelerde yapılan araştırmalarda, değişik familyalara bağlı türlerin hastalığın yayılmasında rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Hastalığın naklinde sinek, sivrisinek tahtakurusu, kene, pire gibi artropodalarla yabani tavşan, sıçan, fare gibi kemiricilerin de rolü olduğu bildirilmiştir (Aydın vd 2006, Erol 2007).

Brusellozis ülkemizde hem hayvanlarda hem de insanlarda ihbarı mecburi bir hastalıktır. Türkiye’de hayvanlarda brusellozisin prevalansını belirlemek amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 1998-1999 yılları arasında yapılan projede hastalığın prevalansı sığırlarda % 1.43, koyunlarda ise % 1.97 olarak bildirilmiştir (Anonim 2005b, Terzi 2006)

2.2.5. Patogenesis

Brusellozis’in en önemli özelliği bir retikulo-histiositer sistem hastalığı olması ve belli organ ve dokulara yerleşmesidir (Arda vd 1997). Vücuda girdikten sonra, lenfatik kanallar ve bölgesel lenf bezleri aracılığı ile ana lenf damarına (Ductus thoracicus) oradan da kan dolaşımına katılır. Kanda bakteriyemi sonucu kan yoluyla parankimatöz organlara taşınır. Lenf dokusu, karaciğer, dalak, kemikiliği ve retikuloendotelial sistemin diğer kısımlarında mikroorganizmaların neden olduğu granülatöz lezyonlar abse formlarına dönüşebilir. Brucella lezyonlarda hücre içinde bulunur (Özkuyumcu 2007). Etken, özellikle memelerde, gebe uterusu, lenf düğümlerinde, testislerde ve seyrek olarak da eklem, tendo kılıfları ve Bursalara yerleşir (Aydın vd 2006).

Endokardit sonucu ölüm ortaya çıkabilir, mortalite % 5 civarındadır. Kronik nörolojik hastalıklara neden olabilir bu ise mortal seyredir. Erkek kadın oranı 5/2,3 şeklindedir. Yaşlılarda kronik enfeksiyon oluşur (Özkuyumcu 2007).

2.2.6. Semptomlar

Brusellozis’in inkubasyon süresi 10-250 gün arasında değişir. Sığırlarda başlıca klinik bulgular yavru atma, kısırılık, mastitis ve orşitis’tir. Abortus (yavru atma) en belirgin semptomdur. Genellikle gebeliğin 6-8. aylarında meydana gelir. Plasentanın içeride kalması, ölü doğum ve sütün azalması abortus sonunda görülen bulgulardır (Kahraman vd 2007).

Aydın vd (2006) kitaplarında belirttiğine göre, koyun ve keçilerde, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde yavru atmalar görülür. İnfekte hayvanlarda abortusların dışında mastitis, genel düşüklük, zayıflama, bronşite bağlı kısa öksürük, eklem şişkinlikleri ve topallık tespit edilebilir. Bazı olaylarda plasenta içeride kalabilir ve sepsisemilere ve kısırılığa yol

açabilir. Abortusdan önce hastalık etkeni süt ve idrarla dışarı çıkar. Abortusdan sonra ise uterus akıntıları ile saçılır. Akut olaylarda mastitis, topallık ve higroma görülen belirtiler arasındadır.

Mastitis olaylarında memelerin klinik görünüşü normal olmasına rağmen sütün fiziksel yapısında değişiklikler şekillenebilir. Süt, sağılınca kolayca pıhtılaşır. Süt salgısı önemli ölçüde azalır ve sütün renginde de değişimler gözlenir (Arda vd 1997).

Otopside, plasenta üzerinde akut, subakut veya kronik bir yangı gözlenir. Plasentalar kalınlaşmış ve fibrinli bir irinle örtülmüştür. Bazen kan lekeleri görülür, uterusu fibrinli bir iltihap bulunur. Atık fötüsün mide ve bağırsaklarında iltihaplar gözlenir ve içinde kirli-sarı beyaz renkte sümüksü bir sıvı bulunur. Dalak ve lenf bezleri şişkindir. Üzerinde küçük beyaz nekroz odakları vardır. Erkeklerde testis, testisi saran katman ve testis kordonunda değişik derecede nekrozlu ve irinli bir iltihap görülür (Aydın vd 2006).

İnsanlarda, kuluçka dönemi 1-6 hafta arasında değişmektedir. Ateş, kırıklık, halsizlik, terleme ve ağrılarla seyreden sinsi bir başlangıcı vardır. Ateş hastaların % 98'inde görülür ve genellikle öğleden sonra yükselir, geceleyin elbise değiştirecek derecede bir terlemeyle düşer. İştahsızlık, sinirlilik, halsizlik, zayıflama diğer önemli yakınmalardır. Kemik ve eklem ağrıları hastaların % 5'inde oluşur. Baş, ağrısı, depresyon ve halsizlik nöropsikiyatrik semptomlar arasında sayılabilir. Karın ağrısı, kabızlık, ishal, kusma gözlenir. Lenf bezi büyüyebilir ve dalak palpe edilebilir. Sarılıkla seyreden bir hepatit gelişebilir. Hareketler esnasında görülen ağrı ki, özellikle bu ağrı vertebra hareketlerinde ortaya çıkar, osteomyeliti gösterir. Bu semptom ve bulgular haftalar ve aylar boyunca subklinik olarak devam eder. Ancak lokalize lezyonlar gözlenebilir (Özkuyumcu 2007, Erol 2007).

2.2.7. Teşhis

2.2.7.1. Klinik Teşhis: Hasta ineklerin klinik teşhisi zor hatta mümkün değildir. Abortusa neden olan çeşitli hastalık ve nedenler vardır. Yavru atımları gebeliğin son dönemlerine rastlaması sonucu brusellozdan şüphelendirir (Kahraman vd 2007).

2.2.7.2. Otopsi Bulguları: Fötüs ve plasenta üzerinde lezyonlar teşhise yardımcı olur (Arda ve ark. 1997).

2.2.7.3. Laboratuvar Muayeneleri: Kahraman vd (2007)'ye göre, hastalığın kesin teşhisi, yeni atılmış fötüslardan alınan marazi maddeler, kan, serum, süt, plasenta, sperma, vajinal sıvı, idrar ve organlarda tekniğine göre uygun olarak alınan materyallerle laboratuvarda yapılacak bakteriyolojik ve serolojik muayeneler sonucu konulur.

A. Bakteriyoskopi: Otopsi materyallerinden modifiye Ziehl-Neelsen ve Köster yöntemleriyle boyanarak muayene edilir (Kahraman vd 2007). Brucellalar mavi zemin üzerinde kırmızı renkte görünürler. Brucella etkenlerini ayırmada Gram ve Stamp gibi diğer boyama tekniklerinden de yararlanır (Aydın vd 2006).

B. Kültür: Brusellozis'li hayvanlardan alınan çeşitli marazi maddelerden besiyerlerine ekimler yapılır. Genellikle katı besi yerleri kullanılır. Çünkü katı besi yerleri koloni oluşumunu sağladığı gibi dissosiasyonu da sınırlar. Brucella'ların izolasyonunda Serum dekstroz veya Tween dekstroz agar ve kontaminasyondan şüpheli materyalin kültüründe ise antibiyotik katılmış besi yerleri kullanılır. Ekiminden sonra etkenin üremesi için petri kutuları % 10 CO₂'li etüve yerleştirilirler ve 1 hafta süre ile üremeye bırakılırlar. Üreyen koloniler morfolojik, kültürel, biyokimyasal, boya testleri, hayvan inokulasyonu ve serolojik yönlerden muayene edilerek etkenin kesin identifikasyonu yapılır (Kahraman vd 2007).

C. Hayvan Deneyi: Elde edilen kültürler ve kontaminasyon ihtimali olmayan marazi maddeler kobaylara intraperitoneal olarak, kontamine olan materyal ise subkutan veya kas içi olarak şırınga edilirler. Süt ve idrar gibi kontamine materyaller için kobay inokulasyonu direk kültür yöntemine oranla daha iyi sonuç vermektedir (Aydın vd 2006).

D. Serolojik Testler: Arda vd (1997)'ye Brusellozis'in laboratuvarında teşhisi, genellikle seroloji üzerine dayanmaktadır. En az 2 hafta aralıklarla 3 serolojik metodun uygulanmasıyla birlikte alerjik muayenelerin yapılmasının gerektiği bütün araştırmacıların ortak görüşüdür. Arda vd (1997)'nin kitaplarında belirttiği gibi yapılan serolojik testler aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1) Aglütinasyon testleri: Kan ve kan serumu ile yapılan aglütinasyon, süt serumu ile aglütinasyon, vaginal mukusla aglütinasyon, semina plazma ile aglütinasyon.

2) Sütle yapılan ring testi (Halka testi): Bu test için hematoxyline ve Triphenyl tetrazolium'la boyanmış iki çeşit antijen kullanılır. Genellikle inek sütleri için

hematoxylene, koyun ve keçi sütleri için ise tetrazolium'la boyanan antijenler kullanılmaktadır.

3) Komplement fikzasyon testi: Tüpte yapılan yavaş aglütinasyona oranla daha spesifiktir.

4) Coombs (Antiglobulin) testi: Bu yöntem tek reseptöre sahip incomplete antikorların antiglobulin serum aracılığı ile, antijenle birleşip flakonlar teşkil ederek çökmesi esasına dayanır.

5) Pasif hemaglutinasyon testi: Birçok araştırmacıya göre bu yöntem spesifik ve duyarlı bir testtir.

6) Floresan antikor tekniği: Spesifik ve duyarlı olan bu test de, özellikle sığır Brusellozis'inin teşhisinde son zamanlarda oldukça çok kullanılan bir tekniktir.

7) Diğer testler: Oponocytophagic test ve Meinieke reaksiyonundan, seroring testten ve son yıllarda ELİSA testinden de Brusellozis'in teşhisinde yararlanılmaktadır.

E. Bakteriyofaj Testi: Günümüze kadar gübre, fötüs, Brucella stok kültürleri ve insan kanından çeşitli araştırmacılar tarafından çok sayıda faj izolasyonu yapılmıştır. Fakat Rusya'da izole edilmiş olan Tibilisi veya kısaca Tb denilen faj referans olarak tip tayininde geniş çapta kullanılmaktadır. Ayrıca Weybridge ve Berkelay fajları da son zamanlarda referans faj olarak kullanılmaktadır (Arda vd 1997).

F. Alerjik Testler: Arda vd (1997)'ye göre, bazı ülkelerde sığır, koyun, keçi ve domuz Brusellozis'ini ortaya çıkarmak için alerjik testler kullanılmaktadır. Bazı ülkelerde serolojik testler ile birlikte kullanılmaktadır. Alerjik testler koyun ve keçilerde sığırlardan daha iyi sonuç verir.

2.2.7.4. Moleküler Teknikler: Fenotipik tiplendirme yöntemleri gibi moleküler yöntemler de suşların tanımlanmasında oldukça önemlidir. Moleküler tabanlı tanı yöntemlerinin gelişmesi ile virulens özellikler gen düzeyinde saptanmaya başlanmıştır. N-terminal aminoasit sekans analizi, DNA sequencing, Southern blot ve hibridizasyon teknikleri ile Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılan moleküler teknikler arasındadır.

2.2.8. Sağaltım

Hasta hayvanların sağaltımı yoluna gidilmez. Hastalar ayrılarak mezbahaya sevk edilir. Tazminatlı infeksiyonlardandır (Kahraman vd 2007).

2.2.9. Koruma

1. Sürüye İnfeksiyon Sokmamak: Dışarıdan kontrolsüz ve muayenesiz herhangi bir çift tırnaklı hayvanı gerek sürüye ve ahırlara veya gerekse meraya koymamak gerekir (Arda vd 1997).

2. Reaktörleri Elimine Etmek: Çeşitli serolojik yöntemler uygulanarak hasta hayvanlar teşhis edilir ve sürüden ayrılır (Kahraman vd 2007).

3. Hijyenik Tedbirler: Serolojik olarak tespit edilen hayvanlar damızlıktan çıkarılıp kasaplığa sevk edildikten sonra barınaklar iyi bir dezenfeksiyona tabi tutulur. Kontamine materyallerin yok edilmesi ve dezenfeksiyonu hijyenik tedbirlerin başında gelir. İnfekte sütler kesinlikle kullanılmamalı ve kaynatıldıktan sonra gömülmelidir. Süt sağanlar bir hayvandan diğerine geçerken ellerini dezenfektan bir solüsyon içine sokmalıdır. Süt kapları iyice yıkanmalı ve dezenfekte edilmelidir. İnfekte hayvanın memesinden buzağılar emzirilmemeli ve suni olarak beslenenlere temiz ve mikropsuz süt verilmelidir (Arda vd 1997, Kahraman vd 2007).

4. Hayvanları Bağışık Kılmak:

a) Aglutinojen aşılar: Arda vd (1997)'nin belirttiğine göre, inaktif ve canlı olmak üzere 2 şekilde hazırlanmaktadır. İyi bir immunojen güce sahip oldukları gibi uzun süre bağışıklık da sağlarlar. Fakat bu aşılar, aşılu bir organizmada aglutinasyon veren antikorların oluşmasına neden olurlar. Bu durum profilaksi yönünden sakınca yaratmaktadır.

b) Aglutinojen olmayan aşılar: Genellikle çeşitli fiziko-şimik yöntemlerle inaktive edilmiş ve R formundaki bakterilerden hazırlanmışlardır. Bu gibi aşılar profilaksi yönünden, serolojik testleri etkileyecek aglutinasyon veren antikor oluşturmadıkları için yarar sağlarlar.

2.3. LİSTERİA ve LİSTERİOZİS

Listeria cinsi bakteriler insan ve birçok hayvan türleri için patojen mikroorganizmalardır. Doğada geniş bir alana yayılmışlardır; toprakta, bitkilerde, sebzelerde, 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, Kampelmacher 1988, Schwartz vd 1988, Uysal ve Anğ 2003).

Listeria'lar 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) yer almaktadır. Listeria'lardan *L. monocytogenes*, zoonotik özelliğe sahip bir bakteridir (Anonim 2008).

İnfekte insan ve çeşitli hayvanların (evcil ve yabani, memeli ve kanatlı) sekret, ekskret ve dokularında mikroorganizmayı izole ve identifiye etmek 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 attırmaktadır (Gelin ve Broome 1989, Pinner vd 1992, Oliver vd 2005, Uysal ve Anğ 2003).

2.3.1. Tarihçe

Arda vd (1997) 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 tanımladıklarını bildirmişlerdir.

Türkiye’de de enfeksiyonun varlığı yapılan birçok araştırma ile ortaya konulmuştur. Özcebe ve Doğuer (1945), Özgen (1952), İyigören (1952, 1954), Böğrün (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, meningo-en-sefalitis) rastlandığı açıklanmıştır.

2.3.2. 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 yanı sıra, korinebakterilere çok benzeyen kokoid formlara da sıkça rastlanır (Arda vd 1997, Anonim 2009b).

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 anaerob özellik gösterdiklerinden % 10 CO₂’li ortamda daha iyi ürerler. (Erol 2007, Anonim 2008).

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 tripsine duyarlı, diyalize olmayan, termolabil ve antijenik karakterde hemolizin sentezler (Anonim 2009b).

L. monocytogenes'in biyokimyasal aktivitesi oldukça değişik ve aynı zamanda da zayıftır. Karbonhidratların bazılarında (glikoz, maltoz, mannoz, salisin, fruktoz, dekstrin, nişasta) asit oluşturur. Ancak gaz meydana getirmez. Katalaz, metil red, Voges-preskauer reaksiyonları, eskulin ve hippurat hidralizasyon testleri pozitif, oksidaz, üre, jelatin, kazein ve süt hidrolizasyon testleri ise negatiftir. (Aydın vd 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-absorbsiyon testleriyle 17'den fazla sero alt gruba ayrılmıştır. *L. monocytogenes*, çeşitli antibiyotiklere (ampisilin, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin, sulfonamid) değişik derecede duyarlı, polimiksin-B'ye idrençlidir. Ayrıca, diğer fiziksel ve kimyasal maddelere de farklı derecelerde duyarlılık göstermektedir. Pastörizasyon sıcaklığında (65 °C de 30-40 sn, 75 °C de 10 sn) ölürlür. 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. (Anonim 2009b, Aydın vd 2006).

2.3.3. Epidemiyoloji

L.monocytogenes, aslında, çabuk yayılan ve epidemiler oluşturan bir mikroorganizma olmayıp sporadik olgular halinde ortaya çıkan infeksiyonlara yol açmaktadır. Ayrıca, insan ve hayvanlarda rastlanan bir çok olguda da gizli infeksiyonlar tarzında bir seyir gözlenmektedir (Aydın vd 2006).

Hastalığın çıkışında daha çok vücut direncini kıran predispoze faktörler rol oynar. Beslenme bozuklukları, viral ve paraziter infeksiyonlar 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, infekte 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 infeksiyon alınabilir. Mikroorganizma vücuttan infekte 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. (Anonim 2009b).

2.3.4. Patogenesis

Aydın vd (2006)'ya göre, hastalık hayvan türleri arasındaki değişik klinik belirtilerle ortaya çıkmaktadır. Şöyleki, visseral listeriozis, genellikle, monogastrik hayvanlar da (at, domuz) ve genç ruminantlarda, meningo-ensefalitis ergin ruminantlarda, listerial septisemiler ise gençlerde fazla görülmektedir. Meningo-ensefalitis genel olarak, pons, medulla oblongata, spinal kord'da lokalize olmuştur. Etkenin beyne ulaştığı ve sinirsel belirtilerle ortaya çıkan bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir. Gebe hayvanlar infeksiyonun 1-4. haftalarında yavrularını atarlar.

Listeriozis, evcil hayvanlarda meningo-ensefalitis, abortus, septisemi ve sığırlarda mastitis ile karakterize olan bulaşıcı, infeksiyöz ve zoonotik bir infeksiyondur. Meningo-ensefalitis sonucu durgunluk, yavaş hareket, diş gıcırdatma, körlük ve sinirsel belirtiler görülür. Septisemi tablosunda ateş, durgunluk, iştahsızlık ve diğer genel sepsis bulgularına rastlanır (Anonim 2009b).

İnsanlarda Listerioz'un, klinik olarak tanısı, organizmanın kandan cerebrospinal sıvıdan ya da olmazsa normal steril bir bölgeden alınması ile olur. Listeriozun belirtileri, septisemi, menenjit, ensefalit ve intrauterin veya gebelerde çocuk düşmesi (2. veya 3. ay) ya da ölü doğumlu sonuçlanan servikal enfeksiyonları içerir. Bu tür hastalıkların başlangıcında sürekli ateş içeren grip benzeri semptomlar gözlenir. Mide bulantısı, kusma, ishal gibi mide bağırsak belirtileri, listeriozun daha ciddi durumlarının başında gelir. Ağır listerioz durumlarına dair başlangıç zamanı bilinmemektedir fakat bu, birkaç gün ile 3 hafta arasında değişebilir. Mide bağırsak semptomlarına dair başlangıç zamanı da yine bilinmemektedir fakat 12 saatten fazla olduğu düşünülür (FDA U.S., 2010).

L. monocytogenes 'in bulaşıcı dozu bilinmemektedir, fakat bu dozun hastanın hassasiyetine ve suşa göre değiştiğine inanılır. Çiğ ve pastörize olduğu sanılan sütlerde toplam organizma sayısı 1000'den az bile olsa hassas insanlarda hastalığa neden olabilir. *L. monocytogenes*, mide bağırsak epitel yapısına hücum edebilir. Bakteriler, konakladığı yerin monosayt, makrofaz ve polimorfonuklear lökosit yapısına girdiği an septisemi adını alır ve gitgide üreyebilir. Septiseminin phagocytic hücrelerin iç çeperlerinde bulunması, beyine girişine ve gebelerde fetüse doğru bir geçişe izin verir. *L. monocytogenes* 'in hastalık yapıcı özelliği, hayatta kalma ve phagocytic konak hücrelerine merkezlidir (FDA U.S., 2010).

2.3.5. Semptomlar

Aydın vd (2006) tarafından bildirildiğine göre, genç koyunlarda infeksiyon 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 infeksiyon koyunlarda başlıca 3 klinik tablo ile ortaya çıkmaktadır (Arda vd 1997).

1. Meningo-ensefalitis: Hastalarda durgunluk, yavaş hareket, sürünün gerisinde kalma, bir yere yaslanma, yemleri çiğnememek ve ağızda unutmak, boyunda sertlik, diş gıcırdaması, ağızdan salya ve burun deliklerinden mukoid bir salgının akması; dudaklarda titreme ve yutma zorluğu ilk göze çarpan klinik belirtilerdir.

2. Septisemi: İnfeksiyonun 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.

3. Abortus: Listeria infeksiyonlarında 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.

Sığırlarda görülen semptomlar Aydın vd (2007)'ye göre, silaj yemlerin büyük bir önemi vardır ve çok fazla silaj verilmesi hallerinde listerial hastalanmalara rastlanılır. 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.

Erol (2007)'un kitabında bildirdiğine göre, insanlarda inkübasyon periyodu 1-90 gün arasında değişmekle birlikte, tipik inkübasyon periyodu sıklıkla 1-7 gündür. Çizelge 2.5 de Listeria infeksiyonlarının insanlarda görülen başlıca formları verilmiştir. Genel olarak listeriozda mortalite çocuklarda ve immunsupresif insanlarda %50, diğer gruplarda %25 civarındadır.

Çizelge 2.5. Listeria infeksiyonlarında insanlarda görülen başlıca formlar (Erol 2007)

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

2.3.6. Teşhis

Listerioz, ancak kandan, cerebrospinal sıvıdan veya dışkıdan kültür alınması ile olumlu bir şekilde test edilebilir (FDA U.S., 2010).

Hatalıkta kendiliğinden iyileşmelerin çok nadir olması ve infeksiyonun insanlara da bulaşması (zoonoz) nedeniyle, teşhis ve erken sağaltımın çok önemli rolü vardır (Arda vd 1997).

2.3.6.1. Klinik Teşhis: Arda vd (1997)'ye göre, klinik belirtilere dayanarak Listeriozis teşhisi koymak genellikle zordur. Benzer hastalıklarla da karışabilir. Bunlar arasında, enterofoksemi, beyin abseleri, brucellosis, vibriozis, ketozis, bradzot, loupig ill, akur gastro enteritis, zehirlenme, kuduz, viral ensefalitus, avitaminozis, coenurus cerebralis infeksiyonları sayılabilir.

2.3.6.2. Otopsi Bulguları: Listeriozis'de otopside görülen makroskopik bozukluklar hiçbir zaman patognomonik değildir. Histopatolojik bakıda, pons, medulla ve spinal korddan yapılan seksiyonlarda, perivasküler lökosit infiltrasyonuna, ödemli ve hemorojik alanlara rastlanır.

2.3.6.3. Laboratuvar Muayeneleri: Hastalığın laboratuvarında teşhis edilmesi için laboratuvara kan, serum, süt, ölen hayvanların karaciğer, dalak, pons, medulla oblongata ve spinal kordun anterior kısmı, aborte olmuş fetus, fetal membranlar ve uterus akıntıları gönderilir (Anonim 2009b).

A. 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 (Anonim, 2009b).

Son yıllarda marazi maddelerden yapılan frotilerde ve doku kesitlerinde fluoresan antikor tekniği yardımıyla etkeni görmeyi kolay olduğu ortaya konulmuş ve bir çok laboratuvarında bu yöntemden yararlanılmaktadır (Arda vd 1997).

B. Kültür:

1) Katı besiyeri: Kanlı agar (Merck 1.10886), serumlu glukozlu triptoz agar veya kanlı glukozlu triptoz agar (Anonim 2009b).

Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden ayrı ayrı buyyon içinde homojen bir süspansiyon (1/10) yapılır. Bu süspansiyonlardan özel besi yerlerine ekimler yapıldıktan sonra süspansiyonlar buzdolabı sıcaklığında (4°C) tutulurlar (soğuk zenginleştirme). Üreme oluncaya kadar bu süspansiyonlardan her gün ekimler yapılarak 37°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılır (Anonim 2009b).

2) Koloni morfolojisi: Listeria'lar katı besiyerlerinde 0.5-1.0 mm çapında parlak, şeffaf, yuvarlak, S-tipli ve dar hemolitik koloniler meydana getirir (Anonim 2009b).

3) Spesifik besi yeri: % 0.05 Potasyum tellüritli veya % 3.75 Kalium rhodanitli serumlu tryptose agar, thioglikolatlı veya beyinli besi yeri, % 0.2 glukoz + % 0.2 talyum asetat + 40 mg/ml nalidiksik asit+1/5000 furasin içeren serumlu triptoz agar (Anonim 2009b).

4) Buyyon kültürü: Sıvı besi yerlerine karaciğer ekstraktı, serum, kan ve az miktarda glukoz katılması üreme üzerinde olumlu etkide bulunur. *Listeria*'lar buyyonda homojen bir bulanıklık oluştururlar (Anonim 2009b).

5) İdentifikasyon şeması: *L.monocytogenes* glukoz (+), laktoz (d), ramnoz (d), maltoz (+), sakkaroz (d), mannitol (-), salisin (+), arabinoz (-), ksiloz (-), eskülin (+), H₂S (-), jelatin (-), VP (+), MR (+), katalaz (+), nitrat (-), üre (-), indol (-), sitrat (-), oksidaz (-), LDC (-), ODC (-), hareket (+) ve hemoliz (+) testleri ile identifiye edilir (Anonim 2009b).

C. Hayvan deneyi: Farelerde (subkutan ve intraperitoneal) ve tavşanlarda (intravenöz) deneysel Listeriozis 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 vd 1997, Anonim 2009b).

D. Serolojik testler: İnfekte hayvanlardan alınan kanla yapılan serolojik testlere fazla güvenilmez. Çünkü, *L. monocytogenes*, Stafilokok, Enterokok, *E. coli* ve Korinebakteri gibi bazı mikroorganizmalarla kros-reaksiyonlar verir. Hasta ve portör hayvanları ortaya koymada komplement fikzasyon, indirekt hemaglutinasyon ve agar jel difüzyon testlerinden yararlanılabilir. Aglutinasyon testinde de, ancak monospesifik ve absorbe serumlar kullanılmalıdır. Gerektiği durumlarda da ELİSA'dan yararlanabilir. (Arda vd 1997, Anonim 2009b)

E. Alerjik test: Hastaları veya infekteleri saptamada güvenilir bir allergen madde henüz elde edilip pratiğe konamamıştır. (Arda vd 1997).

F. Bakteriyofaj testi: İzole edilen etkenin kolonilerini, faj tiplerine ayırmada ve suşların identifikasyonunda, etkene özel fajlardan yararlanılabilir. (Anonim 2009b).

2.3.6.4. Moleküler Teknikler: Fenotipik tiplendirme yöntemleri gibi moleküler yöntemler de suşların tanımlanmasında oldukça önemlidir. Moleküler tabanlı tanı yöntemlerinin gelişmesi ile virulens özellikler gen düzeyinde saptanmaya başlanmıştır. N-terminal aminoasit sekans analizi, DNA sequencing, Southern blot ve hibridizasyon teknikleri ile Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılan moleküler teknikler arasındadır.

2.3.7. Sağaltım

Aydın vd (2006)'ye göre, hastalar ayrılıp temiz bir yere alındıktan sonra, zaman kaybetmeden antibiyotiklerle sağaltıma alınırlar. Ne kadar erken sağaltıma başlanırsa (zellikle 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. Eğer varsa hayvanlara damar içi immün serum verilir.

2.3.8. 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 aşılardan henüz iyi bir sonuç alınamamıştır. Hastalık insanlara da bulaştığından hayvan bakıcılarının, veteriner hekimlerin ve diğer ilgili şahısların çok dikkatli bulunmaları gerekir. İnfeksiyon çıkan yerlerde çok iyi bir dezenfeksiyon uygulanır, altlıklar yakılır, aborte olmuş l hayvanlar, plasenta ve uterus akıntıları açıkta bulundurulmaz, yakılır veya gömülür. Dışarıdan içeri kontrolsüz hayvan sokulmaz. İnfeksiyon kaynakları ortadan kaldırılır ve portrler ayıklanır. (Arda vd 1997).

2.4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR bakteri, virus mantar, parazit, protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nukleik asit zincirlerinin primer adı verilen spesifik komplementer oligonukleotidler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (Taq ya da Tth polimeraz) kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan oldukça özgül ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir. (Schochetman ve Jones 1988, Erlich vd 1991, Diallo vd 1998). Bu hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta birçok veya sayısız diğer veya ilgisiz DNA'lar arasında olsalar bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve kolayca identifiye edilebilirler. (Schochetman ve Jones 1988, Arda 1995).

Şüpheli hastalık materyallerindeki mevcut nukleik asit fragmentlerinin sayısının artırılması ya da amplifikasyonu (çoğaltılması) temeline dayanan PCR "1989 yılının en önemli bilimsel gelişmesi" olarak kabul edilmiştir. (Scharf vd 1986, Schochetman ve Jones 1988) Teknik ilk kez, 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından hemoglobopatilerin tanısında kullanılmış ve infeksiyöz hastalıklarda DNA problemlerinin kullanılmasıyla diğer genetik hastalıkların, infeksiyöz hastalıkların ve kanser vakalarının teşhisinde de kullanılabilceği bildirilmiştir. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanılarında yeni bir çığır açmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nden Cetus Corporation'da çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Metod basitçe tüpte nukleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. Bu buluşundan dolayı K. Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır. Sonuç olarak, rekombinant DNA teknolojisindeki önemli gelişmeler biyolojik araştırmalara, tıbbi uygulamalara yeni bir boyut kazandırarak yeni tekniklerin kullanılmasına imkan sağlamıştır (Çiftçi 2004).

PCR, bir çeşit "in vitro klonlama" yöntemidir. PCR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); takiben sırasıyla sentetik oligonukleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyonu) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir (Sambrook ve Russel 2000).

PCR tekniği ile bir DNA hedefini 10^6 - 10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgül, bu bölgedeki baz dizilerine

tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği, özel bir DNA dizisi seçip-çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. Bu özellik, sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, buna ek olarak DNA'nın analiz edilmesini de sağlar. (Saiki vd 1988, Kwok ve Higuchi 1989).

2.4.1. PCR Kullanım Alanları

O'Connor (2006) kitabında PCR'ın başlıca kullanım alanlarını şu şekilde sıralamıştır:

1. Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
2. Prenatal tanıda,
3. Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması,
4. Adli tıpta,
5. Onkogenesisin araştırılmasında,
6. Probe'ların oluşturulmasında/klonlamada/gen ekspresyon araştırmalarında,
7. DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
8. Bilinmeyen dizilerin tayininde,
9. Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında,
10. Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm Analizinde,
11. Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması,
12. DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir.

2.4.2. Mikrobiyolojik Çalışmalarda PCR

1. Kültürünün yapılması, izolasyonu ve identifikasyonu çok zor veya yapılamayan mikroorganizmaların teşhisinde,
2. Toksin oluşturan ajanların, saptanması güç olan toksinlerin ortaya konulmasında,
3. Antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olan bakterilerin belirlenmesinde,

4. Mikroorganizmalar içinde alt tiplerin saptanmasında,
5. Gıdalarda, sularda ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında,
6. Diğer mikrobiyolojik araştırmalarda (moleküler immunoloji ve epidemiyoloji, parazitoloji, bakteriyoloji, viroloji v.s) (O'Connor 2006).

2.4.3. PCR Temel Aşamaları

PCR Teknolojisi için:

1. DNA örneği, genelde genomik DNA,
2. Çoğaltılacak olan bölgeyi ileri ve geri çevreleyen bir çift sentetik primer,
3. dNTP'ler (A,T,C,G),
4. Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi,
5. Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

Tipik bir PCR üç temel basamakta gerçekteşir:

2.4.3.1. Denatürasyon

Test ortamında buffer, dört tur Deoksinükleotid Trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), hedef DNA'ya spesifik olan sentetik tek iplikçikli primer olarak isimlendirilen (15-30 bazlık) oligonükleotidler, ısıya dayanıklı bir enzim olan Taq polimeraz ya da Tth polimeraz varlığında, ısı ile çift iplikçikli kalıp DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Bu aşamada ısı yaklaşık olarak 91-94°C olup; 1-2 dakika sürmektedir. (şekil 2.3.). DNA yapısının zarar görmesi halinde, PCR boyunca hatalı nükleotidler çoğalacağından bu da reaksiyonun güvenilirliğini olumsuz yönde etkileyeceğinden, çok yüksek ısı uygulamalarından kaçınılmalıdır. Plazmid DNA'sının tamamen parçalanmasının önlenmesi amacıyla bu aşama için 1-2 dakika yeterlidir (Anonim 2007).

2.4.3.2. Annealing (Bağlanma)

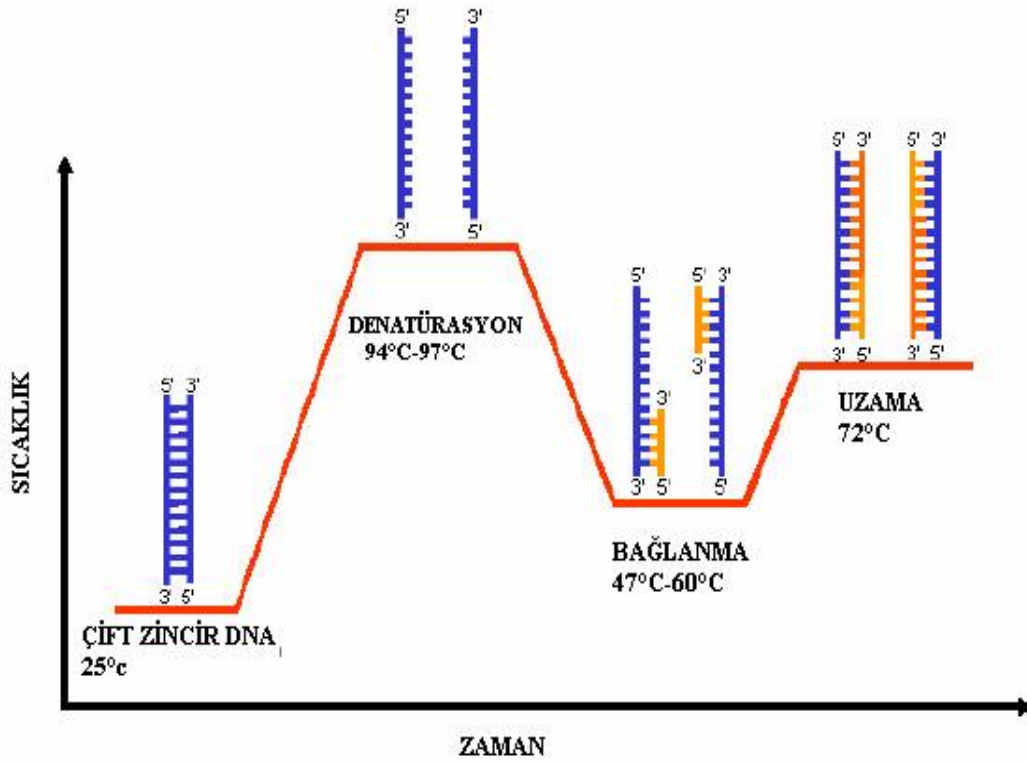
Birinci aşama sonucunda denatüre olarak tek iplikçikli hale dönüşen DNA sekanslarının her birinin 3'- uçlarındaki kendi eşlenikleri olan nükleotidlere uygun sıcaklıkta sentetik tek iplikçikli oligonükleotidlerin (primerler) bağlanması bu aşamada gerçekteşir. Isının birden bire

yaklaşık 50°C dolaylarına düşürülmesi ile primerler DNA matrisi üzerinde yoğunlaşır. İn vitro olarak DNA sarmalının sentezlenmesi de, belirli bir DNA matrisine komplementer yapıya sahip primerlerin tek iplikçikli DNA'ya bağlanması ile başlar ve bu kaynaşma sıcaklığı reaksiyonun seçiciliğinde anahtar bir değişkendir. Çoğaltılacak diziyeye bağlı olarak zaman ve sıcaklıkta kullanılan enzime göre değişmektedir. Bağlanma reaksiyonunun optimal ısı G + C miktarı ile doğru orantılı olup; kullanılan enzimin Taq polimeraz olması durumunda sıcaklık da 58-72°C' arasındadır. (Şekil 2.3.). (Anonim 2007).

2.4.3.3. Elongasyon (Uzama)

Isıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, primerleri ve kalıp olarak da tek iplikçikli DNA'yı kullanarak in vitro koşullarda çift iplikçikli DNA'nın sentezlenmesini sağlar. Reaksiyon 70-72°C'de, yani Taq DNA polimeraz enzimi için optimal olan sıcaklıkta, 2-3 dakikada tamamlanmakta olup; polimerizasyon işlemi 5 → 3 yönünde gerçekleşmektedir. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30 sn ile 3 dakika arasında değişir. (Şekil 2.3.). (Anonim 2007).

Sentezleme işleminin tekrarı için birinci periyodun sonunda sıcaklık tekrar yükseltilir (yaklaşık 94-95°C); çift sarmallı DNA tekrar denature edilir, soğutulur sonunda primerlerin bağlanması ve polimerizasyon aşamaları tamamlanır. Sentezleme işleminin başlangıcında polimeraz, primerlerin 3' OH grubu ile komplementer deoksinukleotidlerin 5'-fosfat grupları arasında fosfodiester bağı oluşturur. Böylece 5' → 3' yönünde DNA sentezi meydana gelir, PCR, her biri karşısındaki bir DNA bölümünün sarmalı ile birleşerek iki primer ile primer uzatılması prensibini kullanır. (Anonim 2007).



Şekil 2.3 Klasik bir PCR basamaklarının şematik gösterimi (Anonim 2007).

Termal cyclerin bu üç basamağı her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır. 25-40 döngü uygulanır. Klasik PCR normalde sayısal (quantitatif) bir değerlendirme ölçüsü değildir fakat quantitatife dönüştürülür. Jel elektroforez de ürünler karşılaştırılarak veya most probable number (MPN) yardımıyla sonuca ulaşılır. MNP yönteminde ardarda seyreltmeler ve MNP hesaplayıcısı kullanılır. Tercih edilmeyen bir yöntemdir. Bir diğer yöntem de competitive (karşılaştırmalı) PCR'dir. Karşılaştırmada delesyon veya insersiyon taşıyan örneklerle (farklı uzunlukta bant oluştururlar) elde edilen ürün jel elektroforezde karşılaştırılır. (Anonim 2007).

2.4.4. Magnezyum İyonunun Etkisi

İyi bir bağlanma meydana gelebilmesi için, ortamdaki Mg^{+2} iyon konsantrasyonunun yeterli olması gerekmektedir (Schochetman ve Jones 1988). Mg^{+2} konsantrasyonunun; primer bağlanması, denatürasyon, ürün spesifikliği, primer-dimer oluşumu ve enzim aktivitesini etkileme gibi özellikleri vardır. Tüm bunlardan dolayı reaksiyonda önemli bir bileşeni oluşturur. EDTA gibi bazı kimyasallar Mg^{+2} konsantrasyonunu değiştirir (Anonim 2007).

dNTP- Mg^{+2} kompleksi, nükleik asitlerde şeker-fosfat bağı ile etkileşir ve DNA polimeraz aktivitesini etkiler. Diğer benzer koşullar altında ama $MgCl_2$ konsantrasyonundaki değişiklik ile primer/kalıp çifti önemli ölçüde farklı davranır. Magnezyum iyon konsantrasyonunun etkisini ayarlamak için uygulanan stratejide, standart bir buffer belirlenir onun için 0.5 ve 5mM arasında çeşitli $MgCl_2$ konsantrasyonları vardır, genellikle 0.5 veya 1 mM basamaklarındadır. Reaksiyonda dNTP'lerin konsantrasyonu değiştirilirse, Mg^{+2} konsantrasyonunun da değiştirileceği unutulmamalıdır (O'Connor 2006).

Serbest Magnezyumu etkileyen faktörler şunlardır:

1. DNA örneği
2. Örnekte ajanların olması: EDTA/Sitrat/ Ca^{+2}
3. dNTP
4. Protein
5. Fazla magnezyum, enzimin spesifikliğini azaltır. Az magnezyum ise enzimin inaktif olmasına yol açar ve muhtemelen ürünler zayıf olacaktır.

Magnezyum solüsyonu, eritildikten sonra vortekslenir. Bu uniform bir solüsyon elde etmek için yapılır. Basit ama gereklidir. Çünkü $MgCl_2$ çöker (O'Connor 2006).

PCR'da Magnezyum konsantrasyonunun etkilediği komponentler şunlardır:

1. Primer yapışması
2. PCR ürünü ve kalıpların dissosiasyonu (birleşip ayrılmaları)
3. PCR ürününün spesifikitesi
4. Primer-dimer artefaktların oluşması
5. Taq polimeraz enzim aktivitesi (Taq-polimeraz enziminin çalışabilmesi için serbest magnezyum olması gereklidir.) (O'Connor 2006).

2.4.5. PCR İnhibitörleri

PCR, bazı nedenlerle inhibe edilebilir. Bunlar şöyle sıralanabilir:

1. Ortamda RNA düzeyinin yüksek olması (Ortama eğer, RNase eklenirse, elde edilecek PCR ürün miktarı artış gösterir).
2. EDTA'nın yüksek konsantrasyonda olması, PCR'ı Mg^{+2} 'u bağlaması nedeni ile inhibe eder.
3. Heparinin ortamda bulunması, PCR'ı inhibe eder.
4. Ortamda fenol kalıntısının bulunması PCR'ı inhibe eder.
5. DMSO'nun ortamda % 10 konsantrasyonda olmasıyla, PCR % 50 oranında inhibe olur.
6. Urasil konsantrasyonunun yüksek olması
7. Uzun süre UV ışığa maruz kalan "mineral oil", PCR'ı inhibe eder.
8. PCR komponentlerinin konulduğu tüplerin yapısı da PCR etkinliğini etkiler.
9. Upstream nokta mutasyonları ile DNA'da kompresyon oluşabilir, bu da PCR oluşumunu engelleyebilir. Bu özellikle, mikro delesyon ve/veya insertionların olduğu durumlarda ortaya çıkabilir (O'Connor 2006).

Her yeni PCR protokolünde bileşenler optimize edilmelidir. Herhangi bir değişiklik (olan değişimler; primer dizaynı, deoksiribonukleotit bileşimi, kalıp nükleik asit ve kullanılan termostable DNA polimeraz) amplifikasyon spesifikliğini etkileyebilir. Bütün PCR içerikleri steril bir odada dondurucu içinde saklanmalıdır. Steril odada reaksiyon karışımları ve içeriklerinin kontaminasyondan korunması için kesin kurallar uygulanmalıdır (Palt Verkuil 2007).

Süt kalsiyum, fosfor, magnezyum, potasyum, çinko gibi mineraller için iyi bir kaynaktır (McCance ve Widdoson 1988). Çizelge 2.4'de bu minerallerin miktarları gösterilmiştir. Sütün mineral içeriği hayvanın fizyolojik durumu, laktasyon durumu, çevresel faktörler ve genetik faktörler, süte uygulanan bazı işlemler gibi birçok durumdan etkilenmektedir (Miller vd 2000, Baysal 2004).

Çizelge 2.6. İnek sütünde bulunan bazı minerallerin miktarları (100 gr süt için) (Miller vd 2000)

SÜT ÇEŞİDİ	Sodyum (mg)	Potasyum (mg)	Kalsiyum (mg)	Magnezyum (mg)	Fosfor (mg)	Demir (mg)	Çinko (mg)
Tam yağlı,taze	50	150	120	12	95	0.05	0.35
Sterilize	50	140	120	12	95	0.05	0.35
UHT (uzun ömürlü)	50	140	120	12	95	0.05	0.35
Yağsız, taze	180	500	380	38	270	0.29	1.2

Süt içerisinde yüksek oranda bulunan mineraller, özellikle kalsiyum iyonu, ayrıca protein ve yağ PCR çalışmalarında amplifikasyon etkisini düşürebilir. (Rossen vd 1992, Bickley vd 1996).

PCR inhibitörleri bir veya birkaç mekanizma ile PCR üzerinde etkili oluyor; (Wilson 1997)

1. Hücre liziz basamağını engeller.
2. Nükleik asitleri degrade eder veya tutar.
3. Isıya dirençli DNA polimerazı inaktive eder.

Abu Al-Soud ve Radstrom (1998) makalelerinde, PCR inhibitörü olan belli bir kaç bileşen arasında; safra tuzu ve dışkıdaki kompleks polisakkaritler (Lantz 1997, Monteiro 1997), kandaki heme (Akane 1994), topraktaki humic maddeler (Tsai 1992), sütteki proteinaz (Powell 1994) ve idrardaki üreyi (Khan 1991) belirtmişlerdir. PCR inhibitörlerinin etkilerini en aza indirmek ve/veya PCR inhibitörü olan mikroorganizmaları ayırmak için birçok teknik geliştiriliyor. Örneğin, aqueous 2 fazlı sistemi (Lantz 1994), kaynatma (Olcen 1995), yüksek hacimli santrifugasyon (Lindqvist 1997), dilüsyon (Chernesky 1997), DNA ekstraksiyon metotları (Klein 1997), zenginleştirme (Wernars 1991), filtrasyon (DiMichele 1993) ve immünolojik teknikler (Fluit 1993) PCR'ı kolaylaştırır.

2.5. KAYNAK ÖZETLERİ

Listeria ve *Brucella*'ların süttten PCR ile aranmasında etkili olan inhibitörler ile ilgili az sayıda araştırma mevcuttur. Bu yüzden konuyla ilgili farklı bakteriler ile yapılan çalışmalara da tarih sırasına göre yer verilmiştir.

Golsteyn Thomas vd (1991) yaptıkları çalışmada, *Listeria monocytogenes*'i süt ve sığır etlerinden PCR ile teşhis etmişlerdir. Bu işlem, kültürlerin listeria enrichment broth (LEB)'da zenginleştirilmesi sonra LEB'den alınan kültürlerin petrillerdeki listeria besiyerine aktarılması ve DNA ekstraksiyonu sırası ile gerçekleştirilmiştir. PCR için listeriolysin O gene komplementer 5 oligonükleotid kullanılmış ve uyguladıkları protokolün çok duyarlı olduğunu bulmuşlardır. 10 ml süt ve 25 gr sığır etine, *L.monocytogenes*'in 0 dan 10^5 CFU ml⁻¹ /g⁻¹ arasında inokule edilen konsantrasyonları yeterli olmuş. 24 saat LEB içinde kültürlerin zenginleştirilmesi, listeria besiyerinde üretme aşamalarının, 1 ml sütte veya 1 gr sığır etlerinde *L.monocytogenes*'in 0.1 CFU kadar az bulunmasında bile teşhisinin yapıldığını bulmuşlardır.

Bickley vd (1996), *Listeria monocytogenes*'in süttten PCR ile teşhisini yapmışlar ve sütte bulunan bazı bileşenlerin PCR'ı inhibe ettiğini göstermişlerdir. PCR inhibisyonunun yağlı, yarım yağlı ve yağsız sütte de meydana geldiğini, sütteki yağın inhibisyon üzerinde çok da fazla etkili olmadığını göstermişlerdir. Özellikle kalsiyum iyonunun inhibisyon etkisi üzerine çalışılmış ve bu etkiyi test etmek için farklı kalsiyum klorid solüsyonları ile bu etkiyi yok etmek için farklı magnezyum konsantrasyonları hazırlanarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu için ise cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) metodu kullanılmıştır. Reaksiyondaki çeşitli miktarda süt sonuçlarındaki kalsiyum/magnezyum deneyleri ile bu iki iyon arasında aynı değerlikli olmalarından dolayı yarışmalı bir etkileşim olduğu ve PCR sonuçlarının her iki iyonun konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir.

Abu Al-Soud ve Radstrom (1998) çalışmalarında, PCR inhibitörleri varlığında amplifikasyon için 9 ısıya dayanıklı DNA polimeraz kullanmışlardır. Kompleks biyolojik örnekler, *Thermus aquaticus*'dan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimerazın kapasitesini düşürdüğü görülmüş. *Listeria monocytogenes* için PCR'a dayalı araştırmalar yapılmış, saf kalıp DNA konsantrasyonundaki artışa etkileri çalışılmış ve farklı konsantrasyonlardaki inhibitör örnekler eklenmiş. Kalıp DNA konsantrasyonu arttırılarak inhibitör etkinin

üstesinden gelinmeye çalışılmış, farklı konsantrasyonlarda eklenen inhibitör örnekleriyle 9 polimerazın amplifikasyon kapasiteleri değerlendirilmiştir. Kan, peynir, dışkı, et örneklerine çeşitli iyonlar gibi farklı ısıya dayanıklı DNA polimeraz içeren PCR mixleri eklenmiş ve karşılaştırılmış. Araştırma sonucunda, *Thermus aquaticus*'dan elde edilen AmpliTaq Gold ve Taq DNA polimeraz %0.004 (vol/vol) kan içerisinde tamamen dururken, HotTub, Pwo, rTth ve Tfl DNA polimeraz %20 (vol/vol) kan içerisinde DNA amplifikasyonuna devam etmiş. *Thermotoga maritima*'dan (Ultma) elde edilen DNA polimeraz; peynir, dışkı ve et örneklerinde en hassas PCR inhibitörü olarak bulunmuş. K ve Na iyonlarının 9 polimeraz üzerine inhibitör etkisinde, HotTub (*Thermus flavus*'dan) ve rTth (*Thermus thermophilus*'dan)'ın en direçli olduğu bulunmuş. Yapılan çalışmada, biyolojik örneklerdeki belli orandaki inhibitörler, ısıya dayanıklı uygun DNA polimerazlar kullanılarak giderileceği gösterilmiştir.

Bendek vd (2002) çalışmalarında, sığır mastitine neden olan *Streptococcus agalactiae*'nin çığ süttten PCR ile teşhisini yapmışlardır. Kanlı agarda üretilen koloniler, duyarlılığı arttırmak amacıyla 1 ml örnek için 1 ml Strep Select Broth içinde tüm gece 37°C'de inkübasyona bırakılmış. Zenginleştirme basamağından sonra DNA ekstraksiyonuna geçilmiş ve hücreler lizozim ve proteinaz K ile muamele edilmiştir. Ekstraksiyon basamağının devamında fenol, kloroform:isoamil alkol ve etanol uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, zenginleştirme basamağı uygulanmayan farklı CFU miktarlarındaki örneklerde 10^4 - 10^5 cfu/ml ve daha fazla miktarı PCR için iyi sonuç verirken, zenginleştirme yapılan örneklerde bu oran 1 cfu/ml'ye kadar düştüğü gözlenmiştir.

Wu ve Kado (2004), *Escherichia coli* O157:H7 bakterisinin süt örneklerinden filtrasyon tekniği kullanılarak PCR ile analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, *E. coli* O157:H7 Luria-Bertani (LB) besiyerinde zenginleştirilmiş ve por membrandan geçirilmiştir. Filtreden geçirilen membran lizis buffer ile muamele edilmiş ve bakteriyel DNA serbest kalmıştır. Çalışma sonucunda filtrasyon süresinin DNA oluşumu için 20 dakikadan az ve PCR tespitinde 1 ml süt için bakteri sayısının da 10 cfu kadar az olduğunu bulmuşlardır.

Özdil ve Başpınar (2005), Saanen–Kilis melezi Akkeçi'lerden ve Konya–Ermenek yöresi özel işletmelerdeki Kıl keçi'lerden temin edilen toplam 30 adet süt örneğinden genomik DNA izolasyonu yapmıştır. Genomik DNA izolasyonu, fenol–kloroform ile Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen genomik

DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi, 260 ve 280 nm UV ışığı altında absorbans değerlerinden hesaplanmış ve karşılaştırılmış. Fenol–kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA konsantrasyonu ortalama, 2406 ± 322 $\mu\text{g/mL}$ ve saflık derecesi A_{260}/A_{280} oranında ortalama, 1.816 ± 0.038 olarak bulunmuş. Bu durum da fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemiyle genomik DNA'nın saf olarak elde edildiğini göstermişlerdir. Chelex® 100 ekstraksiyon yönteminde ise DNA konsantrasyonu ortalama, 590.0 ± 54.9 $\mu\text{g/mL}$ ve elde edilen genomik DNA'nın saflık derecesi ortalama, 1.311 ± 0.012 olarak bulunmuş. Bu sonuç ile Chelex® 100 ekstraksiyonu ile elde edilen DNA örneklerinde protein kontaminasyonu olduğunu göstermiş ve DNA'ların çok saf elde edilemediğini ifade etmişlerdir. Fenol–kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA, agaroz jelinde tek bant olarak, ancak Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA miktarı az olduğu için agaroz jelinde görüntü alamamışlardır

Nguyen vd (2005), süt örneklerinden patojen *Listeria monocytogenes*'in DNA ekstraksiyonunu ve PCR çalışmasını yapmışlardır. Ayrıca bu çalışmada basit DNA ekstraksiyon metodu ve sütte bulunan PCR inhibitörlerinin uzaklaştırılması da araştırmışlardır. Listeriolysin O gene spesifik LM-F76 ve LM-R543 primerlerini kullanmışlardır. Sütler hazır olarak marketten sağlanmış, içerisine 10 CFU/ml oranda olan *L.monocytogenes* dilüsyonları katılmış ve 10^4 CFU/ml değere ulaşabilmesi için 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra LEB içerisinde zenginleştirmeye alınmış ve inkübasyon süresi sonunda DNA ekstraksiyonuna geçilmiş. Kaynatma ve alkali lizis prosedürleri uygulanmıştır. Ayrıca matriks inhibisyonunun üstesinden gelmek için kaynatma yöntemi ile beraber katropik ajanlarla muamele edilmiştir. Bunun için NaI kullanılmıştır. Çalışmanın etkili olabilmesi için $10^4 - 10^5$ CFU bakterinin bulunması gerektiğini ve böyle kurulan deneylerde PCR'ı inhibe eden bileşenlerin etkisinin azaltıldığını bulmuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Materyal olarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan *Listeria monocytogenes* ve *Brucella abortus* suşları temin edilmiştir. Bir işletmeden sağlanan antibiyotik kullanmayan, sağlıklı sığırlardan temin edilen taze sütlerin, mikroorganizma kontrolü yapılmıştır. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda geliştirilen *Brucella abortus* ve *Listeria monocytogenes* primerleri bu çalışmada kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin Üretilmesi ve Kontrolü

a) Kullanılan besiyerleri: *Listeria* suşlarının, Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere) ve Koyun Kanlı Agar'a, *Brucella* suşlarının ise Koyun Kanlı Agar ve Serum Dekstroz Agar'a çizgi ekimi yapıldı. 37°C etüve kaldırıldı. 2 günlük inkübasyon süresi sonunda üreyen kolonilerin morfolojisi incelendi.

Koyun Kanlı Agar hazırlanışı,

- Dehidre besiyeri 40 g/l konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritildi.
- Otoklavda 121°C'da 15 dakika steril edildi.
- Otoklav çıkışında 45-50°C'a soğutuldu.
- %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edildi ve karıştırıldı.
- Petri kutularına 12,5'er ml döküldü.

Brucella için Serum Dekstroz Agar hazırlanışı,

- 1 lt olacak şekilde Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere) hazırlandı.
- Otoklava girmeden önce, 1 lt. besiyerine 1/1000'lik kristal viyolede (Merck, Almanya) 1.4 ml ilave edildi.
- Yine 1 lt besi yeri için 3 ml NaOH (S8045; Sigma, ABD) konuldu.
- Besi yeri otoklavda 120°C 15 dakika sterilize edildi.
- 1 lt vasat için 60 ml % 20 glikozlu (Merck, Almanya) at serumu 56°C'de yarım saat su banyosunda inaktif edildi.
- Otoklavdan çıkan besiyeri 45-50°C'ye soğutuldu ve steril glikozlu at serumu ilave edildi, karıştırıldı.
- Ilıkken petri kutularına 12,5'er ml döküldü.

b) Biyokimyasal testler: Petri kutularında üreyen kolonilerin öncelikle morfolojileri incelendi. Sonra gram boyamaları yapılarak suşların doğruluğu kanıtlandı.

Gram boyama sonuçlarından sonra kanlı agarda üreyen Listeria ve Brucella kolonilerinden bazı biyokimyasal testler yapıldı. Bunlar,

- **Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) Testi:** Taze kültüre batırılmış steril iğne her iki besi yerine dikine daldırılmak suretiyle ekildi. Bir tanesine (fermentasyon için) 1 cm kalınlıkta olacak tarzda sıvı steril parafin ilave edildi. Tüplerin ağzı iyice kapatıldı ve 37°C de 2 gün inkübasyonda tutuldu. Tüplerdeki renk değişimi değerlendirildi.
- **Katalaz Testi:** Katı besi yerinde üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze yardımı ile yeterli miktarda alınarak temiz ve yağsız bir lamın üzerine konuldu. Sonra buna % 30 luk hidrojen peroksitten bir damla damlatıldı. Kabarcık oluşup oluşmamasına göre değerlendirme yapıldı.
- **İndol Testi:** Mikroorganizmalar içinde triptofan bulunan sıvı besi yerine ekildikten sonra 37°C de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Sonra kültürlerin üzerine kovacs ayırıcından 0.5 ml ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tüp üst kısmında oluşan kırmızı ve sarı halkalara göre değerlendirme yapıldı.

- **Karbonhidrat Fermentasyon Testi:** Triple Sugar Iron besiyeri kullanıldı. Taze kültüre batırılmış steril iğne uçlu öze tüpteki yatık besiyerine batırıldı ve çizgi ekim yapıldı. 37°C’de 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda laktoz, sükroz, glikoz fermentasyonu okundu.
- **Üreaz Testi:** Üreli buyyon içerisine mikroorganizmalar ekildikten sonra 37°C’de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Renk değişimi değerlendirildi.
- **Oksidaz Testi:** Ayıraç emdirilmiş hazır kağıtlar üzerine bakterinin taze kültüründen alınan koloniler sürüldü. 10-15 saniye sonra renk oluşumuna göre değerlendirme yapıldı.

3.2.2. Bakteri Sayımı

3.2.2.1. Kültürden direkt sayım:

Listeria monocytogenes için, Nutrient agarda üreyen kolonilerden Mc Farland 5 tüpüne göre bakteri süspansiyonu hazırlandı ve FTS içinde 10 katlı sulandırmalar yapıldı. Yapılan her dilüsyondan 0.1 ml alınarak nutrient agarlı plaklara yayma ekim yapıldı. 37°C’de 2 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda bakteri kolonileri sayıldı ve sonuçlar arasındaki uyum incelendi. Sonuçlar cfu (colony forming unit) cinsinden yazıldı.

Brucella abortus için; Serum dekstroz agarda üreyen kolonilerden Mc Farland 5 tüpüne göre bakteri süspansiyonu hazırlandı ve FTS içinde 10 katlı sulandırmalar yapıldı. Yapılan her dilüsyondan 0.1 ml alınarak serum dekstroz agarlı plaklara yayma ekim yapıldı. Ekimi yapılan petriyerler 3 farklı ortama kaldırıldı. Birincisi, 37°C lik etüve aerob şartlarda; ikincisi, 37°C lik etüve anaerob jar içine mum yakılarak; üçüncüsü ise yine 37°C lik etüve anaerob jar içine bu sefer gas generating kit (Oxoid) koyularak petriyerler kaldırıldı. 5 günlük inkübasyon süresi sonunda sonuçlar karşılaştırıldı ve cfu cinsinden yazıldı.

3.2.2.2. Süt örneklerinden sayım

a) Süt sterilizasyonu: Taze sağılan, işlem görmemiş sığır sütleri bekletilmeden işleme alındı. Mikroorganizma kontrolü yapıldı. Sütün özelliklerinin kaybolmaması için düşük sıcaklıkta steril edildi. Bunun için su banyosunda 62°C'de 30 dakika bekletildi.

b) Farklı ön işlemden geçirilen sütlerde sayımlar: Bu çalışmadaki amaç, süt içerisine belirli dilüsyonlarda ilave edilen bakterilerin cfu/ml cinsinden sayımını yapmak ve bu ilave edilen bakterilerin, süt farklı ortamlarda bekletildiğinde sütün üst kısmında mı (yağında) yoksa alt kısmında mı daha fazla toplandığını saptamaktır. Bunun için,

- Listeria ve Brucella'nın Mc Farland 5 tüpüne göre süspansiyonu hazırlandı.
- Steril edilmiş sütler 9.9 ml olacak şekilde büyük tüplere koyuldu.
- Bu tüplerin yarısına Listeria süspansiyonundan 0.1 ml ilave edildi ve karıştırıldı.
- Diğer yarısına da Brucella süspansiyonundan 0.1 ml ilave edildi ve karıştırıldı.
- Bundan sonra farklı 3 aşama izlendi.

37°C de bekletme: Listeria ve Brucella içeren süt örnekleri 37°C etüve kaldırıldı ve 4 saat bekletildi. 4 saatin sonunda tüpler sarsmadan çıkarıldı. Üstte biriken yağlı kısımdan dibe girmeden 0.1 ml alındı ve FTS içinde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Sonra üstteki yağlı kısım atıldı, dipten 0.1 ml alındı ve FTS içeren tüplerde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Listeria için nutrient agarlı plaklara yayma ekim yapıldı ve 37°C de 2 gün, Brucella için serum dekstroz agarlı plaklara yayma ekim yapıldı ve 37°C'de 6 gün inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar CFU cinsinden yazıldı.

4°C de bekletme: Listeria ve Brucella içeren birer süt örnekleri 4°C'de buzdolabına kaldırıldı ve 4 saat bekletildi. 4 saatin sonunda tüpler sarsmadan çıkarıldı. Üstte biriken yağlı kısımdan dibe girmeden 0.1 ml alındı ve FTS içinde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Sonra üstteki yağlı kısım atıldı, dipten 0.1 ml alındı ve FTS içeren tüplerde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Listeria için nutrient agarlı plaklara ekim yapıldı ve 37°C de 2 gün, Brucella için serum dekstroz agarlı plaklara yayma ekim yapıldı ve 37°C'de 6 gün inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar CFU cinsinden yazıldı.

Oda ısısında bekletme ve santrifüj: Listeria ve Brucella içeren birer süt örnekleri oda ısısında 10 dakika bekletildi ve santrifüj tüplerine alındı. 2000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra tüpler sarsmadan çıkarıldı. Üstte biriken yağlı kısımdan dibe girmeden 0.1 ml alındı ve FTS içinde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Sonra üstteki yağlı kısım atıldı, dipten 0.1 ml alındı ve FTS içeren tüplerde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Listeria için nutrient agarlı plaklara ekim yapıldı ve 37°C de 2 gün, Brucella için serum dekstroz agarlı plaklara yayma ekim yapıldı ve 37°C'de 6 gün inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar CFU cinsinden yazıldı.

Yukarıdaki deneyler 4'er süt örneğiyle 2'şer kere tekrarlandı ve sonuçlar bunun ortalaması olarak kaydedildi.

3.2.3. PCR Çalışmaları

PCR için sırasıyla ekstraksiyon, amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.3.1. Bakterilerin hazırlanması:

a) Kültürden bakterilerin hazırlanması: Brucella ve Listeria suşunun logaritmik faz kültüründen FTS içinde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Serum dekstroz agarda ve nutrient agarda CFU (colony forming unit) cinsinden bakteri sayımları yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Sonraki aşamada sulandırmalar 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı atıldı. Peletler DNA ekstraksiyon protokollerine göre farklı sıvılar ile sulandırıldı. Bu aşamadan sonra DNA ekstraksiyonuna geçildi.

b) Süt örneklerinden bakterilerin hazırlanması: Çalışmanın asıl amacı olan; süt içerisindeki yağın PCR'a olan etkisini ve bakterilerin yağa tutunma özelliğini anlamak için, birbirine paralel 2 farklı çalışma yapıldı.

- 1. Deney:** Steril edilmiş sığır sütleri 0.9 ml olacak şekilde tüplere bölündü. Ayrı tüplerde FTS ile hazırlanan 10 katlı bakteri dilüsyonlarından 0.1 ml alınarak sütlerin üzerine pipetlendi. Hazırlanan süt-bakteri süspansiyonları karıştırıldıktan sonra hazırlanan bu sütlerden DNA ekstraksiyonuna geçildi.

2. **Deney:** Steril edilmiş sığır sütleri 0.9 ml olacak şekilde tüplere bölündü. Ayrı tüplerde FTS ile hazırlanan 10 katlı bakteri dilüsyonlarından 0.1 ml alınarak sütlerin üzerine pipetlendi. Hazırlanan süt-bakteri süspansiyonları karıştırıldıktan sonra düşük devirlerde santrifüj edilerek sütün yağı ayrıldı. Hazırlanan yağsız süt-bakteri süspansiyonları karıştırıldıktan sonra bu sütlerden DNA ekstraksiyonuna geçildi.

c) Yağlı ve yağsız süttten sayım çalışması: Sayım çalışması PCR'a girecek örnekler için yapıldı. PCR bulguları, yağlı ve yağsız süttten yapılan bu sayımlar ile beraber değerlendirildi.

Öncelikle, Brucella ve Listeria suşunun logaritmik faz kültüründen FTS içinde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı (Mc Farland 5). 0.9 ml süt bulunan tüplere 0.1 ml olarak aktarıldı. Karıştırıldıktan sonra,

- Her dilüsyondan 0.1 ml alınarak yayma ekim yapıldı. Serum dekstroz agarda ve nutrient agarda cfu (colony forming unit) cinsinden bakteri sayımları yapıldı.
- Her dilüsyonun düşük devirde santrifüjlerle yağı ayrıldı. Yağı ayrılan süt – bakteri süspansiyonundan 0.1 ml alınarak yayma ekim yapıldı. Serum dekstroz agarda ve nutrient agarda cfu (colony forming unit) cinsinden bakteri sayımları yapıldı.

3.2.3.2. DNA ekstraksiyonu:

FTS, yağlı süt ve yağsız süt süspansiyonu içindeki bakteri kültürlerinden DNA ekstraksiyonu için 2 farklı protokol uygulandı.

a) Spin Kolon (Qiagen ekstraksiyon): Üretici firma tarafından belirtilen protokole göre yapıldı.

- Bakteri süspansiyonları 8000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı.
- Üzerine 200 µl resüspanse PBS ve 20 µl Proteinaz K eklendi.
- 200 µl AL buffer eklendi, vortekslendi ve 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 200 µl etanol (% 96-100) eklendi. Mix iyice vortekslendi.

- Karışım 2 ml spin kolonlu koleksiyon tüpüne alındı.
- 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolumn yeni koleksiyon tüpüne alındı. 500 µl AW1 buffer eklendi.
- 8000 rpm'de 1 dk.santrifüj edildi. Sıvı koleksiyon tüpüne geçti.
- Spin kolumn yeni koleksiyon tüpüne alındı. 500 µl AW2 buffer eklendi.
- 14.000 rpm'de 3 dk.santrifüj edildi. Sıvı koleksiyon tüpüne geçti.
- Spin kolumn yeni mikrosantrifüj (ependorf) tüpüne alındı. 200 µl AE buffer eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve spin atıldı.
- Altta kalan sıvı yani DNA örnekleri amplifikasyon işlemleri yapılanaya kadar -20°C de template DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

b) Kaynatma Protokolü:

- Bakteri süspansiyonları 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant döklüldü ve 500 ml FTS eklendi.
- 12.000 rpmde 3 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı.
- 20 µl distile su eklendi.
- 100°C'de 10 dakika kaynatıldı.
- Kaynatma işleminden sonra 10 dakika -20°C'de bekletildi.
- 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve elde edilen DNA bundan sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.3.3. Primerler

Doç.Dr.Bariş Sareyyüpoğlu'nun, TÜBİTAK 1040237 numaralı, 'Koyunlarda abortif Bakteriyel İnfeksiyonların Tanısında Multiplex-PCR Tekniklerinin Geliştirilmesi' isimli proje için dizayn ettiği *Listeria* ve *Brucella* primerleri bu çalışmada kullanılmıştır.

3.2.3.4. PCR karışımı

PCR karışımı her bir örnek için 25 µl'lik final hacimde olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı;

- 2,5 µl 10 x PCR buffer (Fermentas, Litvanya)
- 3 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya)
- 0,5 µl 10 mM dNTP (Fermentas, Litvanya)
- 0,2 µl Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya)
- *Listeria* ve *Brucella* mixlerine ayrı ayrı olmak üzere 1 µl Primer I ve 1 µl Primer II
- Dietilpirokarbonatlı su (DEPC-treated water) (Fermentas, Litvanya)

DEPC'li su ile 23 µl'lik hacme tamamlandı. Bu karışımdan her bir tüpe 23 µl konuldu ve üzerine 2 µl örneğe ait template DNA eklenerek toplam 25 µl'lik final hacim hazırlandı.

3.2.3.5. PCR optimizasyonu için hazırlanan PCR karışımı

Yukarıdaki işleme ek olarak ayrıca sütün bileşimindeki bazı maddelerin PCR işlemine olan etkisini değerlendirebilmek ve optimize edebilmek için farklı Mg⁺² konsantrasyonları içeren karışımlar deneye alındı. Yine 25 µl'lik final hacimde olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı,

- 2,5 µl 10 x PCR buffer
- 0,5 µl 10 mM dNTP
- 0,2 µl Taq DNA Polimeraz

- Listeria ve Brucella mixlerine ayrı ayrı olmak üzere 1 µl Primer I ve 1 µl Primer II
- Dietilpirokarbonatlı su –DEPC’li su
- MgCl₂

25 mM MgCl₂’den her bir karışım için 8 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Bunlar, 0.5 µl, 1 µl, 1.5 µl, 2 µl, 2.5 µl, 3 µl, 3.5 µl, 4 µl MgCl₂ konsantrasyonlarıdır. MgCl₂ konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak DEPC’li su miktarı da her bir karışım için 23 µl’ye tamamlanarak hazırlandı. Bu karışımdan her bir tüpe 23 µl konuldu ve üzerine 2 µl örneğe ait template DNA eklenerek toplam 25 µl’lik final hacim hazırlandı.

3.2.3.6. Amplifikasyon

Brucella ve Listeria suşları ile yukarıdaki maddelerde belirtilen,

- FTS’den hazırlanan örneklerine,
- Yağlı süttten hazırlanan örneklerine,
- Yağsız süttten hazırlanan örneklerine,
- Yağlı ve yağsız süttten ekstrakte edilmiş ve 8 farklı MgCl₂ karışımı ile hazırlanan örneklerine,

amplifikasyon uygulandı. Amplifikasyon işlemi sırasıyla 94°C’de 3 dk. ön denatürasyon, 94°C’de 1 dk denaturasyon, 54°C’de 1 dk primer bağlanması, 72°C’de 1 dk ekstensiyon aşamasını içeren 30 siklustan oluştu. En son aşamada 72°C’de 1 dk bekletilerek reaksiyon tamamlandı.

Bu çalışmada hassas terazi (Scaltec sbc41, Almanya), santrifüj (Hettich, Almanya), steril kabin (laminar flow) (Bioair Instruments, Aura 2000, Mac, İtalya), vorteks (Fine Vortex, Kore) ve DNA Thermal Cycler (Biometra, Almanya) kullanıldı.

3.2.3.7. Elektroforez

PCR sonuçlarının görüntülenmesi amacı ile amplikonlara agaroz jel elektroforez işlemi uygulandı. DNA elektroforezinde %1.5 agaroz (Prona, EU) jel kullanıldı. Bunun için 3 gr agaroz 200 ml 0.5xTBE (Tris-Borate-EDTA) buffer ile karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında eritildi. Eriyen agarozun 50°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra içerisine ethidium bromid (8 µg/ml) eklenerek karıştırıldı. Örnek tarakları yerleştirildikten sonra jel yatay elektroforez cihazının yatağına döküldü. Hazırlanan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına jelin yüzeyini kaplayacak şekilde 0.5xTBE buffer konuldu. 2 µl 6x Gel Loading Dye solusyonu ile 10 µl PCR amplikon örneği parafilm üzerinde karıştırılarak jeldeki gözlemlere konuldu. Birinci göze 3 µl 100 bp'lik DNA molekül ağırlık standartı (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litvanya) ilave edildi. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak 180 volt 40 dk. sabit akımda jel ebatlarına göre elektrik akımına tabi tutuldu.

3.2.3.8. Örneklerin Görüntülenmesi

Elektroforez sonuçları biyo-görüntüleme sisteminde (Gene Genius, Sygene, İngiltere) incelendi ve kaydedildi. Bant büyüklükleri ve yoğunlukları Syngene Genesnap yazılımı ile belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. BİYOKİMYASAL TEST BULGULARI

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan *Listeria monocytogenes* ve *Brucella abortus* suşlarının deneye başlamadan önce bazı biyokimyasal testleri yapıldı ve alınan sonuçların doğruluğuna göre bundan sonraki aşamalarda bu bakteriler kullanıldı. Yapılan testler arasında oksidasyon fermentasyon, katalaz, indol, karbonhidrat fermentasyon testi (TSI), üreaz ve oksidaz vardır. Test sonuçları Çizelge 4.1 de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. *L.monocytogenes* ve *B.abortus* suşları kullanılarak yapılan bazı biyokimyasal testlerin sonuçları

<u>Testler</u>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Brucella abortus</i>
O/F	Fermentatif	Anreaktif
Katalaz	+	+
İndol	-	-
TSI	+	-
Üreaz	-	+
Oksidaz	-	+

4.2. Bakteri Sayım Bulguları

4.2.1. Kültürden direkt sayım bulguları

L. monocytogenes ve *B. abortus* için, petrilere üreyen kolonilerden Mc Farland 5 tüpü yoğunluğu referans alınarak bakteri süspansiyonu hazırlandı ve FTS içinde 10 katlı sulandırmalar yapıldı. Yapılan sulandırmalardan serum dekstroz agar ve nutrient agarlı plaklara ekim yapıldı. Yapılan çalışmaların 10-100 arası bakteri kolonileri değerlendirildi ve ortalamaları alındı. Sonuçlar Çizelge 4.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *L.monocytogenes* ve *B.abortus*'un kültürden direkt sayımından elde edilen ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)

Bakteri	İnkübasyon Ortamı	İnkübasyon Süresi	-3	-4	-5
<i>Listeria monocytogenes</i>	Aerob ortam (37°C)	2 gün	364	45	17
<i>Brucella abortus</i>	Anaerob jar (Mum)	5 gün	362	40	17
	Anaerob jar (Gas generating kit)	5 gün	370	38	15
	Aerob ortam (37°C)	5 gün	373	43	19

B.abortus'un 3 farklı ortamda verdiği sayım sonuçlar birbirine paralel çıkmıştır. Bundan sonraki deney aşamalarında *B.abortus* için daha pratik ve güvenilir bir ortam olan 37°C'lik etüv tercih edilmiştir.

4.2.2. Farklı ön işlemden geçirilen süt örneklerinden sayım bulguları

a) *Listeria monocytogenes*

Bu çalışmada McF 5 tüpü referans alınarak hazırlanan süspansiyon, süt örneklerine ilave edildi. Sonra 3 farklı aşama izlendi; 37°C ve 4°C de bekletilen sütün alt ve üst kısmından, santrifüj edilen sütün de alt ve üst kısmından hazırlanan 10 katlı dilüsyonların ekimleri yapıldı. Yapılan çalışmaların 10-100 arası bakteri kolonileri değerlendirildi ve ortalamaları alındı. Ekim sonuçları Çizelge 4.3 deki gibidir.

Çizelge 4.3. *L.monocytogenes*'in süt örnekleriyle yapılan ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)

Dilüsyonlar	37°C		4°C		Santrifüj	
	Alt	Üst	Alt	Üst	Alt	Üst
-3	282	573	318	710	130	198
-4	24	55	33	79	17	23
-5	3	5	4	8	1	3

Ekim sonuçlarının değerlendirilmesinde, *Listeria monocytogenes* en fazla bakteri sayısını sütün üst kısmında yani yağlı kısmında verdiği gözlemlendi. Yapılan çalışmalar ile *Listeria monocytogenes* için sütün yağına tutunma özelliğinin olduğu ve burada daha iyi ürediği saptandı.

b) *Brucella abortus*

Bu çalışmada McF 5 tüpüne göre hazırlanan süspansiyon, süt örneklerine ilave edildi. Sonra 3 farklı aşama izlendi; 37°C ve 4°C de bekletilen sütün alt ve üst kısmından, santrifüj edilen sütün alt ve üst kısmından hazırlanan 10 katlı dilüsyonların ekimleri yapıldı. Yapılan çalışmaların 10-100 arası bakteri kolonileri değerlendirildi ve ortalamaları alındı. Ekim sonuçları Çizelge 4.4 de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. *B. abortus*'un süt örnekleriyle yapılan ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)

Dilüsyonlar	37°C		4°C		Santrifüj	
	Alt	Üst	Alt	Üst	Alt	Üst
-3	302	289	297	219	200	196
-4	40	34	35	29	22	16
-5	5	3	5	2	4	1

Ekim sonuçlarının değerlendirilmesinde, her 3 deney için değerler birbirine yakın olsada *B.abortus* en fazla bakteri sayısını sütün alt kısmında verdi ve sayım sonuçları 3 farklı ortamda da birbirine paralel çıktı.

Yapılan bu deneyler ile *B.abortus*'un, bekletilen ve santrifüj edilen sütte yağa tutunma özelliğinin olduğu ama *L.monocytogenes* kadar çok olmadığı bulundu.

4.3. PCR Bulguları

4.3.1. Yağlı ve yağsız süttten sayım bulguları

Sayım çalışması PCR'a girecek yağlı ve yağsız süt örnekleri içindeki *Listeria* ve *Brucella* süspansiyonları için yapıldı. Sonuçlar cfu/ml cinsinden yazıldı. PCR bulguları, yapılan bu sayımlar ile beraber değerlendirildi.

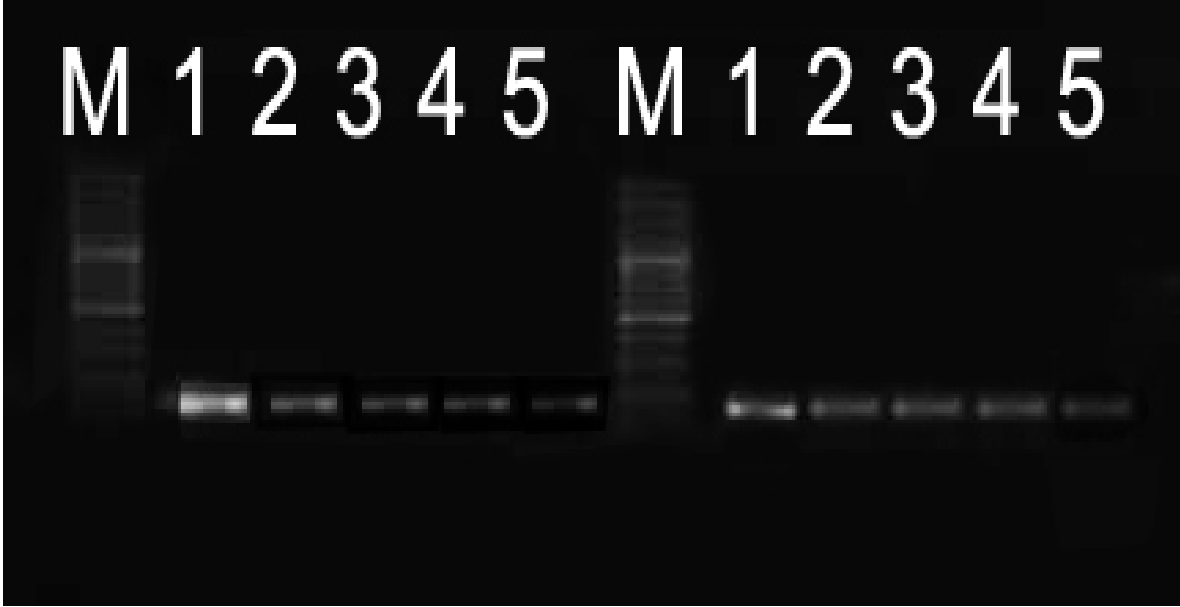
Çizelge 4.5. *L.monocytogenes* ve *B.abortus*'un süttten direkt sayımından elde edilen ortalama bakteri sayıları (2 x 4 deneyin ortalaması)

Bakteri		-2	-3	-4
<i>Listeria monocytogenes</i>	Yağlı süt	3,5x10 ³	350	40
	Yağsız süt	2x10 ³	200	13
<i>Brucella abortus</i>	Yağlı süt	3,7x10 ³	370	36
	Yağsız süt	3,4x10 ³	340	30

L. monocytogenes ve *B. abortus* ayrı ayrı incelendi. Sayım çalışmasından sonra, direkt kültürden (FTS içinde) ve yağlı - yağsız sütlerden, 2 farklı ekstraksiyon (spin kolon ve kaynatma yöntemi) ile DNA'lar elde edildi. Elde edilen DNA'ların her biri önce standart bir karışım ile amplifikasyona sokuldu sonra farklı Mg⁺² konsantrasyonları hazırlanarak oluşturulan 8 ayrı karışımla amplifikasyona sokuldu.

4.3.2. Kùltürden direkt elde edilen *Listeria monocytogenes*'in PCR sonuçları

FTS içeren tüplerde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Her bir sulandırmaya spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve iki tekniğin karşılaştırılması sağlandı. (Şekil 4.1)



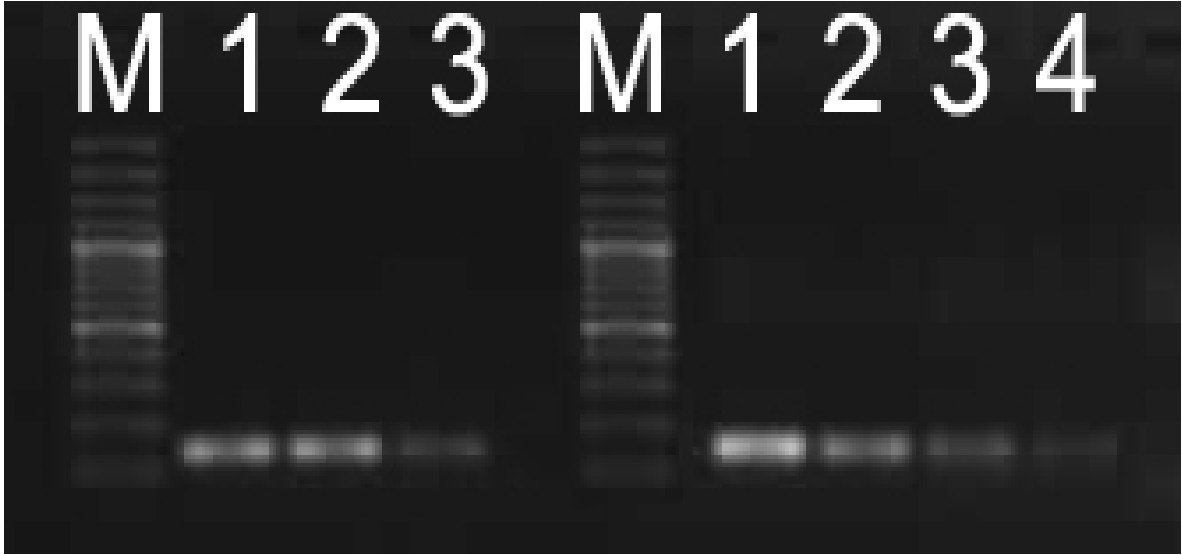
Şekil 4.1. FTS içindeki *L.monocytogenes*'in 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 132 bp DNA bantları

M: Marker (100 bp) 1 – 5: Spin kolon yöntemi ile 10^{-5} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar. 6 – 10: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi ile 10^{-5} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar

L.monocytogenes için uygulanan kaynatma ve spin kolon ekstraksiyon yöntemleri 10^{-5} dilüsyonunda sayılan 17 bakteriye kadar DNA amplifikasyonunu sağladı. Her iki tekniğinde bu bakterinin FTS içerisindeki kültürü için uygun olduğu gözlemlendi.

4.3.3. Yağlı sütte elde edilen *Listeria monocytogenes*'in PCR sonuçları

Süt içeren tüplere, FTS içerisinde 10 katlı sulandırmaları hazırlanan bakteri süspansiyonları aktarıldı. Her bir sulandırmaya spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve karşılaştırılması sağlandı. (Şekil 4.2)



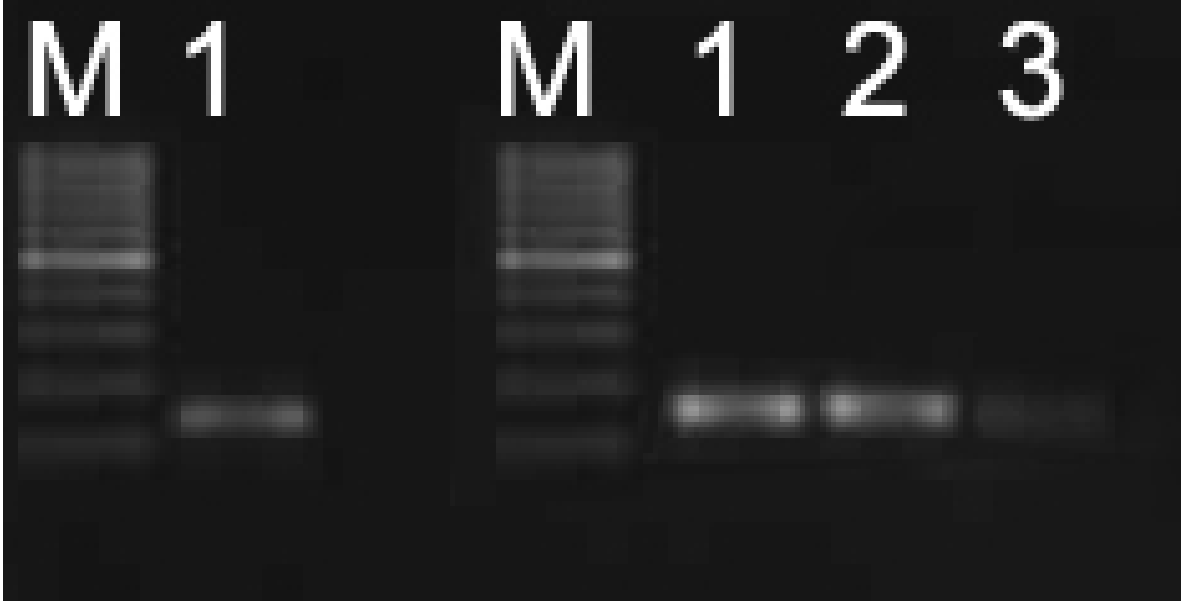
Şekil 4.2. Süt içindeki *L.monocytogenes*'in 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 132 bp DNA bantları

M: Marker (100 bp) 1 – 3: Spin kolon yöntemi ile 10^{-3} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar. 4 – 7: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi ile 10^{-4} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar

Süt içerisindeki *L.monocytogenes* için uygulanan spin kolon ekstraksiyon yöntemleri 10^{-3} dilüsyonunda sayılan 350 bakteriye kadar, kaynatma ekstraksiyon yöntemi 10^{-4} dilüsyonunda sayılan 40 bakteriye kadar DNA amplifikasyonunu sağladı. Sütün PCR üzerindeki inhibitör etkisi bant sayısındaki düşme ile tespit edildi.

4.3.4. Yağsız süttten elde edilen *Listeria monocytogenes*'in PCR sonuçlar

Süt içeren tüplere, FTS içerisinde 10 katlı sulandırmaları hazırlanan bakteri süspansiyonları aktarıldı. Hazırlanan süt-bakteri süspansiyonları düşük devirlerde santrifüj edilerek süttün yağı ayrıldı. Her bir sulandırmaya spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve karşılaştırılması sağlandı. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Yağsız süt içindeki *L.monocytogenes*'in 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 132 bp DNA bantları

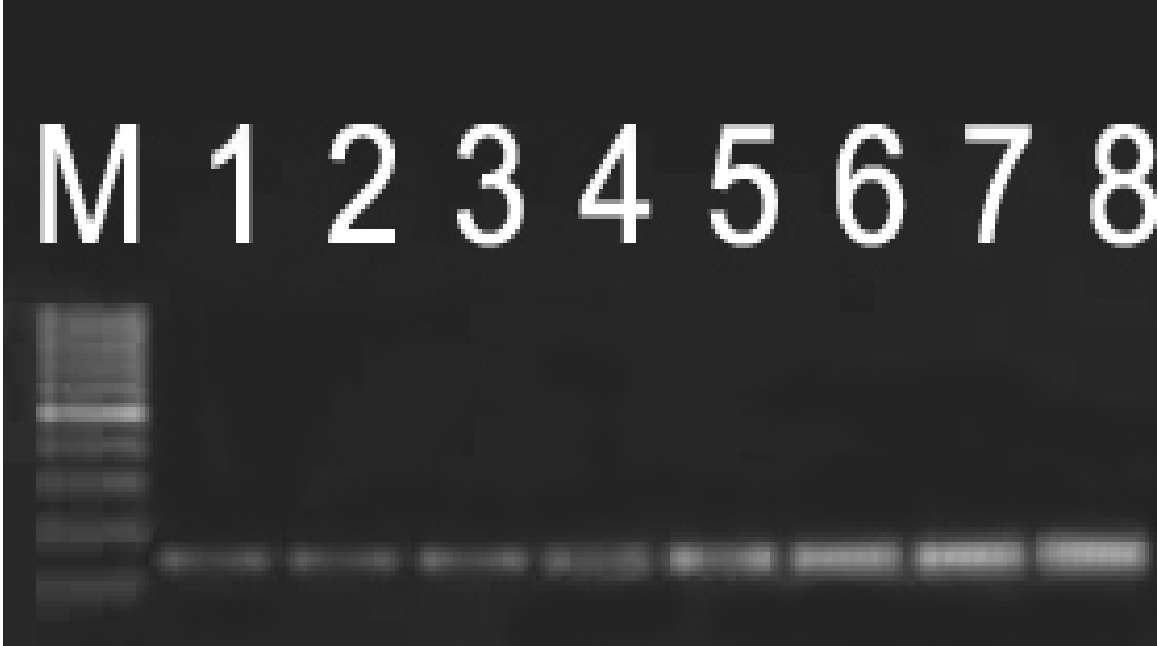
M: Marker (100 bp) 1: Spin kolon yöntemi ile 10^{-1} de gözlenen bant. 2 – 4: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi ile 10^{-3} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar

Yağsız süt içerisindeki *L.monocytogenes* için uygulanan kaynatma yöntemi 10^{-3} dilüsyonunda sayılan 200 bakteriye kadar, spin kolon yönteminde ise 10^{-1} dilüsyonunda sayılan 2×10^4 bakteriye kadar DNA amplifikasyonunu sağladı. Yağsız süt içerisindeki *L.monocytogenes*'den yapılan ekstraksiyonlar karşılaştırıldığında kaynatma tekniğinin spin kolona göre daha avantajlı olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmalara paralel, moleküler aşamasından önce yapılan sayım sonuçları da değerlendirildiğinde *L.monocytogenes*'in süttün yağına tutunduğu, yağı alınmış sütte bant netliklerinin düştüğü gözlemlendi.

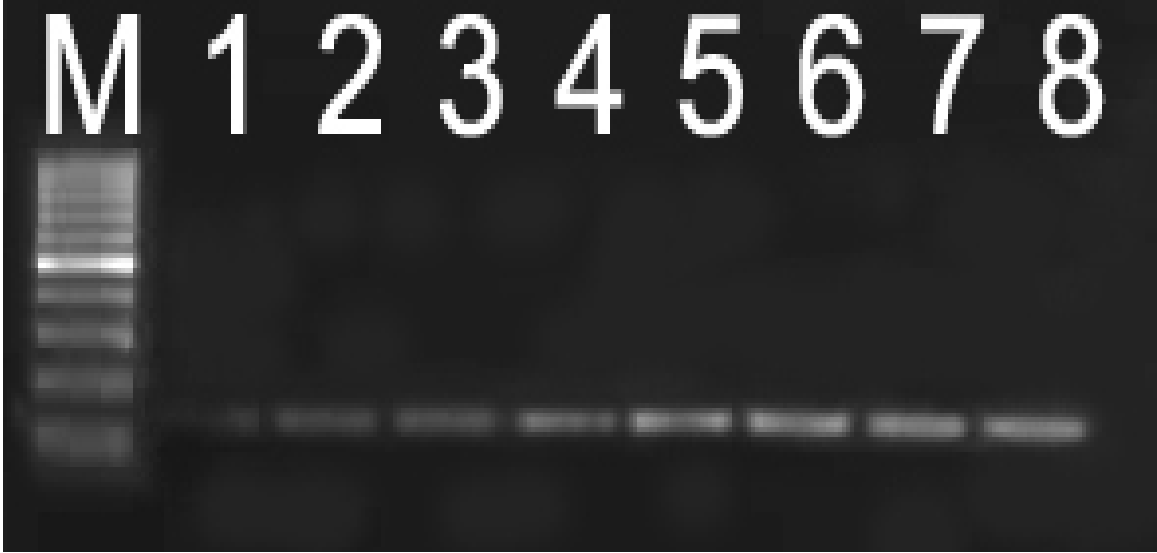
4.3.5. Yağlı sütün elde edilen *Listeria monocytogenes*'in farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları

McF 5'e göre hazırlanan bakteri süspansiyonları seyreltme yapılmadan süt içeren tüplere aktarıldı. Spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanarak DNA'lar elde edildi. Elde edilen DNA, 8 farklı MgCl₂ konsantrasyonu içeren karışımlarla hazırlandı ve amplifikasyona sokuldu. Kurulan 8 farklı deney ile; süt içerisindeki Ca⁺² iyonunun, PCR karışımı içindeki Mg⁺² iyonu ile etkileşimi değerlendirildi ve sütün içerisindeki yağın ve Ca⁺² iyonunun PCR üzerine inhibitör etkisi beraber gözlemlendi, PCR optimizasyonu sağlandı. (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5)



Şekil 4.4. Yağlı sütün spin kolon yöntemi ile elde edilen *L.monocytogenes* DNA'larının farklı MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Spin kolon ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 µl MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar.



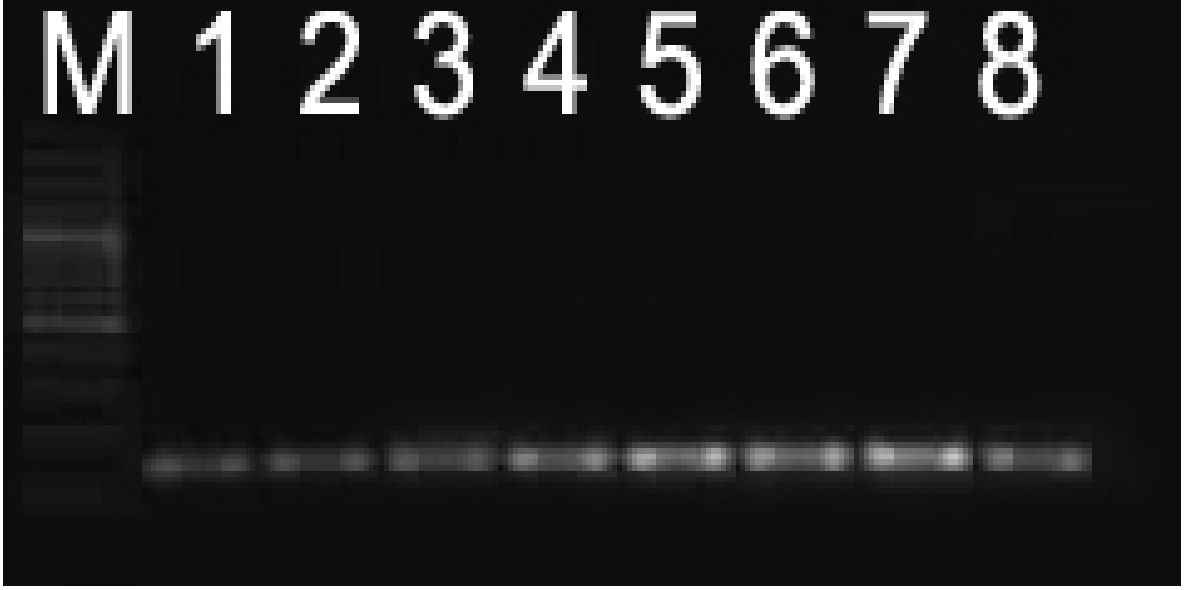
Şekil 4.5. Yağlı süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen *L.monocytogenes* DNA'larının farklı MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elktroforezde görünümü

1– 8: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 µl MgCl₂ karışımları ile yapılan aplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar.

Yağlı süttten spin kolon ve kaynatma yöntemi ile elde edilen DNA'lar farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında değerlendirildi. İki yöntem içinde MgCl₂ konsantrasyonunun 2.5 µl den fazla olduğu bantlarda netliğin arttığı gözlemlendi.

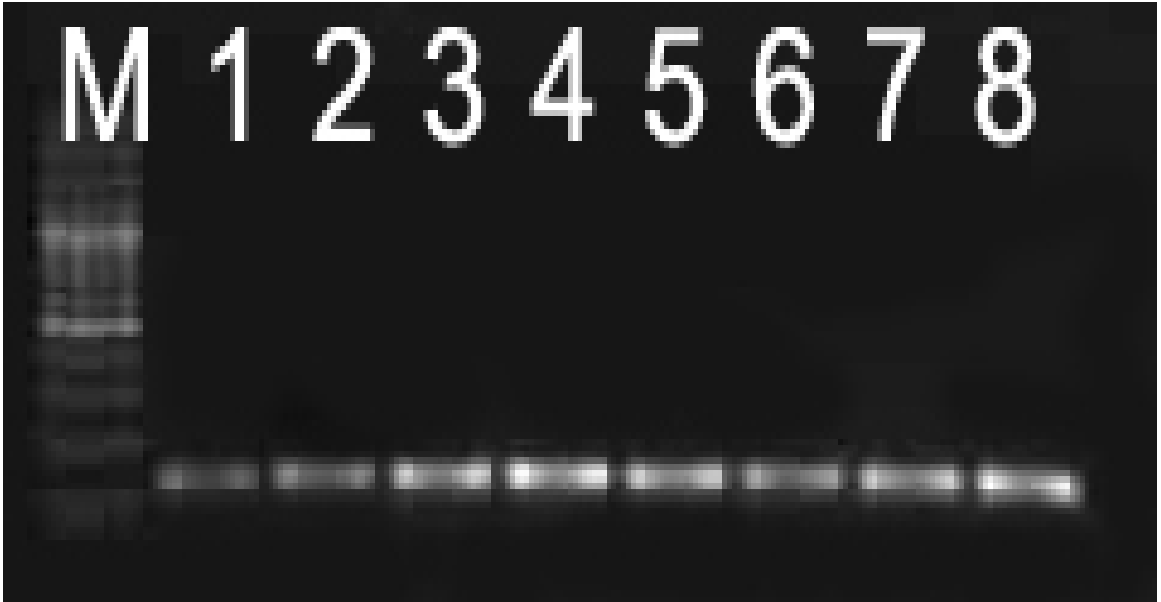
4.3.6.Yağsız süttten elde edilen *Listeria monocytogenes*'in farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları

Sütün yağını alma işlemleri bakteri süspansiyonu katılmadan yapıldı ve yağsız sütler tüplere aktarıldı. McF 5'e göre hazırlanan bakteri süspansiyonu seyreltme yapılmadan, yağsız süt içeren tüplere eklendi. Spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanarak DNA'lar elde edildi. Elde edilen DNA, 8 farklı MgCl₂ konsantrasyonu içeren karışımlarla hazırlandı ve amplifikasyona sokuldu. Yağsız süt ile hazırlanan örneklerde süt içerisindeki Ca⁺² iyonunun PCR üzerine etkisi gözlemlendi, PCR optimizasyonu sağlandı. (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7)



Şekil 4.6. Yağsız süttten spin kolon yöntemi ile elde edilen *L.monocytogenes* DNA'larının farklı MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elktroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Spin kolon ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 µl MgCl₂ karışımları ile yapılan aplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar



Şekil 4.7. Yağsız süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen *L.monocytogenes* DNA'larının farklı MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elktroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 µl MgCl₂ karışımları ile yapılan aplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar.

Yağsız süttten spin kolon ve kaynatma yöntemi ile elde edilen DNA'lar farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında değerlendirildi. Spin kolon yönteminde 1.5 µl den sonra bant netliklerinin arttığı gözlemlendi. Kaynatma yönteminde ise bu değer 1 µl'ye kadar düştü. Bu çalışma yağlı süt ile yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında; yağlı süt ile gözlenen bantlar, 2.5 µl'den sonraki MgCl₂ konsantrasyonlarda belirginleşirken yağsız sütte bu değer 1 µl konsantrasyonuna kadar düştü.

4.3.7. Kültürden direkt elde edilen *Brucella abortus*'un PCR sonuçları

FTS içeren tüplerde 10 katlı sulandırmalar hazırlandı. Her bir sulandırmaya spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve iki tekniğin karşılaştırılması sağlandı. (Şekil 4.8)



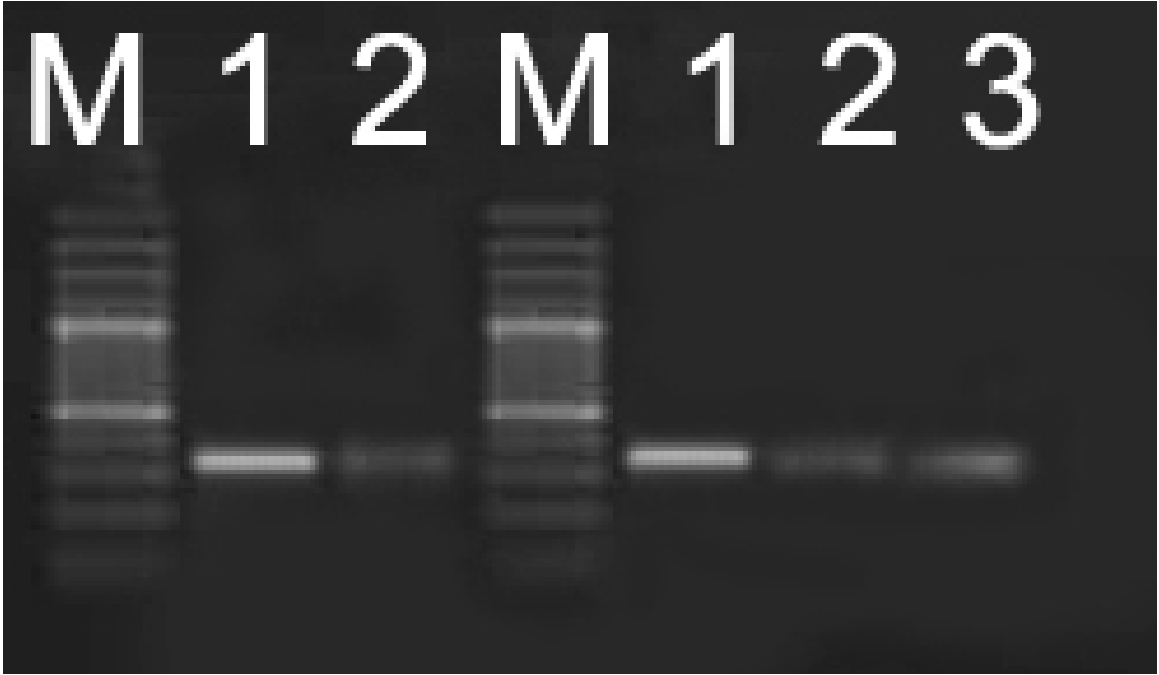
Şekil 4.8. FTS içindeki *B.abortus*'un 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 337 bp DNA bantları

M: Marker (100 bp) 1 – 5: Spin kolon yöntemi ile 10⁻⁵ dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar. 6 – 10: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi ile 10⁻⁵ dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar

B.abortus için uygulanan kaynatma ve spin kolon ekstraksiyon yöntemleri 10^{-5} dilüsyonunda sayılan 19 bakteriye kadar DNA amplifikasyonunu sağladı. Her iki tekniğinde bu bakterinin FTS içerisindeki kültürü için uygun olduğu gözlemlendi.

4.3.8. Yağlı süttten elde edilen *Brucella abortus*'un PCR sonuçları

Süt içeren tüplere, FTS içerisinde 10 katlı sulandırmaları hazırlanan bakteri süspansiyonları aktarıldı. Her bir sulandırmaya spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve karşılaştırılması sağlandı. (Şekil 4.9)



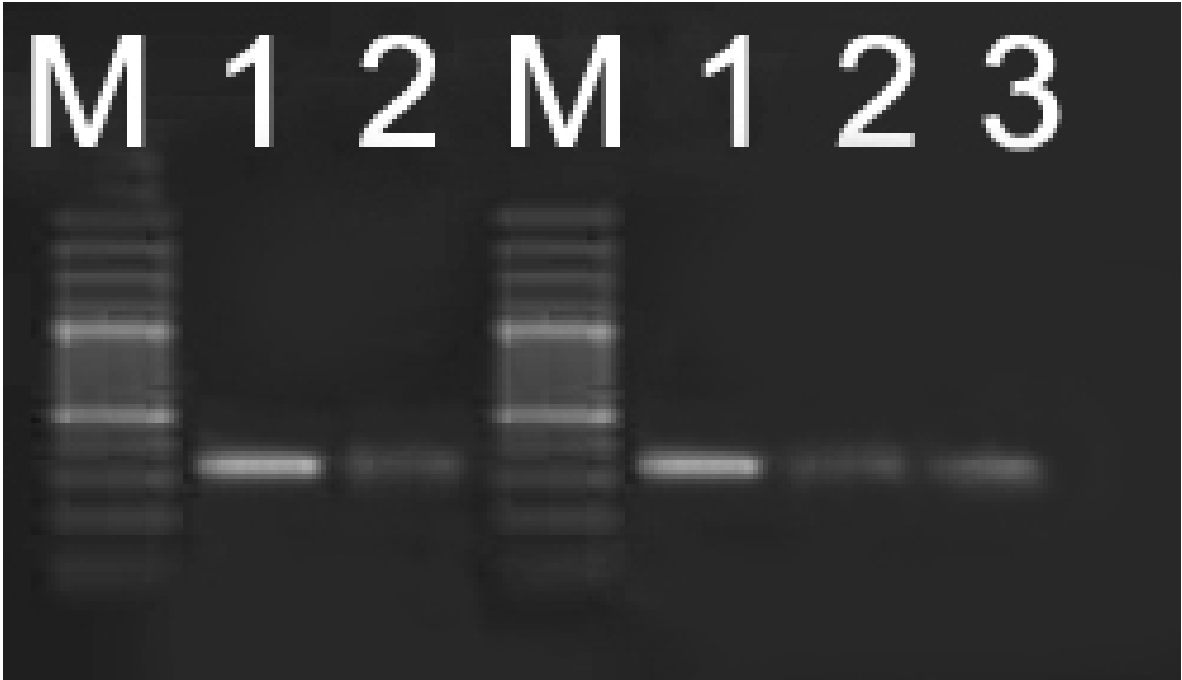
Şekil 4.9. Süt içindeki *B.abortus*'un 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 337 bp DNA bantları

M: Marker (100 bp) 1 – 2: Spin kolon yöntemi ile 10^{-2} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar. 3 – 5: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi ile 10^{-3} dilüsyonunda gözlenen bant

Süt içerisindeki *B.abortus* için uygulanan kaynatma yöntemi 10^{-3} dilüsyonunda sayılan 370 bakteriye kadar, spin kolon yönteminde ise 10^{-2} dilüsyonunda sayılan $3,7 \times 10^3$ bakteriye kadar DNA amplifikasyonunu sağladı. Yağlı süt içerisindeki *B.abortus*'dan yapılan ekstraksiyonlar karşılaştırıldığında kaynatma tekniğinin spin kolona göre daha avantajlı olduğu gözlemlendi.

4.3.9. Yağsız süttten elde edilen *Brucella abortus*'un PCR sonuçları

Süt içeren tüplere, FTS içerisinde 10 katlı sulandırmaları hazırlanan bakteri süspansiyonları aktarıldı. Hazırlanan süt-bakteri süspansiyonları düşük devirlerde santrifüj edilerek süütün yağı ayrıldı. Her bir sulandırmaya spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulandı ve karşılaştırılması sağlandı. (Şekil 4.10)



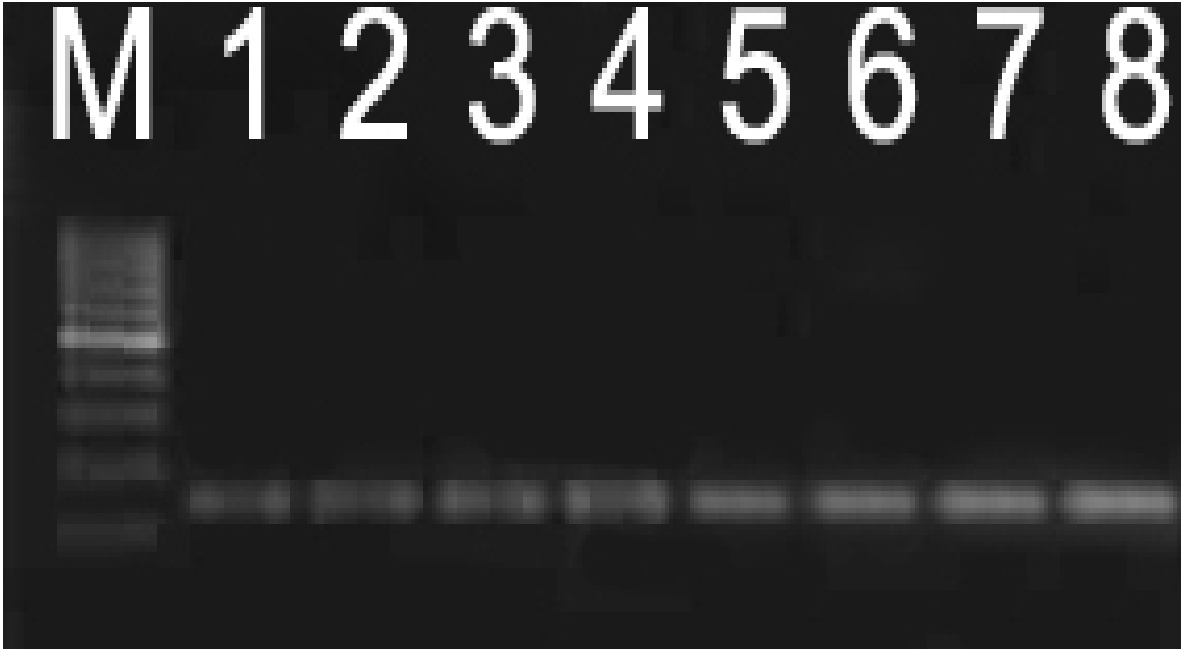
Şekil 4.10. Yağsız süt içindeki *B.abortus*'un 10 katlı sulandırmalarından 2 farklı yöntemle elde edilen 337 bp DNAbantları

M: Marker (100 bp) 1-2: Spin kolon yöntemi ile 10^{-2} de gözlenen bant. 3- 5: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi ile 10^{-3} dilüsyonuna kadar gözlenen bantlar

Yağsız süt içerisindeki *B.abortus* için uygulanan kaynatma yöntemi 10^{-3} dilüsyonunda sayılan 340 bakteriye kadar, spin kolon yönteminde ise 10^{-2} dilüsyonunda sayılan $3,4 \times 10^3$ bakteriye kadar DNA amplifikasyonunu sağladı. Yağlı süt içerisindeki *B.abortus*'dan yapılan ekstraksiyonlar karşılaştırıldığında kaynatma tekniğinin spin kolona göre daha avantajlı olduğu gözlemlendi.

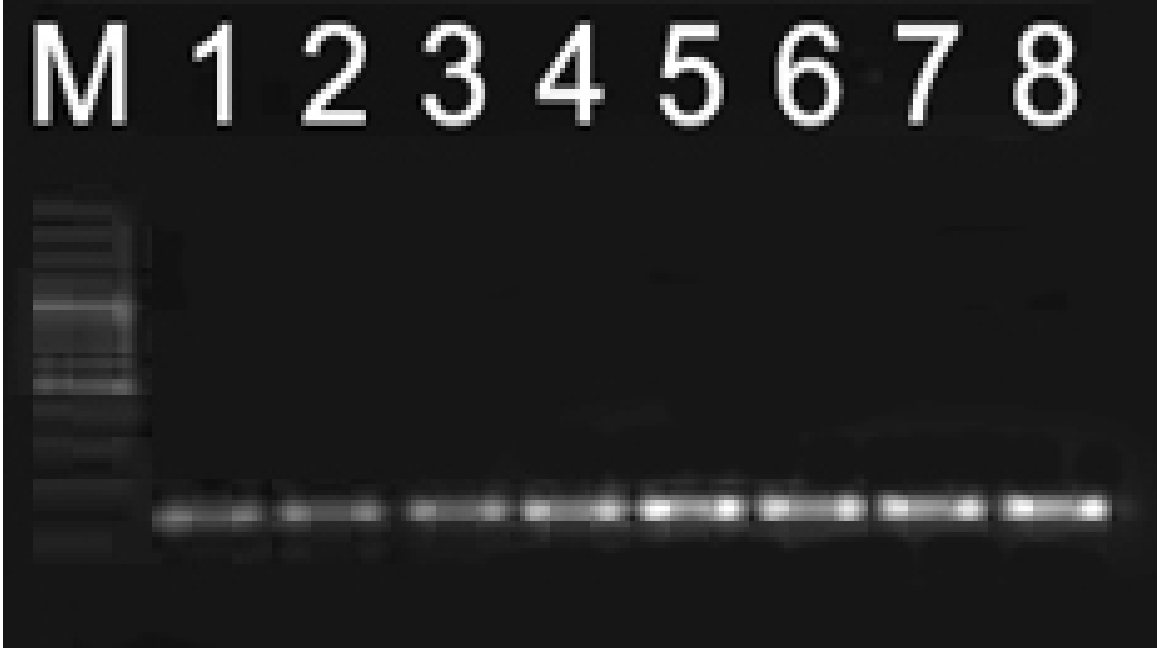
4.3.10. Yağlı sütten elde edilen *Brucella abortus*'un farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları

McF 6'ya göre hazırlanan bakteri süspansiyonları seyreltme yapılmadan süt içeren tüplere aktarıldı. Spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanarak DNA'lar elde edildi. Elde edilen DNA, amplifikasyon aşamasında 8 farklı MgCl₂ konsantrasyonu içeren karışımlarla hazırlandı. Kurulan 8 farklı deney ile; süt içerisindeki Ca⁺² iyonunun, PCR karışımı içindeki Mg⁺² iyonu ile etkileşimi değerlendirildi ve sütün içerisindeki yağın ve Ca⁺² iyonunun PCR zerine inhibitör etkisi beraber gözlendi, PCR optimizasyonu sağlandı. (şekil 4.11 ve şekil 4.12)



şekil 4.11. Yağlı sütten spin kolon yöntemi ile elde edilen *B.abortus* DNA'larının farklı MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Spin kolon ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 µl MgCl₂ karışımları ile yapılan aplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar



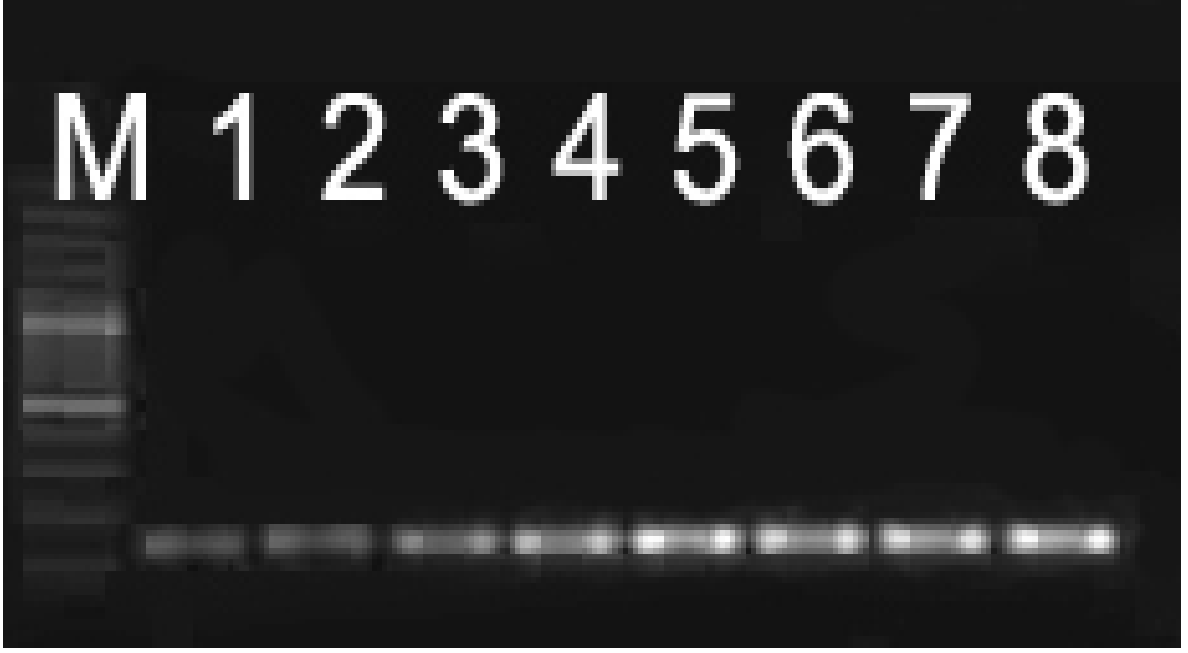
Şekil 4.12. Yağlı süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen *B.abortus* DNA'larının farklı MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 µl MgCl₂ karışımları ile yapılan amplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar.

Yağlı süttten spin kolon ve kaynatma yöntemi ile elde edilen DNA'lar farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında değerlendirildi. İki yöntem içinde MgCl₂ konsantrasyonunun 2 µl den fazla olduğu bantlarda netliğin arttığı gözlemlendi.

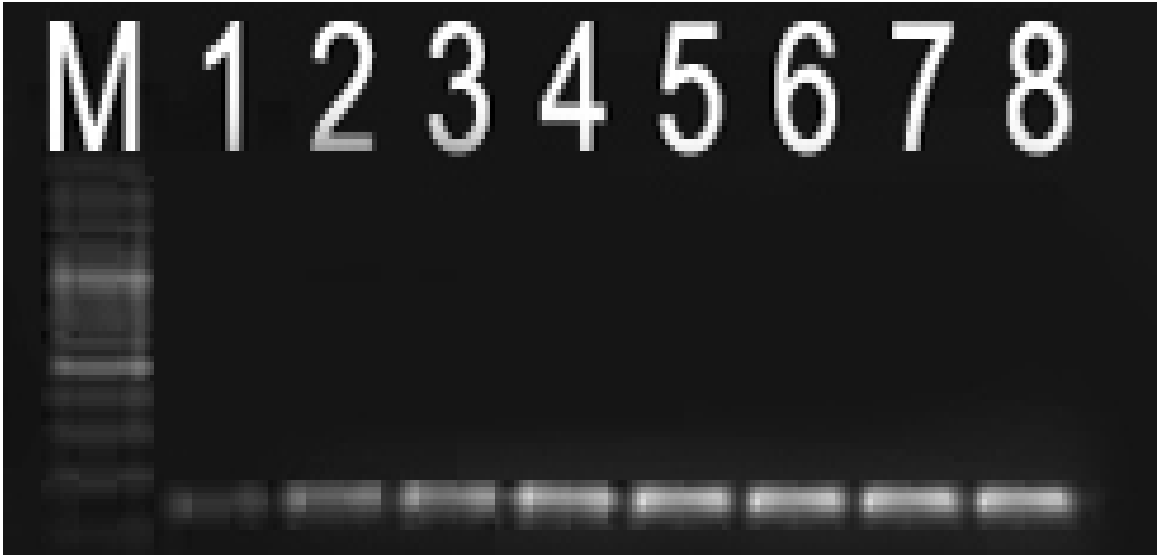
4.3.11. Yağsız süttten elde edilen *Brucella abortus*'un farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile yapılan PCR sonuçları

Sütün yağını alma işlemi bakteri süspansiyonu katılmadan yapıldı ve yağsız sütler tüplere aktarıldı. McF 5'e göre hazırlanan bakteri süspansiyonu seyreltme yapılmadan, yağsız süt içeren tüplere eklendi. Spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanarak DNA'lar elde edildi. Elde edilen DNA, 8 farklı MgCl₂ konsantrasyonu içeren karışımlarla hazırlandı ve amplifikasyona sokuldu. Yağsız süt ile hazırlanan örneklerde süt içerisindeki Ca⁺² iyonunun PCR üzerine etkisi gözlemlendi, PCR optimizasyonu sağlandı. (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14)



Şekil 4.13. Yağsız süttten spin kolon yöntemi ile elde edilen *B.abortus* DNA'larının farklı $MgCl_2$ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Spin kolon ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 μl $MgCl_2$ karışımları ile yapılan amplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar



Şekil 4.14. Yağsız süttten kaynatma yöntemi ile elde edilen *B.abortus* DNA'larının farklı $MgCl_2$ karışımları ile yapılan amplifikasyonunun elektroforezde görünümü

M:Marker (100 bp), 1 – 8: Kaynatma ekstraksiyon yöntemi uygulanan DNA'ların sırasıyla, 0.5 – 1 – 1.5 – 2 – 2.5 – 3 – 3.5 – 4 μl $MgCl_2$ karışımları ile yapılan amplifikasyonu sonrası gözlenen bantlar

Yağsız süttten spin kolon ve kaynatma yöntemi ile elde edilen DNA lar farklı MgCl₂ konsantrasyonlarında değerdendirildi. İki yöntem içinde MgCl₂ konsantrasyonunun 1 µl den fazla olduğu bantlarda netliğin arttığı gözlendi.

Bu çalışma yağlı süt ile yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında; yağlı süt ile gözlenen bantlar, 2 µl'den sonraki MgCl₂ konsantrasyonlarda belirginleşirken yağsız sütte bu değerd 1 µl konsantrasyonuna kadar düştü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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 immunolojik tanı yöntemleri geliştirilmiştir, ancak bu tekniklerin birçok eksiklikleri mevcuttur.

Brucella ve *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. Fakat gıda örneklerinin zorluğu ve içerisinde PCR inhibitörlerinin varlığı teorik kuralları sınırlar ve gıda patojenlerinin aranmasında PCR etkisini azaltır.

Listeria ve *Brucella*'nın süttten PCR ile tanımlanmasının da bazı zorlukları vardır. Bakteriyel hedef DNA'nın izolasyonu ve prosedür uygulamalarında, gıda bileşenlerinin inhibitör etkisi yapılan çalışmanın güvenilirliğini sınırlandırır. Örneğin, sütte yüksek oranda bulunan protein, yağ ve kalsiyum iyonları amplifikasyon etkisini düşürebilir. İmmünomanyetik ayırma (Gooding and Choudary 1997; Grant et al. 200; Djonje et al. 2003), santrifüjleme (Lindqvist 1997; Hsu and Tsen 2001), proteinaz parçalanması (Bickley et al. 1996; Hein et al. 2001), bakteriyel DNA'dan direk saflaştırma (Romero and Lopez-Goni1999) gibi çeşitli yöntemler ile bakteri yoğunluğu artırılır ve PCR inhibitörleri

uzaklaştırılır. Bu metotlar PCR için etkili de olsa çok zaman ve işçilik gerektirir. Ayrıca, spesifik reaktifler ve/veya ekipmanlara ihtiyaç duyulur. Bu da yüksek maliyet demektir.

Görünen o ki, gıda kaynaklı patojenlerin PCR ile teşhisinde daha hızlı, daha ucuz ve güvenilir örnek hazırlama metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülen bu çalışmada, süt içerisindeki PCR'a inhibitör etkide bulunan bileşenler saptanmış ve bu etkenlerin en aza indirilmesi araştırılmıştır. Genomik DNA'nın elde edilmesinde kolay ve kullanılır metotlar olan spin kolon ve kaynatma metotları karşılaştırılmıştır.

L.monocytogenes ve *B.abortus* süspansiyonlarının sütlere aktarılması ve süt – bakteri süspansiyonlarının farklı ortamlarda bekletilmesi ve santrifüj edilmesi ile yapılan sayım sonuçları değerlendirildiğinde; *L.monocytogenes*'in sütün yağında en fazla sayıyı verdiği gözlenmiştir. *B.abortus*'un ise süte hemen hemen homojen dağıldığı ama alt kısmındaki sayının yağa göre biraz daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda her iki bakteri için de sütün yağına tutunma özelliğinin olduğu ama *L.monocytogenes* için bu özelliğin daha fazla olduğu saptanmıştır.

PCR inhibitörlerinin saptanmasında bu çalışma için, süt yağı ve Ca etkisi araştırılmıştır. Önce FTS içerisindeki kültürden sonra süt içerisindeki kültürden yapılan PCR çalışmaları karşılaştırıldığında sütün içerisindeki bileşenlerin PCR'ı engellediği gözlenmiştir. Bunların nedenlerini araştırmak için yağlı ve yağsız süt örneklerinden ekstrakte edilen DNA'lar karşılaştırılmıştır. Bunun için spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak araştırma kapsamı genişletilmiştir.

L.monocytogenes ile yapılan PCR çalışmalarında; yağlı sütün yağsız süte göre daha fazla bant verdiği gözlenmiştir. Mikrobiyolojik çalışmalarla saptanan, bakterinin yağa tutunma özelliği, PCR aşamasında da sonuçları değerlendirmede yardımcı olmuştur. Bickley ve arkadaşları (1995), süt yağının inhibitör etkisini araştırmışlar fakat bunun için marketten aldıkları yağlı, yarım yağlı ve yağsız sütleri kullanmışlardır. Bu sütlere belirli oranlarda aktardıkları *L.monocytogenes*'in PCR sonuçlarını karşılaştırdıklarında yağın inhibitör etkisinin olmadığını savunmuşlardır. Ama market sütleri içeriğindeki yağ homojenize edildiği için çalışma tam olarak amacına ulaşmamıştır. Nguyen ve arkadaşları (2005) da süt örneklerinden *L.monocytogenes*'in DNA ekstraksiyonunu yapmışlar ve PCR

inhibitörlerini araştırmışlardır. Ama sütler hazır olarak marketten sağlanmış ve yağ etkisi saf dışı bırakılmıştır.

Bizim çalışmamızda bir işletmeden sağlanan, işlem görmemiş, bekletilmeyen sütler kullanıldığı için bakterilerin yağ tutunma özellikleri ve yağın PCR'a olan etkileri tam olarak saptanabilmiştir. Aynı işlem *B.abortus* için de gerçekleştirilmiştir. Bu bakterinin sütün içinde homojen dağılmasının sonucu olarak yağlı ve yağsız süt ile yapılan PCR çalışmaları arasında çok fark gözlenmemiştir.

Golsteyn Thomas vd (1991) *L.monocytogenes*'i süt ve sığır sütlerinden teşhis etmişler ve bu işlem için LEB'de ön zenginleştirme yapmışlardır. Bendek vd (2002) sığır mastitine neden olan *Streptococcus agalactiae*'nin çiğ süttten PCR ile teşhisini yapmışlar ve bu işlem için Strep Select Broth içinde tüm gece inkübasyona bırakmışlardır. Daha birçok çalışmada ön zenginleştirme basamağı kullanılmıştır. Wu ve Kado (2004) makalelerinde: Yavaş bir zenginleştirme prosedürü süttteki başlangıç miktarını arttırmak için kullanılabilir, dolayısıyla seyreltilmiş mikroorganizmaların seçilmesini artırır. Ama gıda maddelerinin özündeki farklılık ve mikroorganizma kontaminasyonu nedeniyle, bu metotun uygulanabilir olması için, çok sayıdaki gıda ürünlerinde çeşitli mikrobiyel patojenlerin aranmasında daha fazla çalışma gereklidir, demiştir.

Wu ve Kado (2004)'nun belirttiği gibi ön zenginleştirme basamağının riskli ve pratik bir işlem olmaması nedeniyle bu çalışmada ön zenginleştirme basamağı kullanılmamıştır. *L.monocytogenes*'in yağlı süttten kaynatma yöntemi ile teşhisinde 40 bakteriye kadar da saptama yapılabilmektedir. Diğer sonuçlara bulgular kısmında ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

PCR'a dayalı gıda patojenlerinin teşhisinde, örnek hazırlama metotlarının en önemli sorunu hızlı ve kullanımının kolay olmamasıdır. Spin kolon ve kaynatma tekniği süt örneklerinde *Listeria* ve *Brucella* için bu sorunun üstesinden gelmiştir. Spin kolon ve kaynatma ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılmasında, kaynatma tekniğinin yağlı ve yağsız süt örneklerinin ikisinde de spin kolona göre daha iyi bantlar verdiği gözlenmiştir. Kaynatma tekniğinin hızlı, kesin ve tekrarlanabilir olması; kullanılan ekipman ve reaktiflerin ucuz ve kolay ulaşılabilir olması; deneyin kısa sürmesi bu prosedürü kolaylaştırmıştır.

Bu çalışma da sütün kullanılmasıyla birçok PCR inhibitörleri ile karşılaşmıştır. Örneğin, yağlar, proteinler ve iyonlar. Ayrıca bazı seçici zenginleştirme basamaklarında kullanılan

kimyasallar da PCR aşamasını inhibe edebilir. (Sachse ve Frey 2003). Bu yüzden etkili bir ekstraksiyonun yapılması amplifikasyon başarısı için çok önemlidir.

Bickley ve arkadaşları (1995) süt içerisindeki kalsiyumun en büyük PCR inhibitörü olduğunu söylemişlerdir. Yaptıkları deneyde kalsiyumun PCR inhibisyonunu, magnezyum miktarını arttırarak düşürmüşlerdir. Her iki iyonun da +2 değerlikli olması yarışmalı bir etkileşime girmelerini ve magnezyum gibi PCR'ın hayati bileşeninin kalsiyum tarafından bastırıldığını göstermişlerdir. Bunun için süte belli oranlarda aktarılan Mg^{+2} ve Ca^{+2} konsantrasyonları ile karşılaştırma yapılmıştır. Bazı ölçülerde eklenen magnezyumun, kalsiyum iyonlarının inhibitör etkisini geri döndürdüğünü gözlemiş ve bu geri dönüşlü inhibisyonu süt örneklerinde ıspatlamışlardır.

Brunner (1976)'in belirttiği üzere, sütteki toplam kalsiyum miktarı (115 mg/100 mg), %42 kolloidal inorganik kalsiyum olarak, %27 kazeinat kalsiyum olarak, %21 çözünür kalsiyum olarak ve %10 iyonize kalsiyum olarak bulunur. (Bickley vd 1995). Burada gösterilen PCR inhibisyonundan da sorumludur. Kalsiyum iyonları, polimeraz enzim ve magnezyum iyonları arasına karışır. Kalsiyum ve magnezyum iyonlarının ikisinin de 2 değerlikli olmasıyla reaksiyonda biri diğeriyle yarışabilir. Yeterli magnezyum iyonları varlığında, enzim bu iyonları başarılı bir şekilde bağlayabilir, böylece reaksiyon ilerler. Daha fazla magnezyum eklenebilirse başlangıç etkisi kalsiyumu yarış dışı bırakır, istenen ürünleri yükseltir. Fakat, magnezyumdaki önemli artış, spesifik olmayan ürünlerin amplifikasyonuna neden olabilir. Yüksek magnezyum konsantrasyonlarının, spesifik olmayan ürün bantlarının görülmesinden daha önemli yararlı etkileri vardır. Bu yüzden, PCR'a katılan sınırlı konsantrasyondaki magnezyumun, inhibitör varlığında yine de amplifikasyon sonuçlarına pozitif etkisi vardır (Bickley vd 1995).

Bickley ve arkadaşları (1995)'nin izlediği yol bizim çalışmamız için de yol gösterici olmuştur. Ca^{+2} iyonunun etkisini azaltmak ve PCR optimizasyonu yapmak için 8 farklı konsantrasyonda Mg^{+2} hazırlanmıştır. Yağlı ve yağsız sütlerin her ikisinde de bu konsantrasyonlarla hazırlanan DNA'lar amplifikasyona sokulmuştur. Artan Mg^{+2} ile bant netliklerinde de artış gözlenmiştir. Sonuçlara bulgular kısmında ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

Innis ve arkadaşları (1990)'nın makalelerinde belirttiği gibi, Tag DNA polimeraz, kalıp DNA, primerler ve dNTPs serbest magnezyuma gereksinim duyar. Reaksiyondaki

magnezyum konsantrasyonu; primerlerin bağlanmasını, ürün spesifikliğini, kalıp ve ürünün her ikisinde de zincirleri ayrı tutan sıcaklığı, primer-dimer etkileşimini oluşturmayı, enzim aktivitesini ve bağlılığı etkiler. Bu nedenle, reaksiyondaki iyon miktarı amplifikasyon sonucunu önemli ölçüde etkiler.

Sonuç olarak bu tezde, sütte Listeri ve Brucella'nın PCR ile teşhisinin kolay ve güvenilir yöntemle saptanması sağlanmıştır. Kaynatma ekstraksiyon yönteminin yağlı ve yağsız sütün her ikisinde de spin kolon ekstraksiyon yöntemine göre daha net sonuçlar verdiği belirlenmiştir. PCR aşamasından önce yapılan mikrobiyolojik sayım çalışmalarında kurulan farklı deneyler ile her iki bakterinin de yağa tutunma özelliğinin olduğu ama Listeria'nın Brucella'ya göre bu özelliğinin daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Ayrıca bu tezde süt içerisindeki bazı bileşenlerin PCR'ı inhibe edip etmedikleri araştırılmış ve bunun için Ca^{+2} ve yağın etkisi ayrı ayrı ve beraber değerlendirilerek karşılaştırılması sağlanmıştır. Yağın PCR üzerindeki inhibitör etkisi Brucella'da daha net saptanırken, Listeria'nın yağa tutunma özelliği ile bu inhibitör etki bakteri sayısının çokluğu nedeniyle göz ardı edilmiştir. PCR üzerindeki Ca^{+2} iyonunun etkisi ise, farklı Mg^{+2} konsantrasyonları ile bakteri DNA'larının amplifikasyona sokulması ile değerlendirilmiştir. Mg^{+2} konsantrasyonundaki artış ile bant netliklerinde de artış gözlenmiştir. Böylece Ca^{+2} iyonunun inhibitör etkisi azaltılmış ve PCR optimizasyonu sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abu Al-Soud, W., and Radstrom P. 1998. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 64, No 10, p. 3748-3753.
- Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., Kimura, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood strains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* 39:362–372.
- Anonim 1994. Çiğ Süt Standardı TS 1018, Ankara.
- Anonim 2000, Çiğ süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. 14.02.2000-23964 nolu Resmi Gazete. 2000/6 Nolu Tebliğ.
- Anonim 2005a, Center for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov>.
- Anonim 2005b, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü (Mayıs, 2005). <http://www.kkgm.gov.tr>
- Anonim 2007, <http://www.genetiklab.com>
- Anonim 2008, <http://www.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asp?dosya=942124033>
- Anonim 2009a, Bruselloz, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bruselloz>.
- Anonim 2009b, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx>
- Arda, M. 1995. *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)*, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür M., Leloğlu, N. 1997. *Brucella* İnfeksiyonları. p.110-124. *Listeria* İnfeksiyonları. p.147-155. In: Özel Mikrobiyoloji. 4. baskı. Medisan Yayınevi. Ankara.
- Aydın, N., İzgür, M., Diker, K. S., Yardımcı, H., Esendal, Ö., Paracıkoğlu, J., Akan, M. 2006. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. İlke-Emek yayınları, 57-53s, 145-163s.
- Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, S., Stoker, N. G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271–275.
- Başpınar, H., Batmaz, E. S. 2006. *Hayvancılık Bilgisi*. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 5 s, Eskişehir.
- Baykal, M. 2008. Sütte Bulunan Bakteriler, <http://www.gidacilar.net/sutte-bulunan-bakteriler-t126.html>.
- Baysal A. 2004. *Beslenme*. 10.baskı. Ankara, Hatiboğlu Yayınları, Bölüm II Besinler, Süt. s: 268-275.

- Bendek, I. M., Lipkin, E., Friedman, A., Leitner, G., Saran, A., Friedman, S. ve Kashi, Y. 2002. PCR-Based Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk. American Dairy Science Association. 85:1717-1723
- Besler H., Ünal S. 2006. 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.
- Bessesen, M. T., Luo, Q., Rotbart, H. A., Blaser, M. J., Ellison, R. T. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2930-2932.
- Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G. and Parkes, H. C. 1996. 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, p. 153-158.
- Bilgehan, H. 1993. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yay. Fakülteler Kitabevi, Bornova- İzmir.
- Breer, C., Schopfer, K: *Listeria* and food. *Lancet* 2: 1022 (1988).
- Bricker, B. J., Halling, S. M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:2660–2666.
- Brown, T. A. 1991. Essential Molecular Biology Vol: 1 A Practical Approach. Oxford University Press, p.47-68. New York.
- Chernesky, M. A., Jang D., Sellors L., K. Luinstra, S. Chong, S. Castriciano, J. B. Mahony. 1997. Urinary inhibitors of polymerase chain reaction and ligase chain reaction and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for diagnosing *Chlamydia trachomatis* infected women. *Mol. Cell Probes* 11:243–249.
- Ciulla, T. A., Sklar, R. M., Hauser, S. L. 1988. A simple method for DNA purification from peripheral blood. *Analytical Biochemistry*, 174: 485-488.
- Corbel, M. J., and W. J. Brinley-Morgan. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173, p. 377–388. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Coşkun, M., Akyüz, N., Bakırcı, İ. 1990. Süt ve Mamullerinin Toplumumuzun Beslenmesindeki Yeri ve Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 1(1); 166-173, Van.
- Coşkun, M. 1995. Farklı Metotlarla Üretilen Otlu Peynirlerde Olgunlaşma Süresi Boyunca Meydana Gelen Değişmeler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, Van.
- Çiftçi, G. 2004. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. *Seminer-2. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.*

- De, S., Singh, R. K., Gupta, P. K., Palia, S. and Butchaiah, G. 2000. Genotyping of dairy animals using DNA from milk somatic cells. *Indian Journal of Animal Sciences*, 70 (9): 944-946.
- Diallo, I. O., Mackenzie, A. M., Spradbrow, P. B., Robinson, W. F. 1998. field isolates of fowl pox virus contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Dis*, 27:60-66.
- DiMichele, L. J., and M. J. Lewis. 1993. Rapid, species-specific detection of lactic acid bacteria from beer using the polymerase chain reaction. *J. Am. Brew. Chem. Soc.* 51:63–66.
- Eralp, M. 1974. *Peynir Teknolojisi*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 533, 331 s., Ankara.
- Erlich, A. H., Gelfand, D., Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252: 1643-1652.
- Erol, İ. 2007. *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü.
- FDA U.S. (Food and Drug Administration). 2010. The bad bug book: Introduction Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Listeria monocytogenes*. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html> , <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety>, <http://www.food-info.net/tr/bact/limon.htm>. Wageningen University, The Netherlands.
- Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M., and Sanborns, M. R. 1990a. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* 69:216–227.
- Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M., and Sanborns, M. R. 1990b. Rapid sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. *Biotechnol. Tech.* 4:31–34.
- Fluit, A. C., R. Terensma, M. J. C. Visser, C. J. M. Aarsman, M. J. J. G. Poppelier, B. H. I. Keller, P. Klapwijk, and J. Verhoef. 1993. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1289–1293.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional Publishers, London.
- Fekete, A., Bantle, J. A., and Halling, S. M. 1992. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:79–83.
- Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C. and Luethy, J. 1991 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* 40,372-379.
- Gahan, C. G. M. and Collins, J. K. 1991. Listeriosis : biology and implications for the food industry. *Trends in Food Science and Technology* April, 89-93.

- Gellin B. G., Broome C. V. 1989. Listeriosis. JAMA 261:1313.
- Golsteyn Thomas, E. J., King, R. K., Burchak, J. and Gannon, V. P. J. 1991. Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology. Vol 57, No 9, p. 2576-2580.
- Goossens, M., Kan, Y. 1981. DNA Analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders. Methods in Enzymology, Vol: 76.
- Güven, M. 1993. 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.
- Herman, L., Ridder, H. De. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:2099–2101.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. S. (eds). 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA.
- Jeanpierre, M. 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. Nucleic Acids Research, 15 (22): 9611.
- Johns, M. B., Paulus-Thomas, J. E. 1989. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. Analytical Biochemistry, 180: 276-278.
- Kahraman, M., Çarlı, K. T., Şen, A., Ülgen, M., Çetin, C. 2007. Genel Hayvan Hastalıkları. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi yayınları, yayın no:487, 44s, Eskişehir.
- Kampelmacher E.M. 1988 Foodborne listeriosis – facts and fections. <nfeks Derg 2:527
- Kaynar T. 2008. Brucella sunumu. Samsun SSK Bölge Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları Kliniği
- Kehrli, M. E., Shuster, D. E. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. Journal of Dairy Science, 77: 619-627.
- Khan, G., H. O. Kangro, P. J. Coates, and R. B. Heath. 1991. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. J. Clin. Pathol. 44:360–365.
- Klein, A., R. Barsuk, S. Dagan, O. Nusbaum, D. Shouval, and E. Galun. 1997. Comparison of methods for extraction of nucleic acids from hemolytic serum for PCR amplification of hepatitis B virus DNA sequences. J. Clin. Microbiol. 35:1897–1899.
- Küçüköner, E., Tarakçı, Z. 1998. Van ve Yöresinde Üretilen Cacığın (Otlı Çökelek) Bazı Özelliklerinin Araştırılması. V. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Geleneksel Süt Ürünleri, Milli Prodüktivite Yayınları: 621, 175-184 s., Ankara.
- Kwok, Ş., Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. Nature. 339, 237 - 238.

- Leclerc, V., Dufour, B., Lombard, B., Gauchard, F., Garin-Bastuji, B., Salvat, G., Brisabois, A., Poumeyrol, M., De Buysel, ML., Besse, NG., Lahellec, C. 2002. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health. *Livestock Product Sci.* 76,195-202. France.
- Lantz, P. G., M. Matsson, T. Wadstrom, and P. Radstrom. 1997. Removal of PCR inhibitors from human fecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Methods* 28:159–167.
- Lantz, P.-G., F. Tjerneld, E. Borch, B. Hahn-Hagerdal, and P. Radstrom. 1994. Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3416–3418.
- Lindqvist, R., Norling, B. and Lambertz, S. T. 1997. A rapid sample preparation method for detection of food pathogens based on buoyant density centrifugation. *Appl. Microbiol.* 24:306–310.
- Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M. and Friedmann, A. 1993. Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Sci.*, 76: 2025-2032.
- McCance and Widdowson's. 1988. *The Composition of Foods*. Fourth Edition, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, London.
- McSweeney, P. L. H. and Fox, P. F. 2008. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3-Lactose, Water, Salts and Minor Components*, 3rd. Edition, Springer Publishers, New York (in preparation).
- Miller, G. D., Jarvis, K. J., McBean, L. D. 2000. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. In: Jensen RG, Kroger M, editors. *The Importance of Milk and Milk Products in the Diet*. CRC Press, New York, p 4-24.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. and F. A. Megraud. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35:995–998.
- Montgomery, G. W., Sise, J. A. 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33: 437-441.
- Mullenbach, R., Lagoda, P. J. L and Welter, C. 1989. An efficient salt–chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends in Genetics*, 5 (12): 391.
- Nguyen, X. H., Nguyen, T. X. S., Anh, K. 2005. Simple DNA Extraction for Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of Pathogen *Listeria monocytogenes* in Milk Products. Institute of Biological and Food technology, Hanoi University of Technology.
- Niederhauser, C., Candrian, U., Hofelein, C., Jermini, M., Buhler, H. P. and Luthy, J. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1564-1568.

- O'Connor, L. 2006. Diagnostic Bacteriology Protocols. Ireland. 23-30. National Diagnostic Centre and BioResearch Ireland National University of Ireland Galway, Ireland.
- Olcen, P., P. G. Lantz, A. Backman, and P. RAdstrom. 1995. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by a seminested PCR strategy. *Scand. J. Infect. Dis.* 27:537–539
- Oliver, S. P., B. M. Jayarao, and R. A. Almeida. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2:115–129.
- Ouahrani, S., Michaux, S., Sri Widada, J., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M, and Liautard, J. P. 1993. Identification and sequence analysis of IS 6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS 6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* 139:3265–3273
- Özgül, F., Başpınar, E. 2004. Keçi Sütü Somatik Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform ve Chelex 100 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Tarım Bilimleri Dergisi.* 2005. 11(1): 16-20.
- Özkuyumcu, C. 2007. *Brucella* ders notları. p. 1-7.
<http://www.mikrobiyoloji.info/Ders/brucella2007.pdf>
- Palt-Verkuil E. 2007. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 17 – 20, 33–34, 35, 39 – 44.
- Pinner, R. W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Deaver, K. A., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D., Reeves, M., Broome, C.V., Wenger, J.D. 1992 Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. *JAMA.* 267: 2046
- Powell, H. A., C. M. Gooding, S. D. Garrett, B. M. Lund, and R. A. McKee. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 18:59–61.
- Rijpens, N. P., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R. and Herman, L. M. F. 1996. Direct Detection of *Brucella* spp. in Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization with 16S-23S rRNA Spacer Probes. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 62, p. 1683-1688.
- Rocourt, J. 1994. *Listeria monocytogenes* the state of the science. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 14, 70-82.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., and Lopez-Goni, I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:615–617.
- Rossen, L., Holmstrom, K., Olsen, J. E. and Rasmussen, O. F. 1991. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *International Journal of Food Microbiology* 14, 145-1 52.
- Sachse K., Frey J. 2003. PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 347 pp.

- Saiki, K. R., Gelfand, H. D., Stoffl, Ş, Scharf, J. Ş, Higuchi, R., Horn, T. G., Mulliş B. K., Erlich, A. H. 1988. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase. *Science*. 239, 487 - 494.
- Sambrook, J., Russel, D. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scharf, J. Ş, Horn, T.G., Erlich, A.H. 1986. Direct cloning and Sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences *Science*, 233 :1076 -1078.
- Schwartz B, Broome CV, Brown GR, Hightower AW, Ciesielski CA, Gaventa S, Gellin BG, Mascola L. 1988. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* 1:779
- Schochetman, G., Jones, K. W. 1988. Polymerase Chain Reaction. *J Inf Dls*. 158: 1154-1157.
- Starbuck, M. A. B., Hill, PJ. and Stewart, G. S. A. B. 1992. Ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 15, 248-252.
- Tayar, M., Şen, M.K.C. 2007. Hayvansal Ürünler Teknolojisi. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 60-67 s, Eskişehir.
- Terzi, G. 2006. Samsun Bölgesinden Toplanan Sütlerde Milk Ring Test ve Aglütinasyon Testi ile *Brucella* Antikorumun Araştırılması. Ondokuz Mayıs Ün. Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD., Samsun
- Tsai, Y.-L., and B. H. Olson. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:754–757.
- Uysal Kırkoyun, H., Anğ, Ö. 2003. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen *Listeria* Türleri. İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi* 33 p. 163-169, İstanbul.
- Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. D., and Grayon, M. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:292–295.
- Young, E. J. 1983. Human brucellosis. *Rev. Infect. Dis.* 5:821–842. 1688 Rijpens et al. *Appl. Environ. Microbol.*
- Wallach, J. C., Miguel, S. E., Baldi, P. C., Guarnera, E., Goldbaum, F. A., and Fossati, C. A. 1994. Urban outbreak of a *Brucella melitensis* infection in an Argentine family: clinical and diagnostic aspects. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 8:49–56.
- Wernars, K., E. Delfgou, P. S. Soentoro, and S. Notermans. 1991. Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in minced meat by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1914–1919.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3741–3751.

- Witter, JF., O'Meara, D. 1970. Brucellosis. In *Infectious Diseases of Wild Mammals*, Davis, JW, et al. (eds) Iowa State University Press, Ames, p. 249-55.
- Wu, S. J. and Kado, C. I. 2004. Preparation of milk samples for PCR analysis using a rapid filtration technique. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 1342-1346.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif YETİLMEZER

Doğum Yeri : Eskişehir

Doğum Tarihi : 17.09.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Kılıçoğlu Anadolu Lisesi (1999-2003)

Lisans : Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2003-2007)

Ön Lisans : Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Laborantlık ve
Veteriner Sağlık (2006-2008)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji
Anabilim Dalı (2007-2010)