



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***LİSTERİA MONOCYTOGENES'* İN SÜTE
TRANSMİSYONUNUN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
İZLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yunus GÜR

**SAMSUN
Temmuz-2018**



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***LİSTERİA MONOCYTOGENES'* İN SÜTE
TRANSMİSYONUNUN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
İZLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yunus GÜR

Danışman

Prof.Dr. Mustafa ALIŞARLI

**SAMSUN
Temmuz-2018**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yunus GÜR tarafından Prof.Dr. Mustafa ALIŞARLI danışmanlığında hazırlanan “*Listeria monocytogenes*’ in Süte Transmisyonunun Moleküler Yöntemlerle İzlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 06 /07/ 2018 tarihinde yapılan sınav ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Mustafa ALIŞARLI. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörü

Üye: Prof.Dr. Göknur TERZİ GÜLEL. OMÜ Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD.

Üye : Prof.Dr. Ahmet Hilmi ÇON. OMÜ Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği ABD.

Üye: Prof.Dr. Mustafa ATASEVER. Atatürk Üni.Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD.

Üye: Prof.Dr. Süleyman ALEMDAR Cumhuriyet. Üni. Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD.

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

/ / 2018

İmza

Ünvanı Adı SOYADI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde desteğini ve önerilerini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa ALIŞARLI' ya ve tez izleme komitemde yer alan değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Göknur TERZİ GÜLEL ve Sayın Prof.Dr. Ahmet Hilmi ÇON'a şükranlarımı sunarım.

Ayrıca projenin laboratuvar ve metot çalışmalarında yeni fikir ve tavsiyelerini önerip, bu projede kullanılmasında büyük yardımları olan mesai arkadaşım ve meslektaşım Veteriner Hekim Atanur TEZEL'e, çalışmalarım sırasında laboratuvar analiz metotlarının oturtulmasında yardımcı olan Veteriner Hekim Dr. Hamza KADI, Veteriner Hekim Dr. Emre ÖZAN'a ,istatistiksel analizlerde desteğinden dolayı Veteriner Hekim Nuh UZUN'a, Veteriner Hekim Yunus KILIÇOĞLU' na, fakültede Doç. Dr. Özgür ÇADIRCI, Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan İNAT ve Yrd. Doç. Dr. Habip MURUZ ile değerli dostum Arş. Gör. Tolga UYANIK'a, desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışma materyallerinin temininde büyük yardımları olan Veteriner Hekim Sinan PİR'e, Kavak, Bafra ile Amasya'daki özel işletme meslektaşlarıma ve Tokat'ta özel işletmesinden yine bana yardımları dokunmuş rahmetli Şenel ÇAVUŞOĞLU' na, görev yaptığım kamu kuruluşu Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde müdürüm İsmail AYDIN'a, son olarak manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli annem, babam ve kardeşime teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.13.008 kod numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi, TAGEM / HSGYAD / 14 / A02 / P02 / 40 kod numarası ile de Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

LİSTERİA MONOCYTOGENES' İN SÜTE TRANSMİSYONUNUN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İZLENMESİ

Amaç: Bu çalışmada Samsun, Amasya ve Tokat illerindeki süt çiftliklerinde, yapım aşamasında silajlardan süt tankına kadar bulaşma risk noktalarında *Listeria monocytogenes* tespiti, geliştirilecek modifiye analiz metodu ile konvansiyonel metotların karşılaştırılması, izolatlarda virulens varlığı ve PFGE ile bulaşma risk noktaları arasındaki ilişkinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Samsun, Tokat ve Amasya'daki 6 adet süt işletmesinden 234 adet (Ağustos-Eylül ayında silaj yapım aşamasında 3'er adet - 0. gün, 15. gün, 30. gün - toplam 18; Aralık-Ocak-Şubat ve Mayıs-Haziran-Temmuz aylarında silajların sığırlara verilmesi aşamasında her işletmeden 6'şar adet – silaj, silaj suyu, fekal örnek, meme yıkantı süt, süt tankı- toplam 216 adet) çalışmada materyal olarak kullanıldı. *L. monocytogenes* analizi silaj, silaj suyu, fekal örnek, meme yıkantı örneklerinden USDA-FSIS, süt ve süt tankı örneklerinde ISO 11290-1 ile yapıldı. Bu konvansiyonel analiz metotları yanında modifiye analiz metotları da kullanıldı ve analiz metotları ile karşılaştırıldı. Tüm *L. monocytogenes* izolatlarının virülensi *inlA*, *inlC* ve *inlJ* yönünden incelendi. İzolasyon noktalarındaki risk oranları gösterildi.

Bulgular: Tüm örneklerden 2 adet (% 0,85), silaj verildiği dönemdeki silaj, silaj suyu, fekal örnek, meme yıkantı süt, süt tankı örneklerinin sadece 1 adet (% 2,78) meme yıkantı örneğinden, 1 adet (% 2,78) süt tankından *L. monocytogenes* izole edildi. Silaj yapım aşamasındaki örneklerin hiçbirinden *L. monocytogenes* tespit edilmedi. Silajların hayvanlara verildiği dönemde *L. monocytogenes* izolasyonu 2/216 (% 0,93), *Listeria* spp. ise 41/216 (% 18,98) oranında izole edildi. En fazla izole edilen tür 39/216 (% 18,05) ile *L. innocua* olarak tespit edildi. odifiye metotlar konvansiyonel metotlarla uyumlu sonuç verdi. *L. monocytogenes* izolatlarının her ikisinde de *inlA*, *inlC* ve *inlJ* varlığı tespit edildi.

Sonuç: Silajların hayvanlarda Listeriozis açısından riskli olduğu, silajlardan *L. monocytogenes* izolasyonu olmasa da indikatör olarak tanımlanmış türlerin izolasyonu ile risk taşıdıkları, silajdan süt tankına olan noktaların bir gıda enfeksiyonu olan Listeriozis yönünden tehlike oluşturabilecekleri, yüksek virülensli izolatların tespiti ile gösterilmiştir. Analiz sürelerinin kısaltılması için modifiye metotlar uygulanabilir.

Anahtar kelimeler: *Listeria* spp.; *Listeria monocytogenes*; süt; transmisyon

Yunus GÜR, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, 2018

ABSTRACT

MONITORING THE TRANSMISSION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* TO MILK THROUGH MOLECULAR METHODS

Objective: The objective of this study is to identify *Listeria monocytogenes* at transmission risk points from the production phase to silages in dairy farms in the provinces of Samsun, Amasya and Tokat, to compare the developed modified analysis method and conventional methods and to show the association between presence of virulence in isolates and risk points of transmission of PFGE.

Material and Method: 234 from a total of 6 dairies in Samsun, Tokat and Amasya (3 from each during the silage making process -on day 0, day 15 and day 30- 18 in total in August-September; 6 from each dairy during the process of giving the silage to cattle -silage, silage water, fecal sample, udder washing milk, milk tank-216 in total in December-January-February and May-June-July) were used as material in the study. Analysis was conducted with USDA-FSIS in silage, silage water, faecal sample and udder affluent samples and with ISO 11290-1 in milk and milk tank samples. In addition to these conventional analysis methods, modified analysis methods were also used and the analysis methods used were compared. Virulence of the isolates was compared in terms of *inlA*, *inlC* and *inlJ*. Rates of risk in isolation points were shown.

Results: *L. monocytogenes* (0.85%) were isolated from all samples, 1 (2.78%) from udder affluent sample and 1 (2.78%) from milk tank among the samples during the period when silage was given. *L. monocytogenes* was not found in any of the samples in silage production phase. In the period when silage was given to animals, *L. monocytogenes* isolation was 2/216 (% 0.93), while *Listeria* spp. isolation was 41/216 (18.98%). The most isolated species was *L. innocua* with 39/216 (18.05%). Modified methods gave results in line with conventional methods. *inlA*, *inlC* and *inlJ* presence was found in both of the obtained *L. monocytogenes* isolates.

Conclusion: It was shown with the identification of high virulence isolates that silages are risky in animals in terms of Listeriosis; although *L. monocytogenes* isolation is not found in silages, they have risks with the isolation of species defined as indicator, and the points from silage to milk tank can create a danger in terms of Listeriosis, which is a food infection. modified methods can be applied to shorten analysis periods.

Key Words:

Keywords: *Listeria* spp.; *Listeria monocytogenes*; milk; transmission

Yunus GÜR, Phd Thesis
Ondokuz Mayıs University – Samsun, 2018

KISALTMALAR

ActA:	Aktin indükleyen protein
ALOA	Agar Listeria Ottavani- Agosti
ATCC:	American Type Culture Collection
BAX-PCR:	Dupont® geliştirdiği bir PCR metodu
BetL:	Glisin betain transport Listeria
BHI:	Brain heart infusion
BLEB:	Buffered Listeria Enrichment Broth
CAMP:	Christie, Atkins, Munch-Peterson
CASO:	Casein soja
Cq:	Quantification cycle
D₅₅ değeri:	55 °C' de belli sayıda mikroorganizmanın %90'ını öldürmek için gereken süre
ECDC:	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA :	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
FDA-BAM:	Food and Drug Administration -Bacteriological Analytical Manual
FTS :	Fizyolojik tuzlu su
GadA:	Glutamat dekarboksilaz A
GadB:	Glutamat dekarboksilaz B
GadC:	Glutamat dekarboksilaz C
gbu:	Glisin betain uptake
HGF:	Hepatocyte growth factor
Hly:	Hemolizin geni
IpaH:	İnvasion plasmid antigen H geni
ISO:	International Organization for Standardization
iap:	Invasion associated protein
inlA:	İnternalin A
inlAB:	İnternalin AB
inlB:	İnternalin B

<i>inlC:</i>	İnternalin C
<i>inlC2:</i>	İnternalin C2
<i>inlD:</i>	İnternalin D
<i>inlE:</i>	İnternalin E
<i>inlF:</i>	İnternalin F
<i>inlG:</i>	İnternalin G
<i>inlH:</i>	İnternalin H
<i>inlJ:</i>	İnternalin J
LAB:	Laktik asit bakterileri
Lc.:	Leuconostoc
LLO:	Listeriolizin O
LRR:	Leucine rich repeats
MEE:	Multilocus enzyme electrophoresis
MOPS :	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
MOX:	Modifiye Oxford
Mpl:	Metalloproteinase listeria
MPN-PCR:	Most probable number-PCR
MRD:	Maximum recovery diluent
MR-VP:	Methyl-red Voges-Proskauer
ORF:	Open reading frame
PALCAM:	Polymyxin-Acriflavin-Lithium chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol
PC-PLC:	Fosfatidilkolin-spesifik fosfolipaz C
PCR	Polymerase chain reaction
PI-PLC:	Fosfatidil inositol-spesifik fosfolipaz C
plcA:	Fosfatidil inositol-spesifik fosfolipaz C kodlayan bir gen
plcB:	Fosfatidil inositol-spesifik fosfolipaz C kodlayan bir gen
prfA:	Pleiotropic virulence regulator gene
rrn:	Bir ribozomal operon
rRNA:	Ribozomal RNA
RTi-PCR:	Real time PCR
SIM:	Sulfat-indole-motility

SspH1:	Salmonella secreted protein H1
SspH2:	Salmonella secreted protein H2
TSA-YE:	Tryptic soy agar-yeast extract
USDA-FSIS:	United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service
UVM:	University of Vermont Medium
ykpA:	ATP bağlayıcı bir protein
YopM:	Yersinia outer membrane proteine
σB:	Sigma B



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Taksonomisi	9
2.2. Morfolojik, Biyokimyasal ve Antijenik Özellikleri.....	10
2.3. Gelişimini Etkileyen Faktörler.....	14
2.3.1. pH	14
2.3.2. Sodyum Klorür	14
2.3.3. Su Aktivitesi	16
2.3.4. Osmotolerans Faktörler	17
2.4. Virulens.....	18
2.5. İnternalinler.....	21
2.6. Patogenez	24
2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık	26
2.8. Bakteriyosinler.....	26
2.9. <i>Listeria monocytonegenes</i> ve diğer <i>Listeria</i> Türlerinin Epidemiyolojisi.....	28
2.9.1. Sularda <i>Listeria</i>	29
2.9.2. Kanalizasyon ve Atık Sularda <i>Listeria</i>	29
2.9.3. Toprak ve Tarımsal Alanlarda <i>Listeria</i>	30
2.9.4. Gıdalarda <i>Listeria</i>	30
2.9.5. Sebze ve Meyvelerde <i>Listeria</i>	31
2.9.6. Et ve Et Ürünlerinde <i>Listeria</i>	32
2.9.7. Su Ürünlerinde <i>Listeria</i>	33
2.9.8. Sütte <i>Listeria</i>	34
2.9.9. Hayvanlarda Listeriozis	36
2.10. Hayvan Yemlerinde <i>Listeria</i>	37
2.10.1. Hayvan Yemi Olarak Silaj.....	37

2.10.2. Silajda Listeria.....	43
2.11. Kültürel İzolasyon Metotları.....	44
2.11.1. ISO 11290.....	44
2.11.2. USDA-FSIS.....	44
2.11.3. FDA-BAM.....	45
2.11.4. Moleküler Metotlar.....	45
2.11.5. İmmünolojik Tiplendirme.....	46
2.11.6. Kütleli Spektrometrik İdentifikasyon.....	46
2.11.7. Moleküler Tiplendirme.....	46
2.11.8. Antikor Destekli Analiz Metotları.....	48
3. MATERYAL VE METOT.....	50
3.1. Materyal.....	50
3.1.1. Silaj Yeminin Hazırlanması Sırasındaki Örneklemeler.....	50
3.1.2. Olgunlaşmış Silajların Süt Sığırlarına Verilmeye Başladığı Günden Sonra Süt Sığır İşletmelerinden Yapılan Örneklemeler.....	51
3.2. Metot.....	52
3.2.1. Analizde Kullanılan Besi Yeri ve Ayraçlar.....	53
3.2.2. Biyokimyasal Testler.....	57
3.2.3. Çalışmada Kullanılan Referans Suşlar.....	58
3.2.4. Modifiye USDA-FSIS.....	59
3.2.5. ISO 11290-1.....	61
3.2.6. Modifiye ISO 11290-1.....	61
3.2.7. Analiz Metotlarının Optimizasyonu.....	61
3.3. İstatistiksel analiz.....	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. Optimizasyon sonuçları.....	73
4.1.1. Referans Kültür <i>L. monocytogenes</i> ' in Üretilmesi ve RTi-PCR Analizinin Optimizasyon Sonuçları.....	73
4.1.2. Yapay Kontamine Edilmiş Örneklerde <i>L. monocytogenes</i> İzolasyonu ve RTi-PCR ile Analizinin Optimizasyon Sonuçları.....	73
4.1.3. Listeria Tür Tayini İçin Multipleks PCR' ın Optimizasyon Sonuçları.....	76
4.1.4. <i>L. monocytogenes</i> Virulens Tayini için Multipleks PCR Optimizasyon Sonuçları.....	78

4.2. <i>L. monocytogenes</i> ' in İzolasyonu.....	79
4.2.1. Silaj Yapım Aşamasındaki Örneklerde <i>L. monocytogenes</i> İzolasyonu.....	79
4.2.2. Süt Sığır İşletmelerinden Alınan Örneklerde <i>Listeria monocytogenes</i> izolasyonu	80
4.2.3 Silaj ve Silaj Suyunda <i>Listeria monocytogenes</i> ' in İzolasyonu.....	96
4.2.4 Silaj ve Silaj Suyu Dışındaki Örneklerde <i>Listeria monocytogenes</i> ' in İzolasyonu	97
4.3. <i>Listeria</i> türlerinin Multipleks PCR Sonuçları	97
4.4. <i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının Multipleks PCR ile Virulens Analiz Sonuçları	98
4.5. Silaj Yeminin Hazırlanması Sırasında pH' nın ve İzolasyondaki Etkileri	98
4.6. Süt Sığırlarına Verilen Silajlarda pH Aralığı ve <i>Listeria</i> spp. İzolasyonu	100
4.7. Konvansiyonel ve Modifiye Analizlerin Karşılaştırması	104
4.8. İstatistiksel değerlendirmeler	111
5. TARTIŞMA.....	113
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	118
KAYNAKLAR	119

1. GİRİŞ

Besinler et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, sebzeler ve meyveler ile ekmek ve tahıllar olarak dört ana besin grubu şeklinde gruplandırılır. Bunlardan birini süt ve süt ürünleri teşkil eder. Besin profilindeki protein (özellikle esansiyel), spesifik mineraller (kalsiyum ve fosfor), vitaminler (B₂ ve B₁₂ gibi) ve yağ (özellikle esansiyel yağlar) zenginliği sütü insan beslenmesinde önemli kılmaktadır (Ünal ve Besler, 2008). Avrupa birliği ülkelerinde süt tüketimi kişi başı ortalama 331 kg/yıl' dır. Türkiye'de ise bu değer yaklaşık 259 kg/yıldır. Son üç yılda bazı ülkelerde yıllık üretim miktarı Tablo 1' de gösterilmiştir (FAO, 2016).

Tablo 1. Dünya süt üretiminde ilk 10 ülke ve son 3 yıldaki üretim değerleri (1000 ton) (FAO'dan, 2016)

Ülke	Üretimde Dünya Sıralaması	Yıllar		
		2012-2014	2015	2016
Avrupa Birliği	1	155233	163500	165700
Hindistan	2	136578	148150	155200
Amerika Birleşik Devletleri	3	91866	94480	96345
Çin	4	41944	42526	43376
Pakistan	5	38944	41000	42000
Brezilya	6	34363	35203	36270
Rusya Federasyonu	7	30924	30025	29985
Yeni Zelanda	8	20174	21909	21520
Türkiye	9	18376	19700	20000

Süt, bu profili nedeni ile birçok mikrobiyolojik canlının yaşaması için ortam sağlayabilmektedir. Bunlar insan için yararlı mikroorganizmalar yanında (fermentasyon bakterileri, probiyotikler), enfeksiyöz olabilen mikroorganizmalar da (*Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp. vb.) olabilmektedir. Bunlardan biri de insanlarda patojen ve zoonoz karakterde olan *Listeria monocytogenes*'dir.

Listeria monocytogenes ilk defa 1926 yılında laboratuvar hayvanları kanından Gram pozitif izole edilmiş ve *Bacterium monocytogenes* olarak isimlendirilmiştir (Murray ve ark., 1926). Sonraki çalışmalarda bakteri insan, gıda ve çevresel olarak da izole edilmiştir (Hof, 2003). Gıda kaynaklı çok sayıda salgında tespit edilmiş, birçok

gıdada varlığı gösterilmiştir. Bugün riskli gıdalar olarak salam, sosis, kırmızı et yanında hindi ve tavuk orjinli çiğ etler, marul, mantar, rokfor gibi peynirler, midye ve somon gibi deniz ürünleri ve açıldıktan sonra ısıtılmış her türlü konserve ürünleri sayılabilmektedir. Bunlar yanında süt orjinli Listeriozis olguları da tespit edilmiştir. Özellikle soğuk olarak saklanmakta olan dondurma kaynaklı vakalar olabilmektedir (Ryser ve Marth, 2007a).

Bugün kontamine gıdaların tüketilmesi ile bir patojen olarak *L. monocytogenes*, insanlarda abort, septisemi, menenjit, ensefalit ve ölümlü sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Gandhi ve Chikindas, 2007). Hücre içi bir patojen olması ile *L. monocytogenes*' in en çok yeni doğanlar, gebeler, yaşlı ve immun sistemi baskılanmış kişilerde risk oluşturabilmektedir (Tablo 2). Hastalık insanlarda merkezi sinir sistemi formu, akut-septik form, glandular form, lokal form ve kronik septik form olarak farklı formlarda seyir gösterdiği ve yüksek mortaliteli enfeksiyon şekillendirdiği bilinmektedir (Hof, 2003).

Tablo 2. Toplum farklı bireylerin Listeriozis insidensleri (Hof'dan, 2003)

	İnsidens (100000 kişi)
Normal popülasyon	0,7
Yaşlılar (>70)	2
Alkolikler	5
Diyabetli bireyler	5
Aşırı demir yüklemesi	5
Hamile bireyler	12
Kanserli bireyler	15
Steroid tedavili bireyler	20
Lupus eritematözülü bireyler	50
Böbrek transplantasyonu	100
Kronik lenfatik lösemi	200
AIDS	600
Lösemi (akut monositik+akut lenfoblastik)	1000

Her ortam şartında yaşayabilmesi bu bakteriyi çevresel bir risk olarak öne çıkarmaktadır. Bugün bu bakterinin varlığı çevresel olarak atık sularda, kanalizasyonda, gıda işleme tesislerinde, kültür hayvanlarının bakıldığı çiftlik ortamlarında, hayvan feçesi ve besin kaynakları olan yemlerde (silaj vs.) gösterilmiştir. Özellikle soğuk ortamlarda

üreyebilmesi bu etkenin önlenmesini güçleştirmektedir (Ryser ve Marth, 2007b). 2017 yılında Avrupa Birliği ülkelerden aldığı veriler ile Listeriozis olgularını değerlendirmiş ve rapor yayınlamıştır. Bu veriler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. AB ülkelerinde 2010-2014 yılları arasında *L. monocytogenes* yönünden bildirilip doğrulanan vaka sayıları ve oranları (European Centre for Disease Prevention and Control’dan ; 2017)

Ülke	2010		2011		2012		2013		2014	
	Vaka	Oran	Vaka	Oran	Vaka	Oran	Vaka	Oran	Bildirilen Vaka	Doğrulan Vaka
Avusturya	34	0,4	26	0,3	36	0,4	36	0,4	49	49
Belçika	40	0,4	70	-	83	0,7	66	0,6	84	84
Bulgaristan	4	0,1	4	0,1	10	0,1	3	0	10	10
Hırvatistan	-	-	-	-	0	0	0	0	5	4
Kıbrıs Rum Kesimi	1	0,1	2	0,2	1	0,1	1	0,1	0	0
Çekya	26	0,2	35	0,3	32	0,3	36	0,3	38	38
Danimarka	62	1,1	49	0,9	50	0,9	51	0,9	92	92
Estonya	5	0,4	3	0,2	3	0,2	2	0,2	1	1
Finlandiya	71	1,3	43	0,8	61	1,1	61	1,1	65	65
Fransa	-	0,5	282	0,4	348	0,5	369	0,6	374	374
Almanya	377	0,5	331	0,4	414	0,5	463	0,6	609	597
Yunanistan	10	0,1	10	0,1	11	0,1	10	0,1	10	10
Macaristan	20	0,2	11	0,1	13	0,1	24	0,2	39	39
İzlanda	1	0,3	2	0,6	4	1,3	1	0,3	4	4
İrlanda	10	0,2	7	0,2	11	0,2	8	0,2	15	15
İtalya	157	0,3	129	0,2	112	0,2	128	0,2	52	52
Letonya	7	0,3	7	0,3	6	0,3	5	0,2	3	3
Lihtenştayn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Litvanya	5	0,2	6	0,2	8	0,3	6	0,2	7	7
Lüksemburg	0	0	2	0,4	2	0,4	2	0,4	5	5
Malta	1	0,2	2	0,5	1	0,2	1	0,2	1	1
Hollanda	72	0,4	87	0,5	73	0,4	72	0,4	90	90
Norveç	22	0,5	21	0,4	30	0,6	21	0,4	29	29
Polonya	59	0,2	62	0,2	54	0,1	58	0,2	86	86
Portekiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Romanya	6	0	1	0	11	0,1	9	0	5	5
Slovakya	5	0,1	31	0,6	11	0,2	16	0,3	29	29
Slovenya	11	0,5	5	0,2	7	0,3	16	0,8	18	18
İspanya	129	1,1	91	0,8	109	0,9	140	1	161	161
İsveç	63	0,7	56	0,6	72	0,8	93	1	125	125
Birleşik Krallık	176	0,3	164	0,3	183	0,3	192	0,3	201	201
Avrupa Birliği	1686	0,4	1539	0,4	1756	0,4	1890	0,4	2207	2194

Amerika Birleşik Devletleri 2015 verilerine göre insanlarda gıda kaynaklı bakteriyel etkenler içinde etmenlerde ilk 8 etmenin sonu olarak *L. monocytogenes* Tablo 4 ve Tablo 5’de gösterilmiştir (FDAS, 2017).

Tablo 4. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2015 verilerine göre gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve dağılımları (FDAS'den, 2017)

Gıda Kaynaklı Bakteri	Vaka Sayısı
<i>Campylobacter</i>	6289
<i>Salmonella</i>	7719
<i>Shigella</i>	2645
STEC - O 157	807
STEC +O 157	465
<i>Vibrio</i>	195
<i>Yersinia</i>	139
<i>Listeria</i>	116

Tablo 5. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2015 verilerine göre gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve indidense oranları (FDAS'den, 2017)

Gıda Kaynaklı Bakteri	İnsidens oranı
<i>Salmonella</i>	15,74
<i>Campylobacter</i>	12,82
<i>Shigella</i>	5,39
STEC O 157 Negatif	1,65
STEC O157	0,95
<i>Vibrio</i>	0,4
<i>Yersinia</i>	0,28
<i>Listeria</i>	0,24

Amerika Birleşik Devletleri'nde Listeriozis bebek, yaşlı, hamile gibi immunité önemli risk taşıdığı bireylerde problem olarak öne çıkmaktadır. Söz konusu problem hakkında vaka insidenslerinin yaşlara göre dağılımı Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. Amerika Birleşik Devletleri' nde 2015 verilerine göre en önemli 5 gıda kaynaklı enfeksiyon ve vaka- insidenslerinin yaşlara göre dağılımı (FDAS'den, 2017)

Yaş	<u>Campylobacter</u>		<u>Listeria</u>		<u>Salmonella</u>		<u>Shigella</u>	
	Vaka adeti	insidens	Vaka adeti	insidens	Vaka adeti	insidens	Vaka adeti	insidens
<5	616	20,83	8	0,27	1,665	56,3	550	18,6
5-9	253	8,19	0	0	552	17,86	547	17,7
10-19	504	7,99	0	0	682	10,81	208	3,3
20-29	945	13,9	3	0,04	949	13,96	339	4,99
30-39	815	12,5	2	0,03	728	11,16	328	5,03
40-49	821	12,79	9	0,14	738	11,5	254	3,96
50-59	918	13,38	17	0,25	905	13,19	242	3,53
60-69	803	14,83	20	0,37	740	13,67	118	2,18
70-79	419	14,39	32	1,1	496	17,04	39	1,34
80+	194	11,03	25	1,42	264	15,02	20	1,14
Bilinmeyen	1	-	0	-	0	-	0	-

FDAS verilerine göre (Tablo 7) Amerika Birleşik Devletleri' nde Listeriozis ölümcül vakalar sıralamasında ise ikinci olması bu etkenin önemini ortaya koymaktadır (FDAS, 2017).

Dünyada 1987-2012 yılları arası yapılan çalışmalarda veriler dikkate alındığında Listeriozis insidensi 0-19,7 aralığında kendisini göstermiştir Türkiye'de süt üzerine yapılan *L. monocytogenes* çalışmalarında ise insidens % 0-2,16 arasında bulunmuştur (Botsaris ve ark., 2016).

Silajlar bugün hayvanlara verilen yemlerden biridir. Özellikle süt sığırlarında başarılı olarak kullanılan bu yem birçok yeşil bitki ile (yonca, ayçiçeği, mısır) ile yapılabilmektedir. Silaj yapımında artık en yaygın bitki kabul edilen mısırdaki ise ülkemizde ekim alanları yaklaşık % 68'i tanelik, % 32' si ise silajlık ekim olarak dağılım göstermektedir (Agrotime, 2017).

Tablo 7. Amerika Birleşik Devletleri' nde 2015 verilerine göre gıda kaynaklı patojenlerde enfeksiyon ve ölüm oranları (FDAS'den, 2017)

Bakteri	Ölüm	Bilinmeyen	Enfeksiyon	Ölüm Oranı
<i>Campylobacter</i>	13	393	6289	0,21
<i>Listeria</i>	15	2	116	12,93
<i>Salmonella</i>	32	142	7719	0,41
<i>Shigella</i>	1	69	2645	0,04
STEC + O 157	3	6	465	0,65
STEC - O 157	1	5	807	0,12
<i>Vibrio</i>	5	4	195	2,56
<i>Yersinia</i>	1	5	139	0,72

Silajlık mısır, aynı zamanda çok kaliteli bir kaba yem kaynağıdır. Performansı yüksek ve lezzetli olduğu bildirilmiştir. Silaj, tazesine en yakın şekilde besin içeriğini muhafaza eden bir depolama yöntemi olduğu bilinmektedir. Suyun ve sıcaklığın uygun olduğu her yerde silajlık mısır üretimi yapılabilmektedir. Bugün Türkiye'de yaklaşık 14 milyon ton silajlık mısır üretimi yapılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri' nde ise bu değer 109 milyon ton civarındadır (Türkmen, 2013).

Yüksek su içermesinden dolayı silaj *L. monocytogenes*' in hayvanlara en önemli bulaşma yollarında biri olarak kabul edilmektedir (Fenlon ve ark., 1989). *L. monocytogenes*' in sıcaklık ve pH'ya toleranslı olmaları bu etkenin silaj ile bulaşmasında önemli bir yol oluşturmaktadır. Kalitesiz silaj yapılması pH seviyelerinde artışa yol açacağından Listerialara yaşam için imkan açmaktadır (Driehuis, 2013). Kontamine silajların sığır ve keçilere yedirilmesi ile sporadik Listeriozis olgularının olduğu bildirilmiştir (Fenlon, 1986a; Ho ve ark., 2007). Aynı zamanda *Listeria* içeren silajların yenmesi ile sadece klinik belirtili değil, bunun yanında asemptomatik Listeriozis gösteren hayvanların feçeslerinde de *Listeria* spp. izole edildiği bildirilmiştir (Unnerstad ve ark., 2000; Ho ve ark., 2004; Vilar ve ark., 2007). Ülkemizde de silajlarda *Listeria* varlığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda silajlarda % 0-6,6 arasında *Listeria* spp. izole edilmiştir (Taşçı ve ark., 2010; Çokal, 2014; Durmaz ve ark., 2015).

Süt Listeriaların insanlara bulaşmasında önemli gıda maddelerinden biridir. Gerek üretim işletmelerinde, gerekse işleme tesislerinde bu bakterinin önemli bir risk olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Ryser ve Marth, 2007c).

İneklerde *L. monocytogenes*' in 10^3 kob / mL ya da daha fazla miktarlarda süte geçmektedir (Lovett, 1988). Listeria' lardan ileri gelen mastitis olgularında ise Listeria bakterilerinin 2×10^4 kob / mL düzeyinde sütle atıldığı belirtilmiştir (Lovett ve Twedt, 1988).

Özellikle mastitli ineklerle süte geçebilmesi yanında, sağım sırasında kullanılan alet ve cihazlar ile bulaşabildiği bildirilmiştir (Schoder ve ark., 2011). Birçok çalışma ve survey çalışması ile tesislerde filtreler, süt tankı vb. noktalarda Listeria varlığı gösterilmiştir (Miao ve ark., 2003; Moshtaghi ve Mohamadpour, 2007; Paris ve ark., 2009; Konosonoka ve ark., 2012; Jamali ve ark., 2013; Rahimi ve ark., 2014). *L. monocytogenes* izole edilemeyen çalışmalarda ise çoğunlukla *L. innocua* izole edilmiş ve değerlendirme sonucu bu bakteri *L. monocytogenes* için indikatör bakteri kabul edilerek *L. monocytogenes*' in olabileceği değerlendirilmeleri yapılmıştır ve halen yapılmaktadır (Ryser ve Marth, 2007d).

Günümüzde *L. monocytogenes* izolasyonu USDA-FSIS (United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service), ISO 11290-1 ve FDA-BAM (Food and Drug Administration -Bacteriological Analytical Manual) olmak üzere üç farklı analiz yöntemiyle yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu üç analiz metodu zaman zaman kullanılmaktadır. Gıda ve süt analizlerinde çoğunlukla ISO 11290-1 kullanılırken, yüksek kontaminasyonlu olabilen çevresel örneklerde USDA-FSIS tercih edilmektedir. Her ne kadar gıda için de optimizasyonları yapılsa da Amerika Birleşik Devletleri' nde yapılan analizlerde çoğunlukla USDA-FSIS' in tercih edildiği görülmektedir. Söz konusu analiz metotlarının 6-7 gün gibi uzun bir süre alması, alternatif olabilecek test metotlarının denenmesini veya bunların diğer analiz metotlarına entegre edilmesini beraberinden getirmiştir. Yapılan bazı çalışmalar ile moleküler testler denenmiş, bu analiz metotları ile karşılaştırılmıştır (Cocolin ve ark., 2002; Sauders ve ark., 2003; Doumith ve ark., 2004; Frece ve ark., 2010)

Bugün için kullanılan ve moleküler izlemelerde altın test kabul edilen PFGE, moleküler tiplendirmede kullanılan bir testtir. Halen dünyada birçok resmi otorite

tarafından kullanılmakta, elde edilen verilerin bir veri tabanına işlenmekte ve gelecek salgınlarda yardımcı veri olması amacı ile saklanmaktadır (Dalmasso ve Jordan, 2014).

Bu çalışmada Samsun, Tokat ve Amasya illerinden seçilen ve silaj beslemesi yapan hayvan sayıları ortalama olarak 100' den fazla olan 6 adet süt işletmesinden yapılan örneklemeler ile i) *L. monocytogenes* analiz metotlarına Real-Time PCR testi eklenerek analiz metodu geliştirilmesi ve bunun optimizasyonu, ii) Konvansiyonel analiz metotları yanında optimize edilerek geliştirilecek modifiye analiz metodu ile *L. monocytogenes* varlığının araştırılması, iii) elde edilen izolatlarda virulens varlığının bakılması, iv) riskli bulaşma noktalarından elde edilen izolatların PFGE ile moleküler yakınlığına bakılması ve bu risk noktalarının potansiyel durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Listeria monocytogenes* 'in Taksonomisi

Mikroorganizmaya ilk olarak 1891 yılında Alman hastalardan alınan örneklerde rastlanmıştır. Daha sonra 1911'de İsveç'te tavşan ciğerinden izole edilmiş ve hastalığın 1925 yılında Almanya'da koyunlarda görüldüğü bildirilmiştir. Hastalık 1917'de Pirie tarafından Güney Afrika steplerindeki kemiricilerde Tiger River olarak isimlendirilmiştir. 1926 yılında Murray ve çalışma arkadaşları Cambridge' deki laboratuvar tavşanlarında septik bir hastalık tarif etmişler ve hastalık monositozla karakterize olduğu için etken olan bakteriye *Bacterium monocytogenes* adını vermişlerdir. Daha sonra bir cerrah olan Lord Lister'in anısına *Listerella hepatolytica* ve *Listerella hominis* gibi isimler verilen bakteri 1940 yılında Pirie tarafından *L. monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Mikroorganizma monositoz tetikleyici bir antijen olarak tanımlanmasına rağmen, insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda monositoz belirleyici bir unsur değildir. Monositoz, kanda normalde alyuvarların % 2-6'sını oluşturan bir hücre türü olan monositlerin sayıca artmasıdır. Pek çok hastalıkta görülen önemli bir laboratuvar bulgusudur (Farber, 1991; Beumer ve Hazeleger, 2003).

İnsanlarda listeriozis vakası ilk kez 1929' da bildirilmiş, Amerika ve Avrupa'daki salgınlara kadar bu hastalığın gıda kaynaklı olabileceği kanıtlanmamıştı. 1980'li yıllarda özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere pek çok ülkede bu bakterinin neden olduğu salgınlar görülmüş ve bu mikroorganizma gıdalar aracılığı taşınması ile dikkat çekmeye başlamıştır. Özellikle 1985' e kadar listeriozisin, çoğunlukla inek, koyun gibi hayvanlarla ilişkili olduğu düşünülmüş ve sadece bir meslek hastalığı (veteriner cerrah) olarak görülmüştür. Bu nedenle gıda gibi klinik olmayan materyallerden *L. monocytogenes*' in izolasyonu için yöntem geliştirme çalışmaları büyük hız kazanmıştır.

Büyük listeriozis salgınlarında enfeksiyon kaynağı yumuşak peynir (Meksika tipi), çiğ lahana, ciğer ezmesi ve jöleli domuz dili olarak tespit edilmiştir (Beumer ve ark., 1996; White ve ark., 2002; Reissbrodt, 2004). Son olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde 2015 yılında dondurma ve peynir, 2016 yılında hazır salata, çiğ süt ve dondurulmuş sebze, 2017 yılında ise yumuşak çiğ süt peyniri üzerinden salgınlar çıktığı bildirilmiş, bununla

da sütte *Listeria* enfeksiyonlarının önemi güncellenmiştir (Center of Disease Control and Prevention, 2017)

Listeria türleri küçük, Gram pozitif, sporsuz formda, kapsülsüz basil görünümde bakterilerdir. Bazı türleri 37 °C’ de hareketsizdir, ancak 20 °C’den aşağı sıcaklıklarda hareketli davranırlar (Way ve ark., 2004). Bu türe ait bakteri DNA’ larında G+C oranı düşük olup % 36-42 arasında değişmektedir. Ayrıca *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Staphylococcus* türleri ile yakınlık göstermektedirler (Schmid ve ark., 2005). DNA-DNA hibridizasyon, MEE (Multi-Locus enzim elektroforez), rRNA(ribozomal RNA) gen restriksiyon ve 16S rRNA sekanslama metotları ile yapılan çalışmalarda önemli olarak 6 tür ve 2 alt türden *Listeria* türü tespit edilmiştir; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*. *L. monocytogenes* insan ve hayvanlarda patojendir. Esas olarak koyun ve sığır gibi hayvanlarda enfeksiyon oluşturan tür olarak *L. ivanovii* görülmektedir. Son zamanlarda immun yetersizliğine bağlı olarak insanlarda *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* türlerinin de enfeksiyon oluşturduğu görülmüştür (Rocourt ve ark., 2000; Schmid ve ark., 2005). Bunun yanında enfeksiyöz olmadığı bilinen *L. innocua*’ nın da 62 yaşında bir yaşlıda ölümcül enfeksiyon şekillendirdiği de bildirilmiştir (Perrin ve ark., 2003)

Belirtilen 8 türden başka son araştırmalar ile doğal çevreden izole edilen *Listeria marthii* (Graves ve ark., 2010), maruldan izole edilen *Listeria rocourtiae* (Leclercq ve ark., 2010), bir akuatik bitkiden izole edilip tanımlanan *Listeria weihenstephanensis* (Halter ve ark, 2013), peynirden izole *Listeria fleischmannii* (Bertsch ve ark., 2013) ve tarımsal alanlardan izole edilip tanımlanan *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia* ve *Listeria grandensis* (den Bakker ve ark., 2014) ile yeni *Listeria* türleri eklenmiştir.

2.2. Morfolojik, Biyokimyasal ve Antijenik Özellikleri

Düzenli, $0,4-0,5 \times 1-2$ µm uzunluğunda ve kısa çubuk olan *Listeria* türleri genel olarak tek ya da kısa zincir halindedirler. Eski kolonilerde filamentlerin uzunlukları 6 µm’den uzun gelişebilir. Gram pozitif boyanırlar, özellikle eski kültürlerde bu boyanma özelliklerini kaybederler. Asit oluşturmazlar, spor ve kapsülleri yoktur. Tüm türlerde sıcaklıkların 30 °C’den düşük sıcaklıklarda kültür edilen bakterileri kamçıllı flagellaları ile hareketli hale geçerler. Aerobik ve fakültatif anaerobik özellikte olup, 24-48 saat

inkübasyonu sonrasında kolonileri 0,5–1,5 mm çapında yuvarlak, yarı saydam yumuşak yüzeyli düşük konvekste ve pigmentsiz bir görünüş kazanırlar. Besi yerinde agar yüzeyinden alındığında yapışkan olabilirler ve genellikle preparat hazırlanması sırasında kolay olarak emülsifiye edilebilirler. Eski olan 3-7 günlük kolonileri daha büyüktür ve 3-5 mm çapa sahiptirler. Bazen de daha opak kolonilerinin merkezi çökük bir görüntü verebilir. % 0,25 agar, % 8 jelatin ve % 1,0 glikoz ile hazırlanmış yarı katı besi yerinde 37 °C’de 24 saatte düzensiz ve bulanık üremeler gösterirler ve üremelerini tüm besi yerinde yavaş bir şekilde ilerletirler. Üreme şekli şemsiye şekli gibidir ve 3-5 mm yüzeyden aşağı kısma kadar oluşum gösterir. Gelişim sıcaklık aralıkları 0 °C’nin altından 45 °C’ye kadar geniş aralıktadır ve optimal gelişim değerleri 30–37 °C’dir. 60 °C’de 30 dakika sonrasında yaşayamazlar. Gelişim pH aralıkları 6-9 arasındadır. % 10 oranında NaCl eklenmiş besi yerinde üreyebilirler. Biyokimyasal olarak katalaz pozitif, oksidaz ise negatiftir. Sitokrom üretirler. Fermentatif olarak glikozdan son ürün laktik ve asetik asiti üretirler. Glikoz yanında salisinden de asit oluştururlar, fakat gaz şekillendirmezler. MR-VP (Methyl-red Voges-Proskauer) pozitifdir. Organik gelişim ve üreme faktörlerine ihtiyaç duyarlar ve indol üretmezler. Bunun yanında eskülin ve sodyum hippuratı hidroliz ederler, fakat üreyi hidroliz edemezler. *Listeria* türlerinin tümünde hemolitik aktivite yoktur. Türlerden *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* türleri hemolitik aktivite gösterirler. Bu aktivite at kanı veya koyun kanı kullanılmış kanlı katı besi yerinde görülebilir. En geniş hemolitik alan *L. ivanovii*’ de görülür. Ancak *L. monocytogenes*’ in hemoliz alanı dardır. *L. seeligeri* ise de hemolitik bölge daha dar bir alan oluşturur (Mclauchlin, 2001). *Listeria* türlerine ait biyokimyasal özellikler Tablo 8’ de gösterilmiştir.

Tablo 8. Önemli *Listeria* türlerinin ayırımında biyokimyasal testler (*Listeria Monocytogenes*: Methods and Protocols' dan; 2016)

<i>Listeria</i> türü	Fosfolipaz C	Hemoliz	Asit ürettiği sekerler			CAMP testi	
			Mannitol	Ramnoz	Ksiloz	S. <i>aureus</i>	R. <i>equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	D	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	++	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	-	(+)	-	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	D	+	+	-
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	-	-

++ : kuvvetli pozitif; +: pozitif; (+): zayıf pozitif; D : değişken; - : negatif CAMP: Christie, Atkins, Munch-Peterson

Listeria türleri çok sayıda farklı antijenik yapı içerirler. Flagellalar ile beraber olan (H faktör) yanında, temel olarak somatik antijenler (O faktör) bulunur. *Listeria* cinsine ait türlerin serotiplendirilmesi tavşan anti serumu kullanılarak yapılmıştır. Serotiplendirmelerde başka türler ile de kros reaksiyon durumları olmuştur. Bir çalışmada bu cinse ait türlere benzer hücre duvarı yapısına sahip olan *Bacillus* türleri de bildirilmiştir (Seeliger, 1993).

Listeria türü içinde 16 adet serovar tanımlanmıştır (Jersek ve ark., 1999). Gıda üretim tesislerinden en yaygın izole edilen serotipler 1/2a' yı olurken, bunu 1/2b, 4c ve 1/2c serotipleri izlemiştir. Serotiplendirmede kullanılan lam aglütinasyon metodu, tekli ve çoklu anti serumlar ile yapılarak bakterinin somatik O ve flagellalarının H antijenlerini tanımlar. Klinik olgular yanında kontamine gıdalardan elde edilen izolatların % 95,2' sinde 1/2a, 1/2b, 4b ve 1/2c serotipleri tespit edilmiştir (Doumith ve ark., 2004).

Antijenler alt tipler arasında *L. monocytogenes* suşları arasında ayırım yapılmasına imkan vermeyen ortak yapılar gösterir. Bu açıkça farklı serotipler içine sınıflanabilen tek bir atadan çeşitlenen antijen vasıtası ile çeşitlenen suş ihtimalini vurgulamıştır. İzolatları serotiplendirme temelinde sınıflandırırken bu dikkate alınmalıdır. Özellikle hastalıkla daha az sıklıkta ilişkili olan serotip izolatları, patojen bir atadan kaynaklanabildikleri için daha az patojenitede düşük riskli olarak düşünülmemelidir (Revazishvili ve ark., 2004). Örnek olarak hem *L. monocytogenes*, hem de *L. seeligeri* 1/2a, 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4c ve 6b serotiplerine sahiptir. Bu da

serotiplendirme metodunun tür ayırımında doğrudan identifiye edemediğini de göstermektedir (Liu, 2006). *Listeria* cinsine ait türlerin serotipleri Tablo 9’ da verilmiştir.

Tablo 9. *Listeria* cinsine ait türlerin serotipleri (Khelef ve ark.'dan, 2006)

<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
1/2a, 1/2b ve 1/2c	5	1/2a, 1/2b ve 1/2c	-	1/2b	-
3a, 3b, ve 3c	-	-	-	-	-
4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, ve 4e	-	4b ve 4d	4ab	4c	-
6b	-	6b	6a ve 6b	6a ve 6b	-
7	-	Belirlenmemiş serotip	Belirlenmemiş serotip	Belirlenmemiş serotip	Spesifik

Listeria türleri bakterilerde hemolitik reaksiyonun varlığını araştırmada kullanılır. CAMP reaksiyonu tür ayırımında önemli kriterlerden biridir. Testte β -hemolitik özelliğe sahip iki bakteri kullanılır. Bunlar *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi*'dir. Kullanılan bu iki bakteri Listeriaların hemoliz ürünlerini artırarak sonucu sağlar. CAMP reaksiyonunu test etmek için kullanılan kanlı katı besi yerine bu iki bakteri birbirine paralel olarak iki çizgi şeklinde ekilir. Ayırımı yapılacak *Listeria* türleri de bu çizgi ekimlerin her birine dik bir şekilde çizgi ekimi yapılır. *Listeria* ve iki bakterinin çizgilerinin birbirine değmemesine dikkat edilir. Bu şekilde ekimi yapılan kanlı katı besi yeri 35 °C de 24-48 saat inkübe edilir. Süre sonunda hemolitik bölgelerin varlığına bakılır. Bu testte *L. monocytogenes* yanında *L. seeligeri*, *S. aureus* çizgisi tarafında zayıf hemoliz oluşturur. Ancak *R. equi* çizgisinde hemoliz oluşturmaz. *L. ivanovii*, *R. equi* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur (Groves ve Welshimer, 1977). *L. ivanovii*' de ise SmcL fosfolipaz etkisiyle CAMP testinde çift zonlu hemoliz oluşumu gözlenir (Gonzalez-Zorn ve ark., 1999).

2.3. Gelişimini Etkileyen Faktörler

2.3.1. pH

Listeriaların canlılığında pH önemli fonksiyonlara sahiptir. Listeriaların gelişimi için en iyi pH değeri tüm türlerde nötral ile hafif alkali olan 6-9 aralığıdır. Bu tür bakterilerin hareketlilik testlerinin düşük konsantrasyonda serbest karbonhidrat içermeyen besi yerlerinde yapılması, yapıldığında ise ekim sonrası pH'ın hızla 5,5'in altına düşmesi nedeniyle mikroorganizmaların motilite sonuçlarını negatif gösterebileceği bildirilmiştir (Mclauchlin, 2001).

Bazı kültürlerde gelişim pH değeri 9,6'da olabilmektedir. Genellikle Listeriaların pH 5,5'in altında öldükleri, ancak çevresel örnek çalışmalarında pH 4,5 ortamında canlılıklarını korudukları görülmüştür. Fermentasyon reaksiyonları sonrası üretilmiş asitlerle pH'sı düşmüş besi yerlerinden yapılan pasajların bazen başarılı olmadığı bildirilmiştir. Listerialar ortam pH'sı düştükçe ortama adaptasyon için iki glutamat dekarboksilaz GadA (Glutamat dekarboksilaz A) ve GadB (Glutamat dekarboksilaz B), bir de hidrojen iyonu tüketimine bağlı olarak sitoplazmik pH'ı regüle eden zıt moleküller ile hücre duvarında değiş-tokuş işlemlerini yapan diğer bir glutamat dekarboksilazı GadC (Glutamat dekarboksilaz C) moleküllerini kullanırlar (Cotter ve ark., 2001).

Tüm Listeria türü bakteriler % 10 NaCl ilaveli zengin çeşitli besi yerlerinde gelişebilirler. Bazı türlerinin % 20 NaCl'yi bile tolere edebildiği, pH 6,0'da ve % 16 NaCl'li ortamlarda bir yıldan fazla canlılıklarını korudukları bildirilmiştir (Mclauchlin, 2001).

2.3.2. Sodyum Klorür

Sodyum klorür ya da tuz hem biyolojik olarak hem de gıda içeriğinde önemli bir ögedir. Yüksek tuz konsantrasyonları gıdaların su aktivitesini düşürerek ve *L. monocytogenes'* in membranlarında elektrokimyasal potansiyeli etkileyerek gelişimlerini azaltır. *L. monocytogenes'* in mikrobiyal canlılık, gelişim ve ölümleri üzerine su aktivitesinin etkisi NaCl ile etkileşerek olur (Petran ve Zottola, 1989).

L. monocytogenes çok yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilir. Bir çalışmada % 23,8 NaCl içeren ve pH değeri 4,9 olan ticari bir peynir ürününde bu patojenin 4 °C sıcaklıkta 259 gün canlı kalabildiği tespit edilmiştir (Larson ve ark., 1999).

Sonrasında peynir üreticisi ve somon balığı tesisleri gibi gıda üretim yerlerinde konsantrasyonun solüsyonlarının kullanılmasının *L. monocytogenes*' in elimine edilmesinde güvenilir olmadığı ve riski devam ettirdiği görülmüştür (Kent ve Sorrells, 1990)

Listeriaların canlılıkları % 12'den yüksek NaCl ortamlarında, NaCl konsantrasyonlarının artırılması veya inkübasyon sıcaklıklarının artırılması ile azalmaktadır. Yapılan bir araştırmada konsantrasyon olarak % 16 NaCl içeren 4 °C'den düşük ortamlarda Listeriaların en az 33 gün bakteriyostatik etkide kaldığı izlenmiştir. Oran % 26'ya çıktığında ise bakteri sayısının 0 °C'lik ortamda 2 log, 4 °C' lik ortamda ise 3,5 log azaldığı görülmüştür (Hudson, 1992). Başka bir araştırmada ise *L. monocytogenes* % 14 NaCl varlığında 10 °C ve 25 °C' lerde 36 gün inkübe edilmiş, sayılarındaki düşüş sırası ile 2 log ve 6 log şeklinde ölçülmüştür (Sorrells, 1990).

Listeriaların % 6'dan fazla olarak NaCl içeren agar besi yerlerinde düzensiz, sınırlı ve sert yüzeyle koloni oluşturdukları bildirilmiştir (Isom ve ark., 1995). Morfolojilerini kısa çubuk halinden daha güçlü ve hidrofil olan filamentöz, deforme bir şekle değiştirirler (Bereksi ve ark., 2002; Zaika ve Fanelli, 2003). En az morfolojik değişikliğin buzdolabı sıcaklığında inkübe edilen bakterilerde görüldüğü bildirilmiştir (Brzin,1973). Bir başka çalışmada $\geq 1,75$ mM H₂O₂, $\geq 0,3$ mM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) NaOH'li pH 9'dan yüksek sitrik asitte, yine pH değerleri 5,0 ve 6,0' ya ayarlanmış ortamlarda ilginç olarak uzamış hücreler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar Listeriaların çok farklı olumsuz ortam şartlarına adapte olması hakkında bilgiler vermektedir (Isom ve ark., 1995; Zaika ve Fanelli, 2003). Listerialarda morfolojideki değişiklikler, ortam tuz seviyesine cevapta adhezyon özelliklerini de yükseltir (Bereksi ve ark., 2002).

Hücrelerin canlılığı için hücre dışı NaCl konsantrasyonuna bakmaksızın düşük sitoplazmik Na⁺ düzeyine ek olarak elektrokimyasal bir membran geçişi de gereklidir. Potasyum iyonunun alımı (kdp), Na⁺ akışı (gbu - Glisin betain uptake- ve ykpA- ATP bağlayıcı bir protein-) ve çoklu ilaç akışı (mdrL) regülasyonlarının yüksek tuz konsantrasyonları altında sitoplazmadan Na⁺ atma görevi yaptığı tahmin edilmektedir (Brøndsted ve ark., 2003; Gardan ve ark., 2003).

Bir araştırmada yüksek tuzlu ortama maruz bırakılan *L. monocytogenes* bakterilerinin yapılarında C15:0 ve C17:0 yağ asiti seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Chihib ve ark., 2003). Burada hücre membranlarının yağ asiti profilindeki değişikliklerin

hücre sitoplazmasındaki glisin betain gibi ozmoprotektantların artması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. pH değeri 4,0 olan sığır eti sosunda NaCl' nin % 6 ve üzeri oranlarda uygulandığı proseslerde *L. monocytogenes*'e karşı başarılı olduğu bildirilmiştir (Juneja ve Eblen, 1999). Sıcaklığın koruyucu fonksiyonu 60 °C' nin altında kısmen görülmektedir. Bahsedilen soslarda en iyi D₅₅ (mikroorganizmaların %90'ını öldürmek için gereken süre) değeri % 1,5-4,5 NaCl içeren denemelerde gözlenmiştir. Ayrıca yüksek tuz konsantrasyonun *Listeria* ribozomlarında denatürasyon sıcaklığını artırdığı, bunun da bakteride sıcaklık toleransını yükselttiği de bildirilmiştir (Stephens ve Jones, 1993).

2.3.3. Su Aktivitesi

Bakteri hücresinde turgor basıncı su aktivitesi ile doğru orantılıdır. Bakteriyel turgor basıncı hücre genişlemesinde, bu sayede hücre duvarının büyümesinde ve hücre bölünmesinde pozitif yönde etki sağlar. Basıncın düşmesi ise bakteriyel gelişimi inhibe eder (Amezaga ve ark., 1995). En taze yiyeceklerde su aktivitesi 0,98'den büyüktür (USDA, 2017). Besinlerin kurutulması veya besinlere tuz, şeker vs. gibi ilaveler yapılması su aktivitesini düşürmede klasik yöntemlerdendir ve gıdalarda raf ömrünü uzatır. Böyle durumlarda *L. monocytogenes* hayatta kalabilmektedir veya nispeten düşük su aktivitesi olan gıdalarda bile gelişebilir (Nolan ve ark., 1992). *L. monocytogenes*' in düşük su aktivitesine toleransı, gıdaların minimal riskle işlenmesinde, ürünlerin kurutma veya salamura uygulanmasını gerekli kılmıştır (Ryser ve Marth, 2007e).

Çoğu bakteriler gibi *L. monocytogenes* optimal 0,97'den yukarı değerde olan su aktivitesine sahiptir (Petran ve Zottola, 1989). Ancak gıdadan bulaşıcı olabilen diğer yaygın enfeksiyöz patojenlere kıyasla bu bakteri, eşsiz kabiliyete sahip olarak su aktivitesi değeri 0,90 altında bile bölünme yapabilmektedir.

L. monocytogenes' de su aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda $\geq 6,5$ log kob / mL konsantrasyonda bakterilerin gelişimi gliserin, sukroz, NaCl ve propilen glykol varlığında denenmiş ve su aktiviteleri sırası ile 0,90, 0,92, 0,92 ve 0,97 tespit edilmiştir (Nolan ve ark., 1992; Miller ve ark., 2009).

Listeriaların canlılığı buzdolabı gibi soğuk ortamlarda uzun sürebilmektedir (USDA, 2017). Yapılan bir araştırmada su aktivitesi 0,79-0,86 arasında fermente salamaların 4°C'de 84 gün saklanabildiği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 1990). Yapılan başka bir araştırmada ise ticari salamura peynirlere 2×10^4 - 2×10^5 kob/mL arasında *L. monocytogenes* inokule edilmiş, 259 gün sonrasında bile tespit edilebilir patojen

bakterinin olduğu açıklanmıştır. Düşük su aktivitesinin (0,90) Listerialara bakteriyostatik etki yapabildiği, bu yüzden salamura peynir gibi ürünlerde çapraz kontaminasyona bir potansiyel kaynak oluşturduğu da ifade edilmiştir (Larson ve ark., 1999).

2.3.4. Ozmotolerans Faktörler

L. monocytogenes' in gelişmesinde su aktivitesi ve sıcaklığın kombine etkisi büyüktür. Gelişimlerinde en büyük inhibe edici etki hem sıcaklık hem de su aktivitesinin minimum olduğu zamanlarda görülmüştür. *L. monocytogenes*' in canlılığı düşük nem seviyelerinde ortamda baskın olarak çözünen maddelere bağlı olduğu bildirilmiştir (Miller, 1992; Nolan ve ark., 1992). İşlenmiş etlerde ise *L. monocytogenes*' in gelişme yeteneğinin et yapısında yüksek seviyede glisin betain, karnitin ve glisin-prolin içeren peptid bulunması ile ilişkili olduğu da tespit edilmiştir (Amezaga ve ark., 1995; Smith, 1996). Bahsedilen ozmotik koruyucular hücre içi turgor basıncını düzenlemede temel teşkil etmektedir. Glisin betain ciddi düzeyde ozmotik ve soğuk stresine maruz kalmasında kullanılır (Amezaga ve ark., 1995).

Glisin betain taşıyıcıları -BetL (Glisin betain transport Listeria) ve Gbu- ve karnitin alınımlı-taşıyıcı pompası ozmoprotektanları yüksek çevresel ozmolaritede sitoplazma içine çalır (Angelidis ve Smith, 2003).

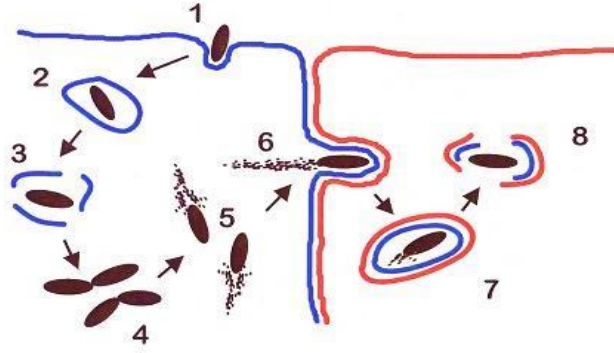
BetL, hücre içinde belli bir protein seviyesini (2 nmol/dak/mg) geçtikten sonra ozmotik yükselişle beraber glisin betain biriktirir. Bunun yanında Gbu taşıyıcısı % 6'dan yukarıda olan tuzlulukta Listeriaların uzun süreli ozmotoleranslarında ve canlı kalabilmelerinde şarttır. Bu taşıyıcı molekül *L. monocytogenes*' in birkaç dakika sonrasında aktif olur. Yapılan bir araştırmada % 4 NaCl' de 4 saat maruz bırakılması sonrası *L. monocytogenes*' in biriken glisin betain miktarı 8 nmol/dak/mg olmuştur. Dimetil glisin, trigonellin, trietilglisin ve γ -butirobetain gibi bileşikler glisin betain ve/veya karnitin alınımında glisin betain analogları ve potentlerinin inhibitörleridir (Mendum ve Smith, 2002).

L. monocytogenes'in ozmotik tetikleyicisi Sigma B (σ B) adı verilen bir faktörün ekspresyonu ile indüklenir (Becker ve ark., 1998). Yüksek sıcaklığa veya asite adapte olmuş Listeria bakterilerinde ozmotik olarak adapte edilen bakterilerin asit, sıcaklık ve donma gibi stres faktörlerine direnci σ B regulonunu indükte etmesi ile artırılmaktadır (Lou ve Yousef, 1997; Juneja ve Eblen, 1999; Ferreira ve ark., 2001).

L. monocytogenes' de çapraz koruma seviyesinin yeterli düzeyde hafif önleme faktörleri ile kombine edilerek minimize edildiği izlenmiştir. Bir süt ürünü olan parmesan peynirlerde yapılan bir çalışmada, birkaç stres faktörünün kombine olarak (düşük pH, yaklaşık 45 dakika, 51 °C'de pişirilme ve % 30,1-31,4 arası düşük nem) *L. monocytogenes*' in hızla azalmasından sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Dominguez ve ark., 1987).

2.4. Virulens

Listeria cinsi bakteriler Gram pozitif bakteriler olan *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* ve *Clostridium* cinsi bakterilere filogenetik olarak yakın yapıdadır (Collins ve ark., 1991; Sallen ve ark., 1996). Bunlardan *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii*' nin enfektif olduğu bilinmektedir. Fakat Samsun'da yapılmış bir çalışmada apatojen olarak bilinen *L. innocua*' nın ilk enfeksiyon olarak yeni doğmuş bir bebekte ventriküler şant enfeksiyonu oluşturduğu ilan edilmiştir (Karlı ve ark.; 2014) Listeriaların yaşam ortamı olarak çürüyen bitki artıklarından zengin olan toprak sayılabilir. Bu yüzden toprakla ilişkili olan canlı hayvanlar, sebze ve meyve gibi gıdalar bu bakterinin kontaminasyon yollarını oluşturmaktadır (Farber ve Peterkin, 1991; Vázquez-Boland ve ark., 2001). Enfektif yeteneğe sahip Listerialar fakültatif hücre içi parazittir. Epitelyal, endotelyal hepatosit gibi hücreler yanında makrofajlar içinde de çoğalabilirler. Patojen Listeria bakterileri tüm hücre tiplerinde hücre içinde yaşam döngüsü 3 aşamada vardır; 1- Konakçı hücreye giriş, 2- Fagositif vakuolde canlılık, 3- Fagozomal membranın bozulması, 4- Sitosolde replikasyon, 5-Aktin esaslı motilite, 6- Hücreden hücreye yayılma, 7- İkincil fagozomlarda canlılık, 8-İkincil fagozomdan kaçış ve siklusun yeniden başlangıcı (Şekil 1).

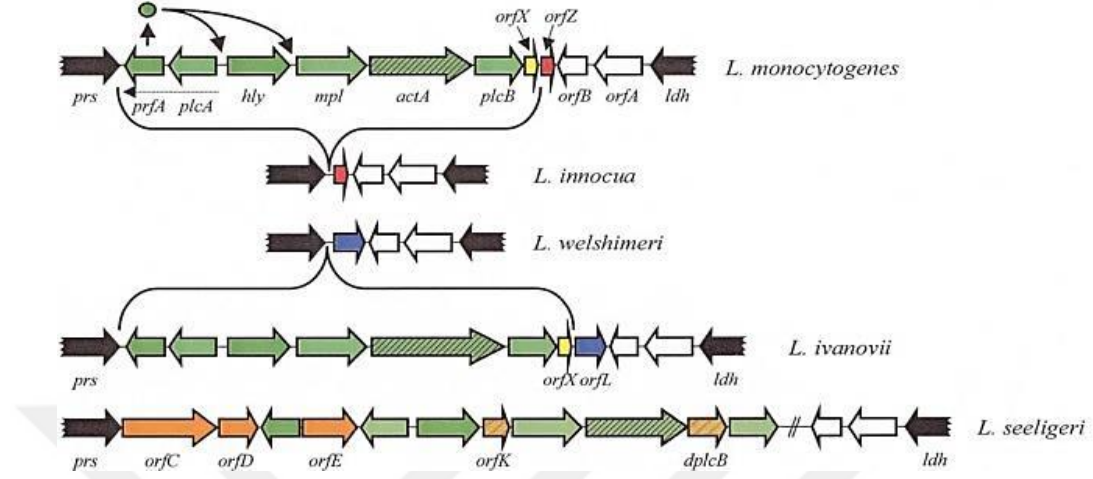


Şekil 1. Patojen *Listeria* bakterilerinin tüm hücre tiplerinde hücre içi yaşam döngüsü . 1- Konakçı hücreye giriş, 2- Fagositif vakuolde canlılık, 3-Fagozomal membranın bozulması, 4- Sitosolde replikasyon, 5-Aktin esaslı motilite, 6- hücreden hücreye yayılma, 7- İkincil fagozomlarda canlılık, 8-ikincil fagozomdan kaçış ve siklusun yeniden başlangıcı (Tilney ve Portnoy'dan, 1989)

Hücre içi bu yaşam siklusunda anahtar aşamalar için temelde 6 virulens faktör karakterize ve identifiye edilmiştir. Bunlara kodlayan genler 9000 bazlık kromozomal ada ile fizyolojik olarak bağlantılıdır (Kreft ve ark., 1999; Vázquez-Boland ve ark., 2001).

Listeria türlerinde hemolizin (*hly*) geninin kromozomal gen (LIPI-1) yapısında, fosforibozil-pirofosfat sentetaz ve laktat dehidrojenaz enzimlerini kodlayan *prs* ve *ldh* genleri mevcuttur. Tüm *Listeria* türlerinde bulunan *plcB-ldh* intergenik gen bölgelerinde 2 ORF -Open reading frame- (*orfA* ve *orfB*) *prs* ve *orfB* bölgeleri arasında LIPI-1' in insersiyon noktası olduğuna işaret etmiştir. *orfA* ürünü *Borrelia burgdorferi* türü bakterinin transkripsiyon sonlandırma olan Rho faktörüne % 47 benzerlik gösterirken, *orfB* ürünü 110 aminoasitli olup, *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecalis* bakterilerinin gen sekanslarında ikiden fazla homolog özellik gösterir. *L. monocytogenes*' de *plcB* (Phosphatidylcholine-phospholipase C) ve *orfB* arasındaki gen bölgelerinde, *L. innocua*' da LIPI-1'in eksizyon noktasını sınırlandıran iki küçük ORF (*orfX* ve *orfZ*) vardır ve ilgili küçük proteinleri kodlarlar. *L. ivanovii*' de ise *plcB-orfB* intergenik bölgesinde *orfX* ve *orfL* olarak 2 adet mevcuttur. *L. monocytogenes*' de de bu ORF'ler patojen olmayan *L. welschimeri* virulens geninde bir silme noktasını sınırlar. *orfX* *L. monocytogenes*' de *orfX*' in bir homologunu kodlarken, *orfL* *L. monocytogenes* *orfZ* ürünü ile ilişkisi olmayan bir polipeptidi kodlar. *orfZ* ve *orfL* bakteriyofaj proteinleri ile önemli benzerlik gösteren polipeptitleri kodlarlar (Vazquez-Boland ve ark., 1992). Bu ORF'lerden başka *L. seeligeri* virulens geninde 3 adet ORF mevcuttur: *orfC*, *orfD* ve *orfE*. Bunlar *orfK* ve *dplcB*'den üretilir ve bunlar LIPI-1

ürünlerine benzerlik gösteren polipeptitleri kodlarlar (Vazquez-Boland ve ark., 1992; Gouin ve ark., 1994; Kreft ve ark., 1999; Chakraborty ve ark., 2000; Vázquez-Boland ve ark., 2001). Açıklanan bu gen ilişkileri Şekil 2’ de gösterilmiştir.



Şekil 2. Listeria türlerinde LIPI-1 ile ilişkili transkripsiyonel gen bölgeleri (Vazques-Boland’dan, 2001).

hly (*L. monocytogenes*’ deki diğer adı ile Listeriolizin O) fagositik vakuolün yıkılmasını için gereklidir. Sitoplazma içinde bakterinin serbest kalmasını sağlar ve hücre içi yayılması için gereklidir. Bu yüzden Listeriaların varlığında temel bir virulens faktördür (Cossart ve ark., 1989; Bielecki ve ark., 1990; Kreft ve ark., 1999; Vázquez-Boland ve ark., 2001). *actA* bir yüzey proteini olan ActA’ yı (Aktin indükleyenprotein) kodlar. Bu protein aktin temelli hareketi ve hücreden hücreye yayılmayı sağlayan bir faktördür. *L. monocytogenes* patojenitesi için ayrıca *hly* gibi şarttır. ActA aktin monomerlerini ya doğrudan G-aktini ile etkileşerek ya da aktin iskeleti ile ilişkili VASP ve Mena ActA ligand proteinlerini bağlayan G-aktin bağlayıcı protein olan profilin aracılığı ile yapar (Chakraborty ve ark., 1995; Niebuhr ve ark., 1997). Aktin ilişkili bakteriyel motilite ActA vasıtası ile Arp2/3 kompleks nükleasyon aktivitesinin aktivasyonuna kendiliğinden bağlı olarak gerçekleşir (Welch, 1998; Rohatgi ve ark., 1999). Bu Listeria proteini, aktin hücre iskeletinin dinamik olarak yeniden biçimlenmesinde yer alan sinyal yollarının aşağı akış efektörleri olarak bilinen WASP/Scar ailesinden Arp2/3 kompleks-aktive eden proteinlerin doğal rolünü taklit eden fonksiyonel bölgelere sahiptir. Deneysel çalışmalar konakçı hücre tarafından ActA’nın internalizasyonda ayrıca görev yaptığı da bildirilmiştir (Alvarez-Domínguez ve ark., 1997).

plcB çinko ile kompleks, geniş çapta substrata sahip bir fosfolipaz C'dir ve Clostridium fosfolipaz C'lerin homologudur (Vazquez-Boland ve ark., 1992). Enzim inaktif bir propeptit olarak salgılanır ve hücre dışında Mpl (Metalloproteinase listeria) proteaz ile işlenir. PlcB gibi Mpl de bir çinko metalloenzimidir ve hücre dışındaki Listeria'nın fagositozu sonrası oluşan ilk vakuolün parçalanmasında hly ile işbirliği yapar. PlcB'nin asıl görevi hücreden hücreye yayılma sonrası oluşan ikinci fagozomlarda ikili membranın bozulmasına aracılık etmesidir (Vazquez-Boland ve ark., 1992; Marquis ve ark., 1995; Smith ve ark., 1995). Böylece *mpl-actA-plcB* operonlarının ürettiği üç protein Listeria'nın bir hücreden diğer hücreye geçmesinde temel teşkil etmektedir.

Listeria'nın bu özelliği hücre dışı ortamdan ve bağışıklık sisteminin humoral yanıtından kaçmasını sağlar (Portnoy, 1992).

Bu özelliği yüzünden Listeria enfeksiyonu sadece tipik granülom oluşturmuş enfeksiyöz odaklar çevresinde birikmiş sitotoksik T hücreleri ve aktif makrofajların verdiği yeterli düzeydeki hücresel immun yanıtı ile çözülebilmektedir (Portnoy, 1992).

plcA-prfA bisistronunda birinci gen olan *plcA* (Phosphatidylinositol-phospholipase C), bir fosfotidilinositol-spesifik fosfolipaz C enzimini kodlar ve bu enzim ilk fagozomun bozulmasında hem *hly* hem de *plcB* ile uyum gösterir (Smith ve ark., 1995). İkinci gen ise PrfA (Pleiotropic virulence regulator) proteinini kodlar. PrfA transkripsiyonel aktivasyon için gereklidir ve bu yüzden patojenite için *hly* ve ActA gibi kesinlikle gereklidir. Ayrıca Listeria türü bakterilerde sadece virulens regülatörü olarak tanımlanmıştır ve internalin üyelerini içeren kromozomlar dışında virulens ilişkili bölge oluşturan bir regülonda görev üstlenir (Goebel ve ark., 2000).

Birkaç çevresel ve gelişim fazının, virulens regülon ekspresyonunu modüle eden sinyallere bağlı olduğu bildirilmiştir; konakçı hücre ile temas (Renzoni ve ark., 1999), ökaryotik sitoplazma ortamı (Bubert ve ark., 1999; Renzoni ve ark., 1999), stres şartları (Sokolovic ve ark., 1990), yüksek sıcaklık (Leimeister-Wächter ve ark., 1992) ve aktif kömür ile hücre dışı gelişim ortamı bileşenlerinin tutulması (Ripio ve ark., 1996).

2.5. İnternalinler

Listeria türlerinde virulensde önemli bir faktör de internalinlerdir. Hücre duvarında yüzey proteini olan internalinler yüzeyde ϵ -kaderin reseptörü ile etkileşerek fagositozu uyarırlar. İdentifiye edilen ilk internalin *inlAB*'dir. Sonrasında yapılan çalışmalar ile ilgili gen bölgeleri taranarak *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*' de diğer

internalinler bulunmuştur. Bu iki tür dışında *L. innocua*' da da varlıkları gösterilmiştir (Gaillard ve ark., 1991). Tüm bu gen bölgeleri değişen sayıda lösinden zengin tekrarlar (LRR) içeren karakteristik proteinleri kodlarlar.

LRR üniteleri 22 aminoasitli bir oligopeptitten oluşur ve yapılarında lösün ve izolösün pozisyonları 3, 6, 9, 11, 16 ve 22 şeklindedir (Gaillard ve ark., 1991; Marino ve ark., 2000). Bu bölge ilk olarak *Erwinia chrysanthemi* bakterisinin (Yoder, ve ark., 1993; Heffron ve ark., 1998) pektat liyazında identifiye edilmiş ve yapısı paralel sarmal şeklinde gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda çok sayıda bulgu ile LRR protein süperfamilyası olarak adlandırılan ve çok sayıda proteini içinde barındıran bir familya tanımlanmıştır (Kobe ve Deisenhofer,1994; Kajava,1998). LRR bölgeleri en çok ökaryotik hücrelerde sinyal transdüksiyon yolakları, hücre dışı matriks proteoglikanları ve bitki hastalıklarının direnç ürünleri gibi fonksiyonlarda görev alan proteinlerin kodlandığı bölgelerdir (Kobe ve Deisenhofer,1994; Jones ve Jones,1997; Kajava, 1998). Prokaryotlarda ise fazla bulunmazlar. Genellikle *Yersinia* cinsi bakterilerde YopM (*Yersinia* outer membrane protein), *Salmonella typhimurium*' da SspH1 (*Salmonella* secreted protein H1) ve SspH2 (*Salmonella* secreted protein H2), *Bordetella pertussis* bakterisinde filamentöz hemaglutinin ve *Shigella flexneri* bakterisinde IpaH (İnvasion plasmid antigen H geni) gibi virulens ilişkili proteinlerde bulunur (Makhov ve ark., 1994; Miao ve ark., 1999). Prokaryotik LRR motiflerinin çoğu *Listeria* ile ilişkili internalin ailesinin proteinleri için tanımlanmıştır. Dikkat çekici derecede homolog olan LRR proteinlerini kodlayan geniş ve çoklu bir gen ailesinin varlığı *Listeria* cinsi için karakteristik özelliiktir. İnternalinlerde iki alt familya mevcuttur. Bir grup büyük molekülü proteinlerden oluşur ve bunlar bakteri hücre duvarına C-terminallerinden bağlanarak şekillenmiştir. Molekül ağırlıkları 70-80 kilodalton aralığıdadır. Diğer grup ise InlA (İnternalin A) ve InlB (İnternalin B) polipeptitlerini kodlayan *inlAB* tarafından oluşturulur. Ayrıca *inlC2*, *inlD*, *inlE*, *inlF*, *inlG* ve *inlH* gibi 6 üyeyi de içine alır ve bunların tümü *L. monocytogenes*' de mevcuttur (Gaillard ve ark., 1991; Dramsi ve ark., 1997; Raffelsbauer ve ark., 1998). Bunlar daha küçük yapıdadırlar ve molekül ağırlıkları 25-30 kilodalton kadardır. Diğerlerinin tersine C-terminal hücre duvarı bağlantılarından yoksundurlar ve hücre dışı ortama serbest bırakılmışlardır. *L. monocytogenes*' den (Engelbrecht ve ark., 1996; Domann ve ark., 1997) *inlC* (internalin C) ve bu grubun artık üyeleri olan i-InlC, i-InlD, i-InlE, i-InlF ve i-InlG üyelerinin hepsi *L. ivanovii*' de identifiye edilmiştir (Engelbrecht ve ark., 1998a;

Engelbrecht ve ark., 1998b; Gonzalez-Zorn ve ark., 1999; Kreft ve ark., 1999). Yapılan son çalışmalar ile internalinlerin konakçı hücre invazyonunda önemli bir virulens faktör olduğu düşünülmektedir. *Listeria* patogenezindeki esas rolü hala tam aydınlatılamamıştır. Deneysel *in vitro* çalışmalar hücre duvarı ile ilişkili internalinlerin duyarlı ve normal olarak fagositik olmayan hücreler tarafından tetikleyici bir internalizasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (Gaillard ve ark., 1991; Braun ve ark., 1998; Lecuit ve ark., 1997).

In vitro çalışmalarda deneysel veriler ile farklı konak hücre özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir. *inlA* invazyonda sadece insan- ϵ -kaderini kullanırken, *inlB*'de çeşitli hayvan türlerinde ve geniş bir hücre skalasında (epitel hücreleri, fibroblastlar, hepatositler, endotelial hücreler) gözlenebilmiştir (Dramsı ve ark., 1995; Dramsı ve ark., 1997; Müller ve ark., 1998; Parida ve ark., 1998). Ancak *in vivo* çalışmalarda *InlA* ve *InlB*'nin patogenezdaki rolü henüz açıklanamamıştır. Farelerde *inlAB* mutantları iç organlarda sadece biraz kalıcı olurken, benzer olarak diğer çalışmada da meningoensefalit modellerinde beyin doku kolonizasyonunda bir bozulma göstermemiştir (Dramsı ve ark., 1995; Lingnau ve ark., 1995; Dramsı ve ark., 1997; Schlüter ve ark., 1998; Appelberg ve Leal, 2000; Gregory ve ark., 2001). Yine buna paralel olarak *inlAB* mutantların intestinal invazyon sonrası da dokuda bir bozulma yaşamadığı bildirilmiştir (Pron ve ark., 1998). Yapılan doku kültürü çalışmalarında *L. monocytogenes*'de diğer *InlA* ve *InlB* gibi yüzey ilişkili internalin genlerinin (*inlGHE*, *inlGC2DE* ve *inlF*) internalizasyonda rol almadığı gözlenmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmada bu gen bölgelerinin birinin (*inlGHE*) silinmesi ile fare organlarında hayatta kalma yeteneğinin orta düzeyde bozulduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile internalinlerin konakçı dokuda en az bir rol oynadığına işaret edilmiştir (Dramsı ve 1997; Raffelsbauer ve ark., 1998). Yine gen silme çalışmalarında, *inlC*'nin silinmesi ile *L. monocytogenes*'lerin (Engelbrecht ve ark., 1996), *i-inlE* ve *i-inlF* genlerinin silinmesi ile *L. ivanovii*'lerin farelerde LD₅₀ değerleri yükseltilebilmiştir (Engelbrecht ve ark., 1998b). Büyük ve küçük yapıli internalinler arasında muhtemelen patogenezi ile ilişki gösterdiği tahmin edilen ekspresyon nitelikleri arasında önemli fark olduğu bildirilmiştir. Genellikle genlerin transkripsiyonel virulens geni olan *PrfA* ile kontrol etmeden internalini kodlayabildiği de tespit edilmiştir (Raffelsbauer ve ark., 1998; Bubert ve ark., 1999). Bu da hücre dışı ve zengin besin içeriikli ortamlarda *inlAB*'nin önemli ekspresyon

faktörü olduğunu, fakat aynı tepkiyi fakir hücre içi ortamlarda vermediğini göstermiştir (Ripio ve ark., 1997; Bubert ve ark., 1999).

Küçük internalinlerin tamamının salgınlanması, kontrol eden gen olan *PrfA* ile regüle edilir (Engelbrecht ve ark., 1996; Domann ve ark., 1997; Engelbrecht ve ark., 1998a; Engelbrecht ve ark., 1998b; Gonzalez-Zorn ve ark., 1999). *PrfA* ilişkili regulon genleri sıvı besi yerlerinde ve yüksek demir konsantrasyonlu ortamlarda (hücre dışı şartlarda) azaltarak düzenleme yaparlar. Ancak bu tepki konakçı hücre ortamlarında tercihen şekillenmektedir (Conte ve ark., 1996; Ripio ve ark., 1996; Bubert ve ark., 1999; Moors ve ark., 1999; Renzoni ve ark., 1999). Bu bilgiler *hly* virulens gen bölgesindeki genlerin hücre içi yaşam döngüsünde ürünlerin önemli bir görev aldığını, küçük internalinlerin de yine hücre içi yaşam döngüsünde rol alabileceğini göstermiştir. Özellikle enfeksiyonun ileri aşamalarında ve bakterilerin hücre içi yayılım gösterdiği anlarda *L. monocytogenes*' in *inlC* geninin hücre içi ekspresyonu ispatlanmıştır (Engelbrecht ve ark., 1996; Bubert ve ark., 1999). Ancak *inlC* geninin silinmesi, hücre içi çoğalmasını veya hücreden hücreye yayılmasını etkilememiştir. Bu da küçük internalinlerin hücre invazyonlarında ilişkili olmadığını, fakat hücre içi hedeflerde ilişkili olduğunu göstermiştir (Engelbrecht ve ark., 1996; Domann ve ark., 1997; Greiffenberg ve ark., 1998).

2.6. Patogenez

L. monocytogenes bir bakteriyel patojen olarak yaşam döngüsü sırasında hem toprağa hem de ökaryotik konakçı hücreye iyi adapte olurlar. Gram pozitif bir saprofit olarak her yerde (toprak, bitki ve hayvan floraları) bulunabilir (Gray ve Killinger, 1966). Bakteri bu ortamlardan geçiş yapma yeteneğini konakçı hücrelerde canlı kalabilme ve replikasyon yeteneği ile sağlar (Freitag, 2006). *L. monocytogenes* sağlıklı bireylerde genellikle kendiliğinden iyileşen gastroenterit ile kendini gösterir. Bunların dışında sistemik enfeksiyon olarak menenjit, ensefalit ve hamile kadınlarda fetal enfeksiyonlar yanında, abort, ölü doğum veya neonatal enfeksiyonlar da sayılabilir (Drevets ve Bronze, 2008). Yapılan çalışmalar ile *L. monocytogenes* toprak, silaj, yeraltı suları, atık suları ve sebzelerden izole edilebilmiştir (Thévenot ve ark., 2006). Mantar, protist veya nematodlarla ilişkisi olup olmadığı henüz gösterilmemiştir, fakat bunların potansiyel teşkil ettiği düşünülmektedir (Hilbi ve ark., 2007). *L. monocytogenes*' in gıda işletim tesislerinde metal iyonları, yüksek tuz, stabil olmayan sıcaklık ve pH gibi bakteri

gelişimini strese sokan şartlardan etkilenmediği de gözlenebilmiştir (Thévenot ve ark., 2006).

Çok sayıda genin asite direnç, osmotik ve sıcaklık stresi gibi streslere karşı direnç mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *Listeria* türlerinin çoğunluğu strese cevap verilmesi sırasında bir sigma faktör olan Sigma B'yi (σ_B) kullanır (Chaturongakul ve ark., 2008). Buna rağmen, diğer Gram pozitifler gibi spor oluşturmazlar ve gıda işleme tesisleri gibi önemli yerlerde yıllarca canlı kalabilirler (Lundén ve ark., 2002).

L. monocytogenes' in çevre ile konakçı arasındaki ilişkisini sağlayan ilk bağlantı bir transkripsiyonel aktivatör olan *PrfA* ile olur. Söz konusu gen bakteriyel virulens ile ilgili birçok gen ürününü eksprese eder. *PrfA* dışarıda aktif olur, bu genin ürünlerinin indüklemesi ile bakteri konakçı hücreye invazyon için internalinler (InlA, InlB), Listeriolizin O (LLO), fosfatidilkolin-spesifik fosfolipaz C (PC-PLC), fosfatidil inositol-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC), hücre içi gelişim faktörü (Hpt) ve aktin indükleyen protein (ActA) devreye girer. *L. monocytogenes* fazla canlı türünü ve konakçı hücre tiplerini enfekte edebilmektedir (Lecuit, 2007; Seveau ve ark., 2007). Enfeksiyon oluşmasında en popüler bulaşma yolu kontamine gıdaların yenmesi sonrası bağırsak epiteli üzerinde şekillenen yoldur. Hem sindirim sistemi ile hem de damar içi yolla yapılan enfeksiyon modellemeleri de fare, maymun, kobay ve kemirgenlerde başarılı olmuştur (Blanot ve ark., 1997; Bakardjiev ve ark., 2004; Lecuit, 2007; Wollert ve ark., 2007; Smith ve ark., 2008). *Listeria* kan dolaşımına girdikten sonra en çok karaciğer ve dalak makrofajlarında birikir. Burada etkili bir görev yerine getirilmezse bakteri immun sistem kontrolünden kaçır ve diğer dokulara giderek replikasyonunu hızlandırır (Zenewicz ve Shen, 2007). Yayılım hücreden hücreye devam eder. İmmun sistemden gelmeyecek etkili yanıt ileri zamanlarda ölümcül olabilen sistemik ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarını şekillendirebilir (Pamer, 2004).

InlA ve InlB' yi de içeren birkaç yüzeysel protein bakteriyel invazyonun gerçekleşmesine öncülük eder (Seveau ve ark., 2007). InlA bir konakçı hücre adhezyon molekülü olan ϵ -kaderine bağlanır. InlB HGF - Hepatocyte growth factor- reseptöre bağlanarak konakçı hücreye girme yeteneği kazanır. Listeriolizin O ve beraberinde iki fosfolipaz devreye sokarak membranda oluşturduğu porlardan kaçış yapar (Kathariou ve ark., 1987; Camilli ve ark., 1991; Mengaud ve ark., 1991; Vazquez-Boland ve ark., 1992). Konakçı hücreye girdikten sonra bakteriyel heksoz fosfat yanında

lipoik asit ve peptidlere ihtiyaç duyarlar (Marquis ve ark., 1993; Joseph ve Goebel, 2007). *L. monocytogenes* bulunduğu hücrede geliştikten sonra komşu hücreye geçmek için aktin polimerizasyonunu devreye sokar. Bu polimerizasyonu indükleyen protein ActA' dır (Pizarro-Cerdá ve Cossart, 2006). Polimerizasyon sağlanır, hücrede vakuol oluşturulur ve hücreden hücreye geçiş ile sonuçlandırılır. Burada son olarak devreye giren protein ve enzimler LLO ve fosfatidilkolin fosfolipazdır ve ikinci vakuol oluşumunda öncü teşkil eder (Vazquez-Boland ve ark., 1992; Schnupf ve Portnoy, 2007; Yeung ve ark., 2007).

2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık

Antimikrobiyal duyarlılık testleri *Listeria* türleri için göreceli olarak kısıtlıdır. Ancak yapılan çalışmalar ile kloramfenikol, makrolidler ve tetrasiklinlere karşı direnç gelişiminde görev alan direnç plazmidleri *L. monocytogenes*' de tespit edilmiştir (Poyart-Salmeron ve ark., 1992; Hadorn ve ark., 1993). Streptomisin, kanamisin, rifampin, eritromisin, sülfametoksazol gibi antibiyotiklere direnç de gözlenmiştir (MacGowan ve ark., 1990; Slade ve Collins-Thompson, 1990; Facinelli ve ark., 1991; Charpentier ve ark., 1995). *Listeria* türlerinin antibiyotik direncini üç genetik unsurun oluşturduğu, bunların da kendinden devredebilir plazmidler, mobilize olabilen plazmidler ve birleştirici transpozonlar olduğu bildirilmiştir (Hadorn ve ark., 1993 Charpentier ve ark., 1995; Charpentier ve ark., 1999).

Bir çalışmada insan *Listeria* enfeksiyonlarında izole edilmiş 488 adet *L. monocytogenes* izolatu antibiyogram testi ile analiz edilmiş, bunların 5 adetinde florokinolonlara direnç tespit edilmiştir (Godreuil ve ark., 2003). Yapılan antibiyotik direnç çalışmalarında mandıra çevre örnek izolatlarında; ampisilin, sefalosporin C, kloramfenikol, florfenikol, penisilin, rifamisin, rifampisin, streptomisin ve tetrasikline (Srinivasan ve ark., 2005), süt içerikli ürün izolatlarında; ampisilin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, oksasilin, penisilin, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazol, vankomisine (Harakeh ve ark., 2009) ve peynir izolatlarında sefoksitin ve sefotaksime (Rota ve ark., 1996) dirençli izolatların varlığı gösterilmiştir.

2.8. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenen polipeptitlerdir ve genel olarak üretmesini tetikleyen suşlara karşı aktif olurlar. Bu maddeler gıdaların ısıtma, dondurma-

çözdürme, asit, yüksek hidrostatik basınç gibi gıdaların diğer koruma yöntemlerinde de yardımcı olurlar (Kalchayanand ve ark., 1994; Muriana 1996).

Laktik asit bakterilerinden elde edilen bakteriyosinler gıda endüstrisinde gıda koruyucusu olarak kullanılabilen bileşiklerdir. İnsan sağlığında da tedavi amaçlı olarak kullanılırlar. *Listeria* enfeksiyonlarının tedavilerinde de uygulamaları olmuştur (Lohans ve Vederas, 2012; Salvucci ve ark., 2012). Bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri *Listeria* gibi patojen bakterilerin üremelerini inhibe ederek etki gösterir. Bakteriyosinler diğer bakterilerin gelişiminin verdiği uyarı ile bakteri tarafından hücre dışı olarak ribozomal sentezlenirler. Bakteriyosinler 4 çeşittir: 1- Lantibiyotik peptitler, 2- 10 kilodaltondan küçük peptitler, 3- 10 kilodaltondan büyük peptitler, 4-Siklik peptitler. Lantibiyotik ve 10 kilodaltondan küçük peptit grubundan *Listerialara* karşı aktif çok sayıda bakteriyosin tanımlanmıştır (Saavedra ve ark., 2004; Castellano ve Vignolo, 2006; Drider ve ark., 2006; Barrett ve ark., 2007). Gıdalarda koruma anlamında bakteriyosinlerin üç uygulaması vardır; gıdalara saf olarak hazır bakteriyosin ilavesi, gıdalara bakteriyosin üreten bakteri inokulasyonu, proseste bakteriyosin üreten bir bakteri ile fermentasyon.

Bakteriyosinlerin veya bakteriyosin üreten bakterilerin kullanımında çok sayıda bildirim yapılmıştır (Vuyst ve Vandamme, 1994; Castellano ve Vignolo, 2006; Liu ve ark., 2008; Ravyts ve ark., 2008). *Listerialara* karşı çalışan bakterilerin tedavi amaçlı kullanımında çalışmalar yapılmıştır. Bakteriyosinlerin çoğu düşük konsantrasyonda etkilidirler (Lohans ve Vederas, 2012). Nisin ve pediosin gibi bakteriyosinlerin *L. monocytogenes*' e karşı çok etkili olduğu tespit edilmiştir. Nisin *Leucostoc lactis* subsp. *lactis*' in sınırlı sayıda suşu tarafından üretilir (Coma ve ark., 2001). Bu bakteriyosinlerin *C. botulinum* gibi Clostridium türlerini engellemede yararlı olduğu bildirilmiştir (Chunk, 2001). Pediosinler *Pediococcus* suşları tarafından üretilir (Degnan ve ark., 1993; Liao ve ark., 1993). Buzdolabında saklanan nisin ile ($1,3 \times 10^3$ - $5,0 \times 10^3$ IU/mL) muamele görmüş somon balığı ve bazı et ürünlerinde *L. monocytogenes*' in gelişiminin engellendiğini gözlenmiştir. Buzdolabında sabit ve hareketsiz olarak tutulmuş ve $61,4 \text{ mg/cm}^2$ dozunda nisin ile muamele görmüş peynirde 84 gün sonra 1,5 log bakteri azalması tespit edilmiştir (Scannell ve ark., 2000). Nisin aktivitesi çevresel şartlarla değişebilmektedir. Sıcaklık (Szabo ve Cahill, 1999) ve pH (Harris ve ark., 1991) düşürülmesi ile de nisin aktivitesinin arttırılabildiği bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada $< 10 \mu\text{g/mL}$ düzeylerinde uygulanan nisin aktivitesinin % 2 sodyum klorür ilavesi ile artırılabilirdiği gösterilmiştir (Harris ve ark., 1991). Yüzde 10'dan yukarı düzeyde stearik asitin nisin aktivitesini düşürdüğü ($1,0 \times 10^5 \text{ IU/mL}$) ve karbondioksitin ise patojenin nisine duyarlı hale getirdiği gözlenmiştir. Aynı zamanda % 100 CO_2 'li ve sıcaklığın 4°C olduğu ortamda pH 6,2' ye tamponlaşmış solüsyonda $2,5 \mu\text{g/mL}$ düzeyinde nisin ile 10 gün sonunda *L. monocytogenes* bakterilerinin yaklaşık 4 log azaldığı tespit edilmiştir. Bu araştırmada aynı zamanda en yüksek sayının 35 gün sonra, nisin olmadan ve aerobik şartlarda en yüksek sayının ise 10-15 gün sonra ölçüldüğü bildirilmiştir (Nilsson ve ark., 2000). *L. monocytogenes*' in suşlarının nisin duyarlılıkları değişkenlik gösterir (Benkerroum ve Sandine, 1988). Et ve süt ürünlerinde pediosinin *Listeria* baskılayıcılığı gösterilmiştir (Degnan ve ark., 1993; Liao ve ark., 1993; Goff ve ark., 1996). Pediosin aktivitesi hakkında süt ve sıvı yumurtada yapısındaki bileşiklerin etkileşimi yüzünden çelişkili sonuçlar açıklanmıştır (Liao ve ark., 1993). Gıda hazırlanırken harç safhasında pediosinin *Listerialara* karşı aktivitesi ürüne fosfatidil kolin kaplı lipozom ve % 0,1 Tween 80 eklenerek yükseltilebilmiştir (Degnan ve ark., 1993). Nisin ve pediosin gibi bakteriyosinler proton motifi kırarak bakteriyel membranı parçalarlar (Goff ve ark., 1996). *L. monocytogenes*' de asite adaptasyon ve besin yetersizliğinin nisin ve pediosine direnci artırdığı da bildirilmiştir (Lou ve Yousef, 1997). Bir Anti-*Listeria* bakteriyosini olarak sentetik enterosin CRL35, bazı antibiyotikler ile kombine edilmiş ve *L. innocua* ve *L. monocytogenes*' e karşı başarılı sonuçlar alınmıştır. İntestinal florada bakteriyosinlerin özellikle kemotripsin ve tripsin gibi proteazlara hassas olduğu gösterilmiştir (Minahk ve ark., Salvucci ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada *L. monocytogenes* ile enfekte edilen fareler bir bakteriyosin olan piskikolin 126 ile tedavi edilebilmiştir. Bunun yanında fare organlarında bakteri yükünü düşürdüğü ve enfeksiyonda da küçük klinik belirtiler olduğu tespit edilmiştir (Ingham ve ark., 2003). Bir başka çalışmada pediosin AcH üreten bir suş ile bağırsak florasındaki *Listerialar* elimine edilebilmiştir (Bernbom ve ark., 2006). Bunun yanında sentetik enterosin CRL35'in bakteriyosin üreten bakteri uygulamasından daha etkin olduğu gözlenmiştir (Salvucci ve ark., 2012).

2.9. *Listeria monocytogenes* ve diğer *Listeria* Türlerinin Epidemiyolojisi

Geniş sıcaklık aralığında üreme ve yüksek tuz konsantrasyonları gibi şartlarda üremesi *L. monocytogenes*' i bir gıda patojeni olarak önemli kılmıştır. Sporsuz bir bakteri

olmasına rağmen zor çevresel şartlara dayanabilmektedir (Watkins ve Sleath, 1981). Doğal ortamlara dayanıklı olması gıda işleme tesislerinde geniş bir periyotta bu bakteriyi bir gıda enfeksiyonu etkeni olarak popüler kılmıştır. Bu tesislerde şekillenebilen pH, sıcaklık, tuz gibi stres faktörlerine karşı bile *L. monocytogenes*' in yanında diğer Listeria türlerinin benzer dirençleri gösterdiği bildirilmiştir (Tompkin, 2002).

2.9.1. Sularda Listeria

Listerialar su ve su ilişkili olabilen göl, nehir, ırmak gibi ortamlarda yaşayabilmektedir. Hollanda'da yapılan bir çalışmada yüzey sularının % 21'inde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Dijkstra,1979). Birleşik Krallık' ta yapılan bir çalışmada nehir suyu örneklerinde 3-180 kob/L düzeyinde bulunmuştur (Watkins ve Sleath, 1981). İskoçya'da yapılmış bir çalışmada nehir sularının mevsimsel bir örneklemede % 42-53 düzeyinde *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Fenlon ve ark., 1995). Yunanistan'da yapılmış başka bir çalışmada 4 nehirden 128 tatlı su örnekleme yapılmış % 4 düzeyinde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Arvanitidou ve ark., 1997). Belçika'daki bir küçük çalışmada 15 yeraltı suyunun sadece 1'inde *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Renterghem ve ark., 1991). Kanal, nehir, göl, gölet gibi ortamlarda yapılan bir 30 örnekleme çalışmada 8 adet *L. seeligeri*, 1adet *L. innocua*, 1 adet *L. welshimeri* bulunurken, *L. monocytogenes* izole edilememiştir (Finley ve Long, 1977). İtalya'da yapılan bir çalışmada ise nehir suyu örnekleme yapılmış, % 47 düzeyine *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* tespit edilmiştir (Bernagozzi ve ark., 1994). Başka bir çalışmada ise düşük tuzlu limanlarda su örnekleme yapılmış ve % 62 oranında *Listeria spp.* tespit edilmiştir (Colburn ve ark., 1990).

2.9.2. Kanalizasyon ve Atık Sularda Listeria

Çevresel ortamda bir bulaş kaynağı olarak atık suların Listeria için de potansiyel oluşturduğu bildirilmiştir. Hayvanlar ile ilişkili olarak mezbaha atıklarında yapılan bir çalışmada 18000 kob/L düzeyinde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Watkins ve Sleath,1981). Başka çalışmada işlenmemiş atık sularda yapılmış ve *Listeria spp.* düzeyi 10^3 - 10^5 kob/aralığında bulunmuştur (Geuenich ve Müller, 1984). İskoçya'da yapılmış bir işlenmemiş atık su çalışmasında bu düzey 120 kob/mL tespit edilirken, işlenmiş atık sularda ise 2-21 kob aralığında gözlenmiştir (Fenlon ve ark., 1995). Listeriaların atık su gibi stres oluşturabilen ekolojik ortamlarda canlılıklarının kanalizasyon çamurlarında

% 85-97 oranında kaybettikleri de bildirilmiştir (al Ghazali ve Al Azawi, 1988a; al Ghazali ve Al Azawi,1988b) Çevresel bir etken olarak güneşin etkisi araştırılmış ve bu atıklara direkt gelen güneş ışınlarının en az 8 hafta sonunda inaktif ettiği tespit edilmiştir (Al Ghazali ve Al Azawi, 1988a). Balık işleme tesisleri atık sularından yapılmış çalışmada örneklerin tamamında *Listeria* spp. bulunmuştur (Soontharanont ve Garland 1995).

2.9.3. Toprak ve Tarımsal Alanlarda Listeria

Listeria türlerinin önemli yaşam alanlarından birini toprak oluşturur. Bir çalışmada topraktan daha fazla düzeyde *L. seeligeri*, *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'dan izole edilmiştir (MacGowan ve ark., 1994). Mısır tarlaları, çayır ve otlak araziler, tahıl tarlaları, ekilmiş veya ekilmemiş araziler, orman veya yabani hayat bölgelerinden yapılan örneklemler ile bir çalışma yapılmış, en düşük olarak % 9,7 ile mısır tarlalarından, en yüksek ise % 21,3 ile ormanlardan *Listeria* spp. izole edilmiştir. Elde edilen 103 izolatin sadece 37' sinin farelerde enfeksiyon yaptığı da bildirilmiştir (Welsh, 1983).

2.9.4. Gıdalarda Listeria

Yaygın olarak salgın kaynaklarının epidemiyolojik olarak peynir ve peynir çeşitleri, pastörize ve pastörize olmamış süt, süt ürünleri (aromalı süt gibi), tereyağı, işlenmiş ve işlenmemiş balık, hazır salatalar işlenmiş et ürünleri, meyveler ve çiğ sebzelerden olduğu bilinmektedir. Sporadik Listeriozis vakaları çiğ süt, pastörize olmamış süt ile yapılmış dondurma, peynir çeşitleri, pişirilmemiş balık ve çiğ sebzelerden şekillenmiştir. Genel olarak enfeksiyon oluşturması için gıdalarda *Listeria* bakterisi varlığının eşik değeri 10^3 kob/g olarak bildirilmiştir. Fakat daha düşük seviyelerdeki gıdaların da enfeksiyon oluşturabildiği görülmüştür. Gıdalara bulaşma olarak gerek üretim sırasında, gerekse tüketimi sırasında şekillenerek hastalık oluşumuna sebep olduğu bilinen bir gerçektir (FAO/WHO, 2004).

Gerek EFSA, gerekse Türk Gıda Kodeksinde yapılan tanımlamalara göre 25 g gıda numunesinde varlığı istenmemiştir (EFSA, 2017; Türk Gıda kodeksi, 2017).

2.9.5. Sebze ve Meyvelerde Listeria

Yapılan çalışmalar ve araştırmalar ile sebze ve meyvelerde *L. monocytogenes* varlığı bildirilmiştir. Özelliklerin bu ürünlerin işlenirken toprak ile temasta olması bu bulaşmaya en önemli sebep teşkil etmektedir (Ryser ve Marth, 2007f)

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılında kavun, 2012 yılında salata ile işlenmiş peynir, 2014 yılında fasulye filizi ve karamelli elma, 2016 yılında da hazır salata ve dondurulmuş sebzelerle ilişkilendirilmiş Listeriozis salgınları bildirilmiştir (CDC, 2017).

İngiltere'de paketlenmeye hazır salatalık sebzelerden yapılan taramada *L. monocytogenes* et içerikli örneklerin % 4,8' inde, deniz ürünü içerikli örneklerin ise % 3,8'inde tespit edilmiştir (Little ve ark., 2007).

şili'de 2000-2005 yılları arasında yapılan çalışmada dondurulmuş salata örneklerinin % 25,4'ünden, yemeye hazır ve pişirilmif örneklerin % 10,2' sinden *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Cordano ve Jacquet, 2009).

Malezya'da 306 adet sebze örneği MPN-PCR (Most Probable Number-PCR) ile incelenmiş, örneklerin % 33,3'ünde *Listeria* spp., % 22,5' inde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Ponniah ve ark., 2010).

İspanya'da lokantalardan alınan marul ve ıspanaklar incelenmiş, % 2,9' unda *L. monocytogenes* varlığı gösterilmiştir (Soriano ve ark., 2001).

İran'da PCR (Polymerase chain reaction) destekli yapılmış başka bir çalışmada sebzelerin % 1,2' sinde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Jalali ve Abedi, 2008).

Amerika Birleşik Devletleri'nde ithal edilmiş Sardunya-İtalya menşeli 252 hazır salatada *L. monocytogenes* aranmış, % 17,2'sinde tespit edilmiş, ancak izolatlarda tüm virulens genlerinin (*prfA*, *rrn* - bir ribozomal operon-, *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *iap* -Invasion associated protein-, *plcA*, *plcB*) hepsine sahip olan bir izolatın olduğu bildirilmiştir (Coroneo ve ark., 2016).

Amerika Birleşik Devletleri' nin Pensilvanya eyaletinde küçük ölçekli mantar işleme tesislerinde multipleks PCR destekli yapılan çalışmalarda ise % 1,6 oranında *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Viswanath ve ark., 2013).

Norveç'te yapılan başka bir çalışmada ise marketlerden marul, mantar yanında ilekler de incelenmiş, toplam 890 örneğin 3'ünden *L. monocytogenes* izole edilmiştir.

Bunlardan 1 izolatin çilekten olduğu ve serotip 4 olarak tiplendirildiği bildirilmiştir (Johannessen ve ark., 2002).

2.9.6. Et ve Et Ürünlerinde Listeria

İnsan Listeriozis vakaları ve ölümlerinin et ve işlenmiş ürünlerinden kaynaklandığı ve oranının % 63-84 arasında olduğu bildirilmiştir (Gombas ve ark., 2003; Pradhan ve ark., 2011). Hastalık ve senaryo analizleri yapılmış bir çalışmada çevre veya diğer gıda ürünlerinden gerçekleşen çapraz kontaminasyon sıklığının Listeriozis ölümlerinde en önemli faktör olduğu gösterilmiştir (Pradhan ve ark., 2011). Bu çapraz kontaminasyonun jambon ürünlerinde 5,9 kat, hindi ürünlerinde ise 6,1 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca et ürünlerin işleme tesislerinde ve perakende ve tüketici düzeyinde ürünlerin dilimleme aşamasının, depolama süresinin, ortam sıcaklığının ve inhibitörlerin Listeria varlığını etkilediği bilinmektedir (Endrikat ve ark., 2010; Garrido ve ark., 2010).

İşlenmiş etler üzerine Belçika'da yapılmış bir çalışmada % 1,1 oranında *L. monocytogenes* tespit edildiği bildirilmiştir (Uyttendaele ve ark., 2009) Kanada'da yapılan bir çalışmada balık yanında 40 adet işlenmiş et ürünü örnekleme yapılmış, balık örneklemelerinin % 20'sinde *Listeria* spp. izole edilmiş, bunlardan % 5' lik oranın *L. innocua*, % 10' unun ise *L. monocytogenes* ve *L. welshimeri* olduğu bulunmuştur. İzole edilen *L. monocytogenes*' lerde ise serotip dağılımının 1/2a ve 1/2b olduğu PFGE destekli analizler ile beşeri izolatlarla yakınlığı beraberinde gösterilmiştir (Kovačević ve ark., 2012).

Çin'de yapılan bir araştırma işletme ekipmanları ile oluşabilecek çapraz kontaminasyon BAX-PCR (Dupont® geliştirdiği bir PCR metodu) destekli analiz ile incelenmiş ve riskin varlığı ortaya konulmuştur (Lin ve ark., 2006).

Ankara'da yapılan bir çalışmada pişmiş ve pişmemiş et ürünleri incelenmiş, % 54,1 *Listeria* spp. (% 46,57 *L. innocua*, % 0,68 *L. welshimeri*, % 0,68 *L. murrayi*) kontaminasyonu bulunmuştur. *L. monocytogenes* % 6,16 oranında tespit edilmiştir (Yücel ve Balcı, 2010).

İspanya'da yapılmış başka bir çalışmada et ürünleri ve işleme tesislerinden izole edilen *L. monocytogenes* ve *L. innocua* izolatları üzerinde yapılan antimikrobiyal dirençlilik çalışmasında ise *L. monocytogenes* izolatlarının % 34,5'inde iki antibiyotiğe,

% 2,9’unda ise ikiden fazla antibiyotiğe direnç olduğu bildirilmiştir (Gómez ve ark., 2014) .

2.9.7. Su Ürünlerinde Listeria

Tatlı su ve denizlerden izole edilen Listeria türleri aynı zamanda çeşitli su ürünlerinden de izole edilebilen bir kontaminanttır. Bunun yanında tütülenmiş balık, pişirilmiş ve dondurulmuş su ürünleri, gibi işlenmiş su ürünlerinden *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Kılınç ve ark., 2001).

Malezya’da işlenmiş et yanında fermente balık ürünleri incelenmiş, toplanılan fermente balık ürünlerin % 12’ sinde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir. Balık örneklerinde farklı sayılarda *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. denitrificans* izole edilmiştir. En fazla izole edilen tür *L. ivanovii* olurken, *L. grayi* ve *L. murrayi* tespit edilememiştir (Hassan ve ark., 2001).

PCR destekli yapılan bir çalışmada balık ve kabuklu örnekleri incelenmiş, balık örneklerinin % 6,9’unda, kabuklu örneklerinin ise % 5,6’sında *L. monocytogenes* izole edilmiştir. En fazla izole edilen tür balıklarda % 65,5 , kabuklularda ise % 36,1 ile *L. innocua* olurken, en az sayıda izole edilen tür kabuklularda % 5,6 ile *L. welshimeri* olmuştur (Jeyasekaran ve ark., 1996).

İngiltere’de tütülenmiş balıklarda yapılan bir çalışmada % 3,4 oranında *L. monocytogenes* yanında, % 8,7 oranında *Listeria* spp. tespit etmiştir (Fuchs ve Nicolaidis, 1994).

Hindistan’da su ve tatlı su balıklarının etlerinde yapılan araştırmada 100 örnekten 39 adet *Listeria* spp. izole edilmiş, izolatlarda *L. monocytogenes* % 67, *L. seeligeri* % 21, *L. grayi* % 8 ve *L. welshimeri* % 5 oranında dağılım göstermiştir (Jallewar ve ark., 2007).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise 30 işlenmemiş, 48 marine balık incelenmiş, *Listeria* spp. işlenmemiş balıklarda % 30, marine balıklarda % 10,4 oranında bulunmuştur. İşlenmemiş balıklarda en fazla Listeria türü % 44,5 olarak *L. monocytogenes* olurken, marine balıklarda % 83,5 ile *L. murrayi* olmuştur (Yücel ve Balcı, 2010)

Elazığ Keban baraj gölü balıklarında yapılmış bir çalışmada tatlı su balıklarının bağırsak örnekleme yapılmış, % 6,6 oranında *L. monocytogenes* tespit edilmiştir. RAPD

destekli bu araştırmada sadece iki farklı band profili görüldüğü, bununda ileride insanlarda ciddi sağlık problemi oluşturabileceği bildirilmiştir (Ertaş ve şeker, 2005)

Başka bir çalışmada ise Finlandiya’ da alabalık çiftliklerinden temin edilen 510 adet gökkuşağı alabalığı incelenmiş, % 14,6 oranında *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Miettinen ve Wirtanen, 2005).

2.9.8. Sütte Listeria

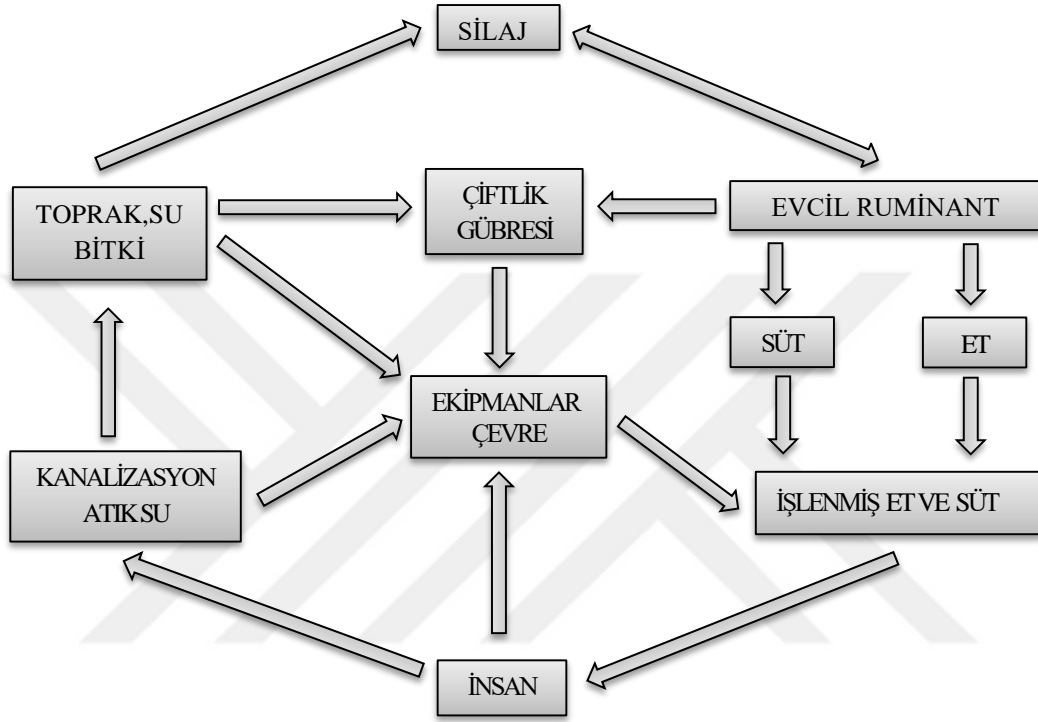
Son yıllarda gerçekleşen farklı Listeriosis salgınlarında süt ve süt ürünlerinin risk anlamında önemini korumaktadır. Ancak sütün kimyasal profilinde bulunan tamponlayıcı yapı birçok mikroorganizma üremesini baskıladığı, ancak bunu Listeria türü bakterilerde yapamadığı ortaya konulmuştur (Cousins ve Bramley, 1981; Chambers, 2002).

L. monocytogenes hücre içi ve fakültatif olduğundan, diğer hücre içi bakterilere göre (*Brucella* spp., gibi) şanslı davranabilmektedir. Hem lökosit içinde çoğalabilir, hem de bu hücrelere sonrasında süt ile sekrete edilebilirler. Bu da enfeksiyonun epidemiyolojisinde önem taşıyan bir basamaktır (Barza, 1985).

Bunun yanında mastit şekillendirmiş ineklerin kontamine sütleri yanında, iyi ve doğru şekilde pastörize edilmiş sütler ile de kontaminasyon oluşabilmektedir. Sütlere kontaminasyonun bir yolu da yemler üzerinden gerçekleşebilirken, burada ortam şartlarının en uygun yem çeşidinin silaj olduğu bildirilmiştir (Ryser ve Marth, 2007g). *L. monocytogenes*’ in kritik bulaşma noktaları şekil 3’de verilmiştir.

İngiltere’de yapılan 4172 örnekli süt ve süt ürünleri (iğ süt, peynir gibi.) alışmasında *L. monocytogenes* sütlerde % 1,1 oranında tespit edilmiştir (Greenwood ve ark., 1991). İsveç’te yapılan bir çalışmada 294 süt tankından alınan süt örneklerinin % 1’ inde *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Waak ve ark., 2002). Amerika Birleşik Devletleri’nde bir survey taramasında 861 süt tankından alınan numuneler *L. monocytogenes* yanında *Salmonella* spp. ve koliform bakterileri açısından incelenmiş, tüm örneklerin % 6,5’ inde *L. monocytogenes* izole edilmiş, bu izolatların % 93’ ünün insan enfeksiyonları ilişkili 1/2a, 1/2b ve 4b olduğu tespit edilmiştir (Van Kessel ve ark., 2004). Litvanya’da yapılmış bir araştırmada yem, süt örnekleme yapılmış, yemlerden % 20 gibi yüksek bir oranda *L. monocytogenes* izole edilirken, süt tanklarından izole edilmemiştir (Konosonoka ve ark., 2012). İran’da 2007-2009 yılları arasında yapılan süt ve süt ürünleri örneklemeinde toplam 594 adet örnek incelenmiş, bunların

% 32,7' sinde *L. monocytogenes* izolasyonu sağlanabilmiştir (Rahimi ve ark., 2010). Fekal, çevresel, süt filtre sistemleri ve süt tankı örneklemeleri ile Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılmış çalışmada süt filtre örneklerinin % 67,6' sında, süt tankı örneklerinin ise % 19,7' sinde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Latorre ve ark., 2009).



Şekil 3. *L. monocytogenes*' in kritik bulaşma noktaları.

Türkiye' de ise yapılan çalışmalar olarak 6 aylık bir örnekleme ile Kars ilinde 150 çiğ süt incelenmiş, bunların % 2'sinde *L. monocytogenes* tespit edilirken (Arslantaş ve Yıldız, 2003), Van' da yapılmış bir başka çalışmada 250 çiğ süt örneğinin % 2,4' ünde *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Sağun ve ark., 2001).

Issa ve ark. 2009 yılında yaptığı çalışmada İstanbul'da 5 ayrı çiftlikten temin ettikleri 350 süt örneğinin sadece 2 adetinde *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir (Issa ve ark., 2010).

Burdur ilinde ise yapılmış bir başka çalışmada silaj yemlemesi yapılan işletmelerden silaj ve süt örnekleme yapılmış, alınan 85 süt örneğinin sadece 1'inde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Taşçı ve ark., 2010).

Dünya’da sütte *L. monocytogenes* çalışması yapılmış bazı ülkelerde insidens değerleri 0-19,7 arasında bulunmuştur. En düşük İtalya’da, en yüksek değer ise A.B.D’de tespit edilmiştir (Botsaris ve ark., 2016).

2.9.9. Hayvanlarda Listeriozis

Çevresel ve yem gibi benzer kontaminasyon yolları ile hayvanlarda Listeriozis görülebilmektedir (Ryser ve Marth., 2007h).

Koyunlarda *L. ivanovii*’ ye ek olarak *L. monocytogenes*’ in özellikle serotip 1/2, 3, ve 4’lerin enfeksiyonda ön plana çıktığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Low ve Donachie, 1997). İlk olarak Yeni Zelanda’da koyunlarda görülüp, adına “dönme hastalığı” verilen bu enfeksiyonda sonradan patolojik olarak ensefalit, meningoensefalit ve ensefalomiyelit tanımlanmıştır (Seeliger, 1961). Koyunların ve sığırların enfeksiyonda duyarlılık açısından % 30 daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Low ve Donachie, 1989). Diğer görülen enfeksiyon şekli olarak plasentit, abort, ensefalit yanında splentit, hepatit ile beraber gastrointestinal septisemi de görüldüğü belirlenmiştir (Ryser ve Marth, 2007i).

İnsanlara bir et ve süt kaynağı olarak sığırlarda Listeriozis koyunlardan farklı değildir. Ancak koyunlarda belirtilen yangı şekillerinden farklı olarak konjunktivit de gelişebilmektedir. Hatta bulaşma yolunu silajlardan sağladığı için İngiltere’de hastalık “silage eye” (silaj gözü) olarak anılmaktadır (Erdoğan, 1998). Bunun yanında süt ineklerinde açık yara ile çevresel kontaminasyon mastit şekillenebilmekte, kontamine sütler ile yavru buzağılara ve insanlara bulaşması olabilmektedir (Kalorey ve ark., 2008). İtalya’da koyun ve keçi sütünde yapılan bir *Listeria* çalışmasında % 1,2 oranında patojenik olmayan *Listeria* (*L. innocua* ve *L. ivanovii*) tespit edilmiştir (Latorre ve ark., 2008). Farklı hayvanlardan fekal bulaşmalara diğer hayvanlara hastalık riski oluşturulduğu da bilinmektedir (Weber ve ark., 1995).

Kanatlı hayvanlarda da Listeriozis ilk olarak 1935 yılında tanımlanmıştır. Çok sayıda evcil kanatlı türünde Listeriozis oluşabildiği bugün bilinmektedir. Sağlıklı hayvanların fekal materyallerinde *Listeria* spp. olabilmektedir. Bu türlerin enfekte olmaları kontamine toprak, diğer türlerin fekal materyalleri vs. ile gerçekleşir. Kanatlılarda dirençli türler (ördek gibi) varken, immünitinin düştüğü bazı bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda (Salmonelloz, Koriza, Newcastle) ise sekonder enfeksiyon olarak şekillenebilmektedir. Bir diğer tehdit olarak koyun, sığır çiftliklerine bakteriyi taşıyarak kontaminasyon oluşturabilirler (Ryser ve Marth., 2007j).

2.10. Hayvan Yemlerinde Listeria

Listeriaların bulaşmasında bir faktör olan hayvan yemleri yapılarında su içerirler. Saman veya tane yem gibi az su içeren yemlerden *Listeria* spp. izole edilmiştir. Bu da bulaşma kaynağı olarak yemleri önemli kılmıştır (Garcia ve ark., 1996).

2.10.1. Hayvan Yemi Olarak Silaj

Geviş getiren hayvanlarda sadece yoğun yemlerle karşılanamayan beslenme gereksinimleri ayrıca yeşil yemler yanında kaba yemlerle de karşılanır. Hayvanlara yeşil yem desteği doğadan karşılanarak verilir. Ancak bu karşılama süresi yıl içinde sınırlı günlerde gerçekleşir. Ülkemizin ekserisi olarak bir kısmını oluşturan Orta Avrupa'da yeşil bitkilerin vejetasyon süresi 180 güne kadar ulaşırken, bu süre ülkemizin diğer ekserisi olarak görüleceği Akdeniz kuşağında 200 günü geçmektedir. Vejetasyon süresi sırasında otlayan hayvanlar su bakımından zengin yeşil bitkilerle ihtiyaçlarını karşılarlar. Ancak yılın 160-180 günü bulabilen ot bakımından kısıtlı süresinde yemlenme açısından hayvanlarda kısıtlı şartlar şekillenmektedir. İşte bu yeşil otların imkanlarını devam ettirmek adına uygulanan bir metot su bakımında zengin yem unsurlarının silaj haline getirilmesidir. Tarihi olarak 3500 yıllık bir geçmişe sahip olan silaj, kültür hayvancılığının gittikçe ilerlemesi sonrasında 17. yüzyılda Baltık ülkeleri ve Almanya'da uygulanmış, son yarım asırda da tüm dünyaya yayılmıştır. Son yıllarda ise Türkiye'de kullanılması gittikçe yaygınlaşmakta ve artan hızla devam etmektedir. Silaj kelimesi etimolojik olarak silo kelimesinden türetilmiş bir kelimedir. Su bakımında zengin yemlerin farklı malzemelerden (beton, taş, tahta, plastik) yapılmış silo içinde tamamen havasız ortama maruz bırakılıp fermente edilmesi ile elde edilen bir yem çeşididir (Kutlu, 2017).

Silajın bir yem olarak sahip olduğu özellikler vardır. Bunlar sıralanırsa;

1. Kaba yem yetersizliklerinde su bakımından zengin kaba yem karşılar.
2. İklim olarak otların kurutulmasına fırsat vermeyen yağışlı bölgelerde yemlemeye imkan sağlar.
3. Su bakımından zengin yemleri saklamada yardımcı olur.
4. Kurutmaya göre besin kaybı az şekillenir.
5. İçine karışmış yabancı otları (toksik, alerjik vs. özellikli bitkiler) silolama sonrası hayvanlara zararsız hale getirir.
6. Hayvanlarda iştah açıcı etki gösterir.

7. Depolanma sırasında kuru otlara göre çok az hacim işgal ederler.
 8. Açılmadığı sürece 2-3 yıl saklanabilir.
 9. Mekanizasyon kullanıldığında iş maliyetlerini düşürür.
 10. Yem maliyeti açısından kuru otlara göre düşük maliyetlidir (Tıknazoğlu, 2009).
- Silajların yapıldığı siloların yapılanması farklı materyaller ile oluşturulabilir. Bunlar arasında şunlar sayılabilir;

1. Toprak üstü silindirik-sürekli silolar: Ahşap, tuğla, beton ve metal silolar.
2. Toprak üstü silindirik geçici silolar: Çit ve demet silolar.
3. Sürekli yatay silolar-Bank silolar-Betonarme
4. Geçici yatay silolar-Plastik bez silolar, sosis tipi silolar, ahşap duvarlı silolar
5. Toprak altı silindirik silolar: Çukur veya silindirik silolar: beton, taş, tuğla
6. Toprak altı yatay silolar: Hendek silolar: beton, taş, tuğla, ahşap (Tıknazoğlu, 2009).

Silaj yapımında kullanılan bitkiler o bölgeye uygun flora, iklim vb. etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Silaj hazırlanmasında kullanılan bitkiler içinde bugün çayır otu, üçgül, şeker pancarı, patates, mısır (hasıl), yonca, ayçiçeği, lüpen sayılabilir. Mısır hasılı, sudan otu, lahana yaprakları, ayçiçeği, yer elmasının yeşil kısımları, şeker ve hayvan pancarı yaprakları, darı hasılı gibi bitkiler kolay silolanabilirken, orta derece silolanabilen olarak çavdar hasılı, bakla, baklagil karışımları, lüpen çeşitleri, üçgül çeşitleri (çiçekte veya çiçeklenmeden sonra), yeşil hardal, ayçiçeği (körpe), çayır otu bitkileri sayılabilir. Mera otları (körpe), fiğ ve bezelye çeşitleri, üçgül çeşitleri (çiçeklenmeden önce), tatlı lüpen ve yonca ise en zor silolan bitkiler içindedir. Silolanmada fermentasyonu direkt etkileyen tüm yem bitkisinin kimyasal kompozisyonudur. Silajın hazırlanmasında silajı iyi kalitede yapmak için fermentasyon şartlarının iyi oluşturulması gerekir. Silolan bitki ilk aşamada sadece % 20 kuru madde içerir. Kuru madde oranını artırmak, su oranını düşürmek için yem bitkisi kesim sonrası kısa bir süre kurutulur. Kurutulma sonrasında kuru madde oranı % 30-35 düzeyine çıkar. Bu orandan yukarı çıkması fermentasyonun şekillenmesi için iyi olmamaktadır. Ayrıca manüplasyon olarak fazla kuruma sonrası, fermentasyon için oluşturulması gereken havasız ortam için gerekli sıkıştırma işlemi verimli olmayabilmektedir. Silolan yemde su oranı fazla olduğunda, fermentasyon ürünü olan su ile birleşme olmakta, yükselen su ile silajda besin kaybı şekillenmektedir. Fermentasyonda karbonhidrat kullanılır, bu yüzden kalitenin şekillenmesi anlamında yemin karbonhidrat oranı önemli bir unsur teşkil

etmektedir. Tane yemlerin ağırlıkta olduğu silajlarda karbonhidrat yeterli olabilirken, bu olay yeşil otların ağırlık gösterdiği yemlerde olmamaktadır. Bunun gibi fakir içerikli silaj uygulamalarında fermentasyonu desteklemek anlamında silaja melas, şeker vs. gibi maddeler eklenir. Günlük olarak eklenen silaj bitkisi eklendiği her gün sıkıştırma işleminden geçirilir. Bunun için üzerinden geçecek traktör gibi araçlar kullanılır. Ancak fermentasyonun kalitesi anlamında traktörün giriş çıkışında dışarıdan çevresel bakteri kontaminasyonunu en aza indirmek için naylon gibi yere örtü örtülebilmektedir. Sıkıştırmanın kalitesi oksidatif olarak çalışacak bakterilerin gelişini engeller. Silaj yapılan zemin düz olamamaktadır, zamanla üst kesimlerden gelecek fermentatif su, alt katlarda birikme yapabilir. Bu yüzden zemine yer yer 20° yi bulabilen eğim verilir ve bahsedilen suların drene edilmesi sağlanır. Tüm unsurlar koyulduktan sonra fermentasyon için tüm silaj hava almaması için naylon gibi hava geçirmez malzemelerle kapatılır. Fermentasyona bırakılan silajda fermentatif bakterilerin faaliyete geçmesi için beklenen sıcaklık 30 °C' dir ve bu sıcaklıkta en yüksek verim elde edilir. Fermentasyon istenen ve verimli bir şekilde olması için katkı maddeleri kullanılabilir. Karbonhidrat desteği sağlamak için % 1-4 oranlarında tahıl kırmalarının, % 1-6 oranlarında melasın, % 2-3 oranlarında peynir suyunun, % 1-2 oranlarında şekerin koyulabilebilmektedir. Farklı karbonhidrat kaynakları olarak da hayvan pancarı, şalgam, patates ve çeşitli tahıl unları kullanılabilir. Yemlerde su içeriğini düşürmek anlamında kuru pancar talaşı ve buğday kepeği ilave edilebilmektedir. Hayvanlara sodyum desteği ve fermentasyonu destek anlamında silaj yemlerine % 1-1,5 oranında NaCl koyulmaktadır. Ayrıca karbondioksit, formaldehit, karbonbisülfid, kükürt dioksit, mineral ve organik asit maddelerin ilavesi ile sıcaklık artışını ve oksidatif fermentasyonu engellemede olumlu sonuçlar alınmıştır. Bundan başka baklagiller gibi silaj yemlerinde takviye anlamında fermentatif bakteri inokulasyonu yapılarak fermentasyon desteklenebilmektedir. İnokulant ilavesi yapmak aynı zamanda silajın açılması sonrası stabil kalmasına katkı sağlamaktadır. Hayvanlara besin katkısı için yeme magnezyum koyulabilmektedir. Mısır gibi proteinin düşük olduğu yemler de ise protein eklenebilmektedir. Kapatma işlemi yapıldıktan ve fermentasyon şartları hazırlandıktan sonra silajın oluşumu 5 aşamada gerçekleşir. Bunlar;

Birinci aşama; Bu aşamada canlı hücreler solunumlarına devam eder. Kolay çözünen karbonhidrat kullanılır, karbondioksit oluşumu yaşanır. Sıkıştırılma yapıldığında su sızıntıları da görülür. Sıcaklık artışı düşük seviyededir ve bu devre 1-2 gün sürer.

İkinci aşama; Oksijen düşüklüğü sebebiyle ortam bakterilerinin (*E. coli* vb.) düşük miktarda asetik oluşturduğu aşamadır. Süresi çok kısadır.

Üçüncü aşama; Uygun miktardaki karbonhidrat yüzünden Laktobasil ve Streptokokların laktik fermentasyonu ile laktik asit oluşmaya başlar.

Dördüncü aşama; Yatay seviye izler. Fermentasyonun dinlenme aşamasıdır ve laktik asit seviyesi en yüksektedir. pH sabitlenir ve 4,2' nin altındadır. İlk üç aşama 3-5 gün, ilk dört devre ise 17-21 gün sürer. Buraya kadar silaj oluşumu büyük miktarda tamamlanır. Ancak silaj 6 haftadan önce açılmaz. Katkı maddelerinin kullanılması bu süreleri kısaltabilir.

Beşinci aşama; Clostridium gibi bütirik asit oluşturan bakteriler kalan karbonhidratları ve oluşmuş laktik asiti parçalamaya başlarlar. Beraberinde aminoasit yıkımı ve uçucu yağ asidi yıkımı da şekillenir. Bu aşamadaki olaylar devam ettikçe besin kaybı silajda devam eder. Bu yüzden kontrol edilmesi gerekir. Her silaj kullanımı sonrası kapatılma işleminin yapılması ve havasız ortamın devam ettirilmesi gerekir (Kutlu, 2017).

Silajların rengi kullanılan yem bitkisine göre değişiklik göstermekte olup, genel olarak zeytin yeşili renktedir. Renk kahverengi veya siyaha ulaştığında kalitesinin düşmüş olduğu anlaşılır. Klasik olarak laktik asit kokusuna sahip olmalı, küf şekillenmemeli, amonyak ve tereyağı kokusuna benzer olan bütirik asit kokularına sahip olmamalıdır. Kaliteli silaj asidiktir. En iyi silajlarda pH değerleri 3,5-4 arasında olurken, kötü silajlarda bu değer 4,7'den yukarı olmaktadır (Tıknazoğlu, 2009; Kutlu, 2017).

Önemli silaj yemi bitkilerinden biri mısırdır. Dikkat çekici bir düzeyde kolay parçalanabilen karbonhidrat içerir. Silolanması kolaydır. Hayvanlar tarafından tüketilmesi iyi seviyede olup, enerjice zengindir ve kaba yem kaynağıdır. Erken dönemlerinde kesilip silolanması enerji için karbonhidratta ve suda eksiklik oluşturmaz. Bu dönemde yapılan silolamalarda fermentasyonu fazla olur, fakat hayvanlar tarafından yenmede düşüklük yaşanır. Erken kesim sonrası yapılan silolamalarda baklagiller gibi protein takviyesi yapılabilir. En uygun silolama zamanı tanelerde süt olum olduğu zamandır. Takviye anlamında protein destek bitkileri (yonca, baklagiller) yanında azot

desteği anlamında % 0,5-2 düzeyinde üre ilavesi de yapılabilir. Verimli bir silaj için mısır kuru maddesinin % 25 olması istenir. Kuru maddenin fazla olması (% 30-35) silajda kolay çözünen karbonhidrat seviyesini % 10 altına düşürerek fermentasyonda verimi azaltır ve sindirimde güçlük şekillendirir. Yüksek besin değerine sahip bu silaj, işletmenin diğer kaba yem kaynakları da dikkate alındığında süt ineklerine kuru madde gereksiniminin yarısını karşılayacak düzeye kadar verilmesi mümkün olabilmektedir. Süt sığırlarına 15-30 kg/gün düzeyinde verilir. Mısır hasılı, yüksek düzeyde kolay parçalanabilen karbonhidrat içeriği ve uygun tampon kapasitesi nedeniyle en kolay silolanabilen yem bitkisi özelliği taşımaktadır. Bu özelliği yanında geviş getiren hayvanlar tarafından sevilerek tüketilmesi ve enerjice zengin olmasından dolayı vazgeçilmez bir kaba yem kaynağıdır. Körpe aşamada karbonhidrat ve su içeriği bakımından çok zengindir. Bu neenle bu dönemde silolandığında fermantasyon fazla olduğundan hayvanlar silajı severek yemezler. Körpe ve sulu aşamada silolanması zorunluluğu doğduğunda, kuru maddesi daha yüksek, baklagiller gibi proteince zengin yem bitkileri ile karışık olarak silolanmalıdır (Tıknazoğlu, 2009; Kutlu, 2017).

Kuru madde içeriğinin yüksek olduğu ve tanelerin hamur olumundan sonraki devrelerde yapılacak mısır silajının kalitesi düşük olacaktır. Bu dönemde kuru madde içeriği % 35' in üzerine çıkacak, kolay çözünebilen karbonhidrat miktarı % 10' nun altına düşeceğinden laktik asit bakterilerinin gelişimi yetersiz olduğu gibi silajın da sindirilebilirliği düşük olur. Silajlık mısırın hasat anında doğrama uzunluğunun ayarlanarak kısaltılması ve olgunlaşmış tanelerin tane kırıcılarıyla kırılması sağlanarak silaj kalitesi ve yem değerinin iyileştirilebileceği bildirilmektedir. Yüksek besin değerine sahip bu silaj, işletmenin diğer kaba yem kaynakları da dikkate alınarak süt ineklerine kuru madde gereksiniminin yarısını karşılayacak düzeye kadar verilmesi mümkündür (Kutlu, 2017).

Silaj temel olarak istenilen ve istenilmeyen olmak üzere iki grup mikroorganizma florasından oluşur. Fermentasyon ana olarak Laktik Asit Bakterileri (LAB) tarafından şekillendirilir. LAB' nin büyük kısmını Lactobacillus türü işgal eder. Bu tür yanında popülasyon olarak daha az seviyede ancak aynı görevi üstlenen faydalı bakteriler olarak Pediococcus, Leuconostoc ve Enterococcus türleri de mevcuttur (McDonald, 1991).

Silaj fermentasyonunda önemli görev üstlenen LAB' nin (Tablo 10) ürettikleri organik asit, besin maddesi rekabeti ve oluşturdıkları bakteriyosin gibi kimyasal bileşikler ile antimikrobiyal etki yaparak diğer tür mikroorganizmaları olumsuz yönde etkiledikleri bilinmektedir (Magnusson ve ark., 2003). LAB' lerinin çoğu mezofilik ortamda çoğalırken, termofilik özellik gösteren *L. delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* ve *L. thermophilus* gibi bakteri türü sayısı da az değildir (Panesar ve Kaur, 2015).

Silaj kalitesini etkileyen mikroorganizmalar olarak küfler, mayalar yanında Bacillus, Clostridium, Enterobacteriaceae ve Listeria türü bakteriler ön plana çıkmaktadır (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002; Kızılsimşek ve ark., 2016).

Tablo 10. Silajlarda yaygın tespit edilen bazı LAB türleri (Curry ve Crow'dan, 2002)

Homolaktik fermentatif	Heterolaktik fermentatif	
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. coryneformis</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>		

Özellikle silajın ilk aerobik ve erken anaerobik devrelerinde etki gösteren mayalar, aerobik şartlarda laktik asiti parçalayıp pH yükseltirler. Bu da diğer bakterilerin üremesine zemin hazırlar. Kuru madde kaybında artış ve istenmeyen koku şekillenmesini sağlarlar. Asite dayanamayan mayalardan Candida, Saccaromyces, Hansenula, Torulopsis gibi türlerin dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Silaj yapımının ilk haftalarında sayıları 10^7 kob/g' ı bulmaktadır (Kızılsimşek ve ark., 2016).

Küfler ise iyi kapatılmamış silajların yüzeylerinde üreyerek kendilerini gösterirler. Aerobik bozulmasında önemli etkenlerdendir. Yaygın olarak bulunan küf türleri Penicilium, Fusarium, Aspergillus, Mucor, Bysochlamys, Absidia, Arthrinium, Geotrichum, Monascus, Scopulariopsis ve Trichoderma olup, hayvanlarda iştah kaybı, hormonal bozukluk, bağışıklık sisteminin baskılanmasına bağlı enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler (McDonald, 1991; Nout ve ark., 1993). Enterobacteriaceae türleri ise bitki floralarında bulunabilmektedir. Bulunabilen bakteri cinsleri içinde Rahnella,

Erwinia, Hafnia cinsi bakteriler yanında, *E. coli*, *Serratia fonticola* türlerinin de olduğu bildirilmiştir (Heron ve ark., 1993). Silajın depolama süresince hayatta kalabilen az sayıda olan bu türler aerobik dönemde tekrar gelişmeye başlayabilir. Bu da hayvanlar için tehdit oluşturur (Kızılışımşek ve ark., 2016).

Bir başka cins olarak Bacillus cinsi bakteriler ise selektif anaerobik davranabilen bakterilerdir. Bu da her ne kadar sıkıştırılsa bile silajda tehdit oluşturabilir. Hayvan gübrelemesi yapılmış yerlerden temin edilen silaj bitkilerinde sayılarının katlarca fazla olduğu bildirilmiştir (Kızılışımşek ve ark., 2016).

Clostridium cinsi bakteriler ise anaerobik olduğu için sıkıştırılmış silajda tehdit olabilmektedir. Protein ve karbonhidratları fermente ederek kullanırlar (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002; Kızılışımşek ve ark., 2016). Karbonhidrat fermentasyonunda asetik ve bütirik asit yanında, protein fermentasyonunda NH₃, etil alkol, izobütirik asit, isovalerik asit gibi ürünleri oluştururlar. Asidite olarak pH 5 altında faaliyetleri durur. Ancak bu pH altında çalışabilen tek tür *C. tyrobutyricum* 'dur (Kızılışımşek ve ark., 2016).

2.10.2. Silajda Listeria

Yüksek su aktivitesine sahip bir hayvan yemi olan silajın, kullanıldıkları hayvanlarda Listeria enfeksiyonu oluşumuna neden olabildiği çok sayıda çalışma ile bildirilmiştir. Hayvanlarda oluşan enfeksiyonların çoğunda sebep olarak kontamine silaj gözükmüş, bunların da büyük kısmında *L. monocytogenes* izole edilebilmiştir (Fenlon, 1986a; Fenlon, 1986b). Yapılan bir çalışmada yapay kontamine edilmiş silajlarda Listeriaların 4-6 yıl canlı kalabildiği tespit edilmiştir (Dikta, 1971). Silaj yüzeyinde şekillenmiş küflü bölgelerin atılması ile de hayvanlara Listeria kontaminasyonunun büyük ölçüde azaltılabileceği de bildirilmiştir (Fenlon, 1999).

Düşük kaliteli silajlarda Listeria varlıkları gösterilmiştir. Bir çalışmada pH 4'den düşük silaj örneklerinin % 22' sinden, pH 4-5 aralığındaki silaj örneklerinin % 37' sinden, pH 5'den yukarı olan silajların ise % 56'sından *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Grønstøl, 1979). Bir başka çalışmada koyun ve keçi hayvanlarının yedikleri silaj ile beyin izolatların arasında moleküler ilişki ortaya konmuştur (Wiedmann ve ark., 1994; Wiedmann ve ark., 1996).

Silajlarda *Clostridium* cinsi bakteriler yanında istenmeyen bakteriler olarak bir diğeri de Listeria cinsi bakterilerilerdir (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002). Seçici anaerobik davranırlar. Ancak bu cins bakterilerin görülmesi genellikle aerobik bozulma süreci ile

ilişkilidir (Kızılışımşek ve ark., 2016). Birçok türü söz konusu iken özellikle *L. monocytogenes*' in silaj ile ilişkili olduğu hayvanlarda menenjit, ensefalit, abort gibi enfektif olaylara sebep olduğu bildirilmiştir. Epidemiyolojik değer taşıması anlamında yapılan birçok çalışmada sebze, feçes ve toprakta bulunduğu da gösterilmiştir (McDonald, 1991). Bu tür bakteriler oksijen ve pH' nın 5,5 olduğu ortamlarda üreme şekillendirip tehdit oluşturmaktadır. Kuru maddenin yüksek olması ve çok geniş sıcaklık arasında üreyebilmesi bu bakteri için fırsat şekillendirmektedir (Basmacıoğlu ve Ergül, 2002). Ancak pH' nın 4,4 altına düştüğü ortamlarda gelişemedikleri de bildirilmiştir (Kızılışımşek ve ark., 2016).

2.11. Kültürel İzolasyon Metotları

2.11.1. ISO 11290

International Organization for Standardization' da ISO tanımlanmış 11290 metodunda *L. monocytogenes*' in tespiti iki zenginleştirme ile başlamaktadır. Fraser sıvı besi yerlerinin kullanıldığı zenginleştirmelerde, ilk zenginleştirme yarım kuvvetli Fraser sıvı besi yerinde olup, 30 °C' de 24 saat olarak gerçekleştirilir. İkinci zenginleştirme ilk zenginleştirme sonrası tam kuvvetli Fraser sıvı besi yerinde gerçekleştirilir ve inkübasyonu 37 °C' de 48 saat olarak uygulanır. Süre sonunda sıvı besi yerinden Oxford veya PALCAM (Polymyxin-Acriflavin-Lithium chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol) katı besi yerine geçilir ve bu pleytler 37 °C' de 48 saat inkübe edilir. Süre sonunda *Listeria şüpheli* olarak görülen siyah, ortası çukur kolonilerin varlığına bakılır. Elde edilen izolatların biyokimyasal analizleri ile test sonlandırılır (ISO, 2016)

Fraser sıvı besi yerinde selektif olması amacıyla nalidiksik asit ve akriflavin yanında β -galaktosidaz aktivitesi için eskülin mevcuttur. Eskülin kullanıldığı bir ortamda sıvı besi yerinin rengi koyu bir renk alır (Ryser ve Marth, 2007k).

Sonradan güncellenmesi ile kullanılan katı besi yerlerine Oxford, PALCAM yanında kromojenik selektif bir katı besi yeri olan ALOA (Agar *Listeria Ottavani-Agosti*) katı besi yerinin de ISO metodunda kullanılabileceği belirtilmiştir (Engelhardt ve ark., 2016).

2.11.2. USDA-FSIS

Tek zenginleştirme olarak başlayan bu metotta farklı olarak zenginleştirme sıvı besi yerleri UVM (University of Vermont Medium) olarak kullanılır. Bu sıvı besi yerinde

inkübasyon 30 °C’ de 24 saat olarak gerçekleşir. Süre sonunda MOX (Modifiye Oxford) katı besi yerine geçilir ve 35 °C’ de 24-48 saat inkübe edilir. Süre sonunda tipik, koyu renkli, eskülini pozitif, çukur koloniler şüpheli değerlendirilir ve diğer biyokimyasal testlerle identifikasyonu yapılır. Yapılan tüm analizleri sonrası geçen süre 7 gündür. Ancak son güncellenen hali ile ikinci gün bir ekimin UVM sıvı besi yerinden, diğer bir ekimin de MOPS-BLEB (MOPS- Buffered Listeria Enrichment Broth) sıvı besi yerinden yapılması getirilmiştir. Dolayısıyla aynı anda, iki taraftan analizin yapılması şeklinde bir analiz akışı oluşturulmuştur. Söz konusu bu diğer analiz akışında 35 °C’ de 18-24 saat şeklinde yapılan MOPS-BLEB zenginleştirilmesi sonrası bir PCR metodu olan BAX-PCR devreye alınmış, bunun pozitif çıkması sonrası MOX katı besi yerine ekim getirilmiştir. Bu diğer analiz akışında da süre 7 gündür (USDA-FSIS, 2017).

2.11.3. FDA-BAM

Bu metotta zenginleştirme BLEB (Buffered Listeria Enrichment Broth) sıvı besi yerinde yapılır. Diğerlerinden farklı olarak bu sıvı besi yerine aynı zamanda piruvat ilavesi yapılır. Selektif özelliği sağlayan akriflavin, sikloheksimid ve nalidiksik asit içeren bu sıvı besi yerinde inkübasyon 30 °C’ de 24-48 saat olarak yapılır. Süre sonunda katı besi yeri olarak PALCAM, Oxford, MOX katı besi yerlerinde 35 °C’ de 24 saat inkübe edilir. Görülen şüpheli koloniler identifikasyon için diğer testlere (Gram boyama, motilite, katalaz, hemoliz ve karbonhidrat – dektroz, ksiloz, ramnoz, mannitol, maltoz-testleri) alınarak identifiye edilir (FDA-BAM, 2017).

2.11.4. Moleküler Metotlar

PCR analiz yöntemi bugün moleküler analizlerin büyük kısmını oluşturan teşhis yöntemlerinden biridir. Söz konusu analiz metodu ile *Listeria* türlerine ait spesifik gen üzerinden identifikasyon yanında, elde edilen izolatların serotiplendirilmesi ve virulens analizleri de bugün hızlıca yapılabilmektedir (Jadhav ve ark., 2012). Uygulanan çoklu primer setleri aynı anda birden fazla virulens genleri yanında, bir gıda örneğinde birden fazla gıda patojeni de aynı anda bakılabilmektedir (Mukhopadhyay ve Mukhopadhyay, 2007; Kawasaki ve ark., 2011).

Moleküler metotlardan Real-Time PCR ise PCR metodundan daha hızlı, spesifite ve sensitivite olarak daha yüksek olan bir analiz metodudur. PCR analizinden farklı olarak kullanılan primer setleri yanında prob kullanılır. PCR analizi sırasında

uygulanan sıcaklık değişimleri yoluyla problemlerin bağlanması ile verdiği floresan bir reaksiyon olarak tanımlanabilir (Saunders, 2004). Bugün gerek tekli, gerekse çoklu primer setleri çok sayıda Listeria analizi Real Time PCR analiz metodu ile yapılmıştır (Jadhav ve ark., 2012).

2.11.5. İmmünolojik Tiplendirme

Serotiplendirme Listeria gibi hücre yapılarındaki somatik ve flagella yapılarına karşı spesifik olarak hazırlanmış antikorlar ile yapılan tiplendirme türüdür. Listeria türü bakterilerin yapılarında O somatik ve H flagella antijenlerinin varlığının araştırılması, elde edilen sonuçlar ile serotip türünün tespitinin ana ilkesini oluşturur. Ancak deneyimli kişiler ile analizi mecbur kılması, analizde kullanılan antikorların çok kaliteli yapılmasının elzem olması, zaman zaman yanlış sonuç verebilmesi anlamında spesifite ve sensitivite problemleri bu analiz metodundaki zorlukları oluşturmaktadır (Palumbo ve ark., 2003). Multipleks PCR ile karşılaştırmaları yapılmış ve hatalı sonuç verebildikleri ortaya konmuştur (Liu, 2006).

Faj tiplendirmede ise bakteriyofajlar kullanılır. Bakteriyofajlar bakterilerde konakçı olarak yaşayan ve sonrasında onları parçalayabilen virüslerdir (Clokie ve Kropinski, 2009). Listeria kontaminasyon kaynaklarının izlenmesinde yardımcı olmuştur (Strydom ve Witthuhn, 2015). Uygulanmasında sınırlılık mevcuttur ve dikkat çekici bir sayıda Listeria izolatlarını tiplendirmede başarısız olabilmektedir (Jadhav ve ark., 2012).

2.11.6. Kütleli Spektrometrik İdentifikasyon

Bir kütleli spektrometrik identifikasyon metodu olan MALDI-TOF analiz metodunda patojenin protein yapılarının kütle spektrometresinde iyonizasyonu ve ölçülen değerlere göre oluşan spektraların grafik görüntülerinin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre identifikasyon yapılmaktadır. Kütle spektrometre (MS) temeline dayanır. Analiz süresi kısa olup, 1-2 saattir (Lay, 2001). *L. monocytogenes* üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur (Jadhav ve ark., 2012; Loff ve ark., 2014).

2.11.7. Moleküler Tiplendirme

Ribotiplendirmede, bakterinin total genomik DNA'sı bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmanlara parçalanır. Ayrılan fragmentler Southern Blot metodu ile jel elektroforeziyle birbirinden ayrılır. Metotta fragmanlar jelden bir membrana transfer edilir ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine

spesifik işaretlenmiş bir proba hibridizasyon uygulanır. Hibridizasyondan sonrası fragmanları göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde prob işaretlerine bakılır. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması yapılır (Bouchet ve ark., 2008). *L. monocytogenes* üzerine yapılmış çalışmalar vardır ve bazı çalışmalarda insan ve gıda izolatların arasındaki ilişki bu metotla gösterilmiştir (Lukinmaa ve ark., 2004; Meloni ve ark., 2009) PFGE ile karşılaştırılmış ve bu metoda karşı başarısız olduğu ispatlanmıştır (Louie ve ark., 1996).

Diğer bir moleküler tiplendirme metodu olan RAPD yönteminde ise temel prensip, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilen, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, bağlanma sıcaklığı düşük tutulmuş şartlarda rastgele bağlanarak PCR ile çoğaltmasıdır. PCR ile elde edilen ürün radyoaktif özellik göstermeyen elektroforezde yürütülüp, çoğaltma ürünlerinin şekillendiği bantlar gözlemlenir (Power, 1996). Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada kullanılmıştır.

RFLP'de DNA'nın restriksiyon enzimleri kullanılarak farklı büyüklüklerde fragmanlara ayrılması prensibine dayanır. Söz konusu enzimler DNA üzerinde 5-10 baz büyüklüğünde belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak kesme işlemi yapar. Elde edilen elektroforezde yürütülerek karşılaştırma yapılır. Bugün itibarıyla restriksiyon işleminde kullanılan 200'den fazla bakteriden elde edilmiş enzim vardır (Biyologlar, 2017).

AFLP analiz metodunda RFLP tekniğinin kesme-tanıma kısımları PCR ile çoğaltılarak yapılan DNA markır analizi yapılır. RAPD ile RFLP tekniklerinin birleştirilmiş olduğu bir metottur. RAPD tekniğinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için yapılmıştır (Vos ve ark., 1995). *L. monocytogenes* için ilk olarak 2003 yılında uygulanmıştır (Keto-Timonen, Autio ve Korkeala, 2003).

Bakterilerde kromozomal DNA polimorfizmine dayalı ve tüm genomu hedef alan genotiplendirme bir diğer metot Pulsed-field jel elektroforez (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) yöntemidir. Pulsed-field jel elektroforez büyük DNA moleküllerinin elektroforez ile ayrıştırılması işlemidir. Bu yöntemde jele vuruşlu, dalgalı ve dikey elektrik alanları uygulanır. DNA molekülü ne kadar büyükse tekrar yönelmesi o kadar uzun zaman alır. Bu şekilde büyüklüklerine göre ayrılırlar. Fragmentlere ayrılmasında restriksiyon enzimleri kullanılır. İzolatlara uygulanarak elde edilen profiller arasında benzerliğe bakılarak aralarındaki ilişki ortaya çıkarılır. Bugün pek çok mikroorganizmanın tiplendirilmesinde altın test kabul edilmektedir (Herschleb ve ark.,

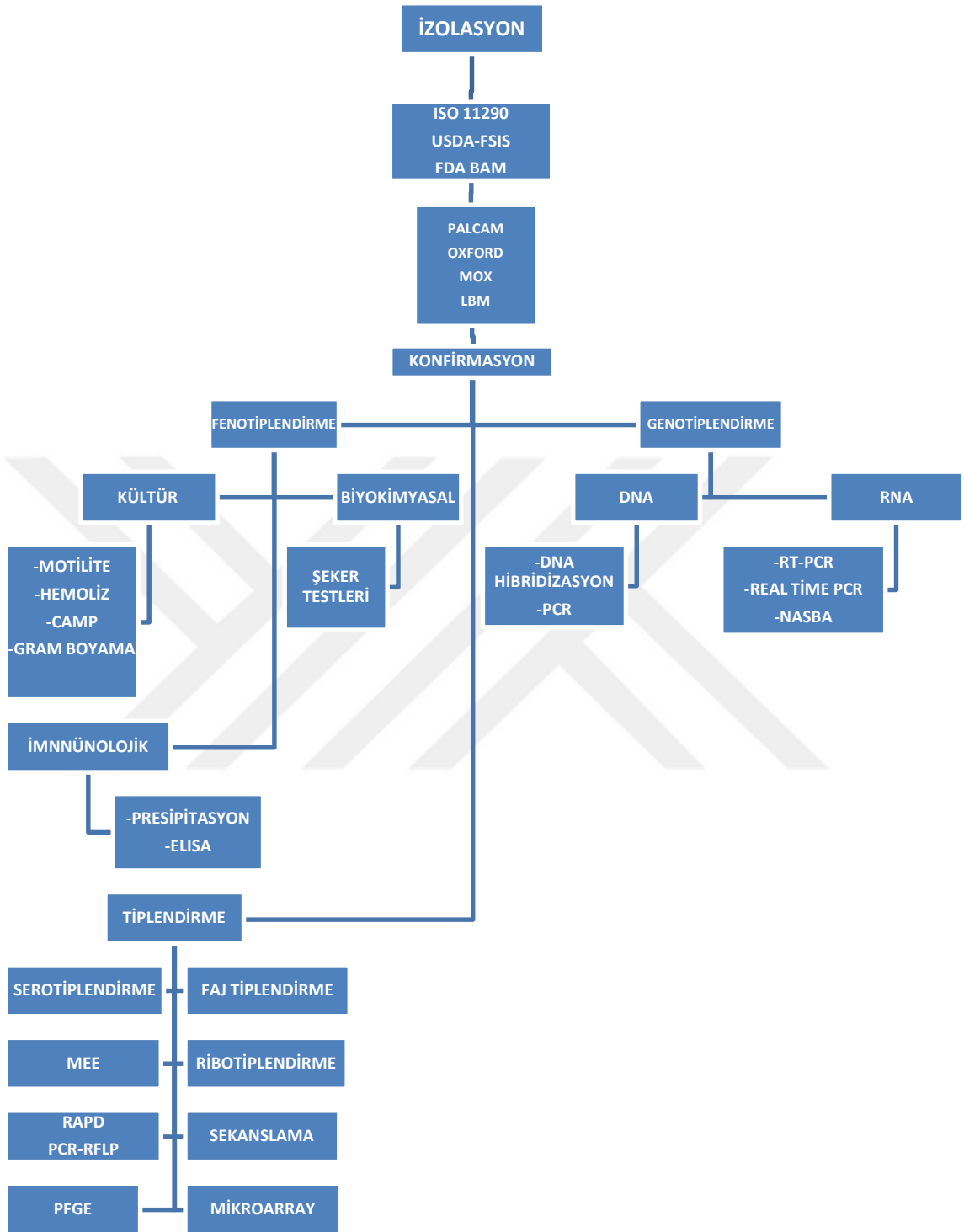
2007). *L. monocytogenes*' de kullanılmış çalışmalar vardır. Klinik, gıda, hayvan ve çevre izolatlarına uygulanarak epidemiyolojik ilişki çıkarma anlamında çalışmalar mevcuttur (Fox ve ark., 2012).

2.11.8. Antikor Destekli Analiz Metotları

ELISA analizi, gıda analizlerinde kullanılmış immünolojik analizlerdendir. Mikropleyt gözlerinde gıdada aranacak patojene karşı spesifik antikorlar ile aranan patojen kompleks edilir. Komplekse yeniden bağlanması için bu antikora spesifik hazırlanmış konjugat eklenir. Elde edilen reaksiyon vereceği floresan değerin okunması için cihaza verilir ve analiz sonucu okunur (Ma ve ark., 2006). *Listeria* analizlerinde de kullanılmış bir metottur. *L. monocytogenes*' in gıdalarda tespiti (Portanti ve ark., 2011) ve serotiplendirme için uygulanmıştır (Palumbo ve ark., 2000; Gorski, 2014).

Diğer antikor destekli analiz metodu olan immunomanyetik separasyonda ise antikor ile kaplanmış manyetik özellikli metal partiküllerinin analizde incelenecek antijen özellikteki bakteri ile karşılaştırılması, 1 saat kadar beklenmesi ve antijen-antikor kompleksi sonrası bu manyetik özellikteki partiküllerin oluşturulan manyetik alanla analiz edilen sıvıdan ayrılması işlemi olarak tanımlanabilir (Hoepener ve ark., 2012). PCR ile kombine edilmiş çok sayıda *L. monocytogenes* çalışması yapılmıştır (Yang ve ark., 2007; Duodu ve ark., 2009).

Günümüzde *L. monocytogenes*' in farklı analiz metotları ile izolasyon ve identifikasyonlarını gösteren şema şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. *L. monocytogenes*' in farklı analiz metotları ile izolasyonu ve identifikasyonu (Gasnov'dan., 2005)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılacak materyaller Orta Karadeniz Bölgesinin bazı illerinde (Samsun,4 işletmeden; Amasya, 1 işletmeden; Tokat, 1 işletmeden) bulunan 6 adet süt sığır işletmesinden temin edilmiştir.

Bu tez çalışmasında Ağustos-2015 ve Temmuz-2016 tarihleri arasında Orta Karadeniz Bölgesine ait Samsun (4 işletme), Amasya (1 işletme) ve Tokat (1 işletme) illerinde bulunan 6 adet süt sığır işletmesinden; hazırlanması sırasında silaj yemi (18 adet) ve olgunlaştırılması sonrası silajların hayvanlara verildiği dönemde silaj (36 adet), silaj suyu (36 adet), fekal örnek (36 adet), meme yıkantısı (36 adet), süt (36 adet), süt tankında (36 adet) *L. monocytogenes* varlığının araştırılması amacıyla toplam 234 örnek materyal olarak kullanıldı. Örnekler, işletmeler arasında kontaminasyon riskini en aza indirmek için birbirine yakın olmayan işletmelerden alındı.

3.1.1. Silaj Yeminin Hazırlanması Sırasındaki Örneklemeler

Silaj örnekleri, silajın yapılacağı silajlık mısırdan (0.günde) 6 örnek, üstü kapatılmış olan silaj havuzunun ise 15. ve 30. günlerinde silaj sularından 12 örnek olmak üzere toplam 18 örnek temin edildi örnekler temin edildi (Tablo 11).

Tablo 11. Silaj yeminin hazırlanması sırasındaki örneklemeler

Örnek	0 .gün	15.gün	30.gün	Toplam
Silajlık Mısır	6 işletme	-	-	6 örnek
Silaj Suyu	-	6 işletme	6 işletme	12 örnek
				18 örnek

Silajlık mısır örnekleri iki ayrı torbada, yığının farklı bölgelerinden olmak üzere seçilerek 10 kg olarak, olgunlaşma sırasında oluşan silaj suları ise farklı noktalardan olmak üzere silaj diplerinde birikmiş sulardan 100 mL olarak toplandı.

3.1.2.Olgunlaşmış Silajların Süt Sığırlarına Verilmeye Başladığı Günden Sonra Süt Sığır İşletmelerinden Yapılan Örneklemeler

Silaj yapım aşamalarının örneklemeleri bittikten sonra ikinci aşama örneklemeleri kapsamında Tablo 12'deki programa göre 6 adet süt işletmesinden (Samsun / Bafra 4; Amasya 1; Tokat 1) örnekleme yapıldı. Örnekleme iki dönem ve her dönem üçer ay olmak kış ve yaz döneminde yapıldı. Her işletmeden 6 çeşit örnek (silaj, silaj suyu, fekal örnek, meme yıkantı suyu, süt ve süt tankı) alındı (Tablo 12).

Silaj örnekleri iki ayrı torbada, yığının farklı bölgelerinden olmak üzere seçilerek 10 kg olarak alındı.

Silaj suları ise farklı noktalardan olmak üzere silaj diplerinde birikmiş sulardan 100 mL olarak toplandı, pH değerleri ölçüldü.

Mevsimsel şartlara bağlı olarak silaj sularının çok azaldığı zamanlarda silaj sularını almak için silajların zemine yakın noktalarına birden fazla olmak üzere steril pamuk yerleştirildi, absorbe edilmesi sağlanarak silaj sularının örneklenmesi yapıldı. Silaj sularını absorbe eden steril pamuklar steril torbalar ile transfer edildi.

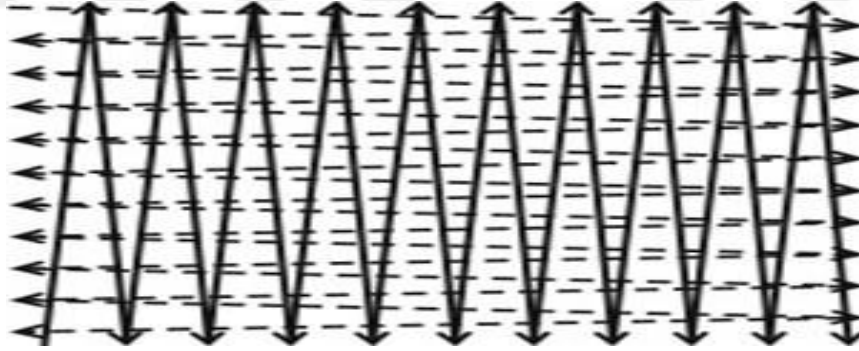
Fekal örnekleme bir işletme sahasının birçok noktasından ve 1 kg'dan az olmamak üzere gerçekleştirildi. Steril torba içinde getirilen fekal örnekler iyice karıştırılarak homojenize edildi.

Meme yıkantısı örnekleri sağımın hemen öncesinde steril FTS (Fizyolojik Tuzlu Su) emdirilmiş steril bezlerle, süt örnekleri ise beş ayrı inekten 100 mL olacak şekilde steril tek kullanımlık tüpler ile alındı.

Tablo 12. Olgunlaşmış silajların süt sığırlarına verilmeye başladığı günden sonra süt sığır işletmelerinden yapılan kış ve yaz dönemi örnekleme

ANALİZ ÖRNEKLERİ	KIŞ DÖNEMİ			YAZ DÖNEMİ			TOPLAM ÖRNEK
	Aralık	Ocak	Şubat	Mayıs	Haziran	Temmuz	
Silaj	6 İşletme	X 3 Ay		6 İşletme	X 3 Ay		36
Silaj Suyu	6 İşletme	X 3 Ay		6 İşletme	X 3 Ay		36
Fekal örnek	6 İşletme	X 3 Ay		6 İşletme	X 3 Ay		36
Meme Yıkantısı	6 İşletme	X 3 Ay		6 İşletme	X 3 Ay		36
Süt	6 İşletme	X 3 Ay		6 İşletme	X 3 Ay		36
Süt Tankı	6 İşletme	X 3 Ay		6 İşletme	X 3 Ay		36
TOPLAM							216

Süt tankı örnekleri ise steril FTS emdirilmiş steril bezlerle alındı. Steril bezler ile tank çeperleri dikkatlice ve alanı 900-1000 cm²'den az olmamak üzere Şekil 5'de gösterildiği gibi biyofilm tabaka elde edilecek şekilde silindi.



Şekil 5. Süt tanklarının steril bezlerle silinme şekli (Nicolau ve Bolocan'dan, 2014)

Alınan örnekler analiz edilmek üzere soğuk zincirde laboratuvara getirildi ve analize alındı.

3.2. Metot

L. monocytogenes' in varlığının araştırılmasında süt ve süt tankından alınan örneklerde ISO 11290-1, yüksek kontaminasyonlu olan çevresel örneklerde ise daha başarılı olduğu düşünülen USDA-FSIS analiz protokolleri kullanılmıştır.

Çalışma iki analiz metodunun (ISO 11290-1 ve USDA-FSIS) 6-7 gün gibi uzun analiz süresini minimum 3 güne düşürecek “Modifiye Analiz Metodu”nun oluşturulmasını ve bu iki analiz metotları ile karşılaştırılmasını amaçlamıştır.

USDA-FSIS analiz metodu yanında uygulanan “Modifiye USDA-FSIS” analiz metodunda *L. monocytogenes*, ilk iki aşama olan zenginleştirmelerle; Şekil 8’ de gösterilmiş olan ISO 11290-1 analiz metodunda ise ilk iki aşama olan zenginleştirmeler “Modifiye ISO 11290-1” analiz metodu ile aynı şekilde gerçekleştirildi.

Her iki Modifiye Analiz Metodun ikinci basamak zenginleştirme sonrası RTi-PCR (Real Time PCR) ile sıvı besi yerlerinden *L. monocytogenes* varlığına bakılması, pozitif bulunan sıvı besi yeri örnekleri kromojenik selektif besi yerine (ALOA) pasaj edilmesi, bir gün inkübasyondan sonra haleli, mavi-yeşil ve opak yapıları tipik *L. monocytogenes* görüntüsü vermiş kolonilerin yalancı pozitif sonuç verebilen Listeria türlerinden ayrılması için multipleks PCR ile analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sürecinde konvansiyonel analiz metotları ile Modifiye Analiz metotlarının karşılaştırılması yapılmış, beraberinde *L. monocytogenes*’ in bulaşma noktalarının varlığı değerlendirilmiştir.

3.2.1. Analizde Kullanılan Besi Yeri ve Ayıraçlar

Brain Heart Brain Heart Infusion Broth

Dehidre besi yeri olan Brain Heart Infusion Broth (Oxoid CM1135) 37 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun olarak (2 ml, 5 mL, 10 mL) tüplere dağıtıldı ve otoklavda 121 °C’ de 15 dakika sterilize edildi.

MRD (Maximum Recovery Diluent) Sıvı Besi Yeri

Bunun için kullanılan Maximum Recovery Diluent (Merck 1.12535) bileşiminde Pepton 1,0 g/L; NaCl 8,5 g/L bulunan genel amaçlı bir seyreltme çözeltisidir. Bu dehidre sıvı besi yeri 9,5 g/L şeklinde distile suda çözüldü ve dilüsyonu yapılacak tüplere 5’er mL olarak dağıtıldı. Otoklavda 121 °C’ de 15 dakika sterilize edildi. Kullanıma hazır hali berrak ve renksiz olan çözeltinin 1 ay içinde kullanılmasına dikkat edildi.

ALOA Katı Besi Yeri Hazırlanması

Chromocult® Listeria Enrichment Agar (Merck 1.00427)' dan 35 g 476 mL distile suda eritildi. Sonra kaynar su banyosunda 20-35 dakika sık sık karıştırıldı. Süre sonunda 48-50 °C'ye soğutuldu. Ardından 4 mL 1:1 su/etanol karışımında eritilmiş Chromocult® Listeria Agar Selective Supplement (Merck 1.00432) ve sıcaklığı 48-50 °C'ye getirilmiş ikinci katkı Chromocult® Listeria Agar Enrichment Supplement (Merck 1.00439) aseptik olarak besi yerine ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Karışan besi yeri steril kabinde her petriye 16-18 mL olmak üzere döküldü ve 2-8 °C' de en fazla dört hafta içinde kullanılmasında dikkat edildi.

PALCAM Katı Besi Yeri ve Hazırlanması

Yapısında pepton 23 g/L; maya ekstraktı 3 g/L; nişasta 1 g/L; NaCl 5 g/L; agar 13 g/L; D(-) mannitol 10 g/L; amonyum demir (III) sitrat 0,5 g/L; eskülin 0,8 g/L; glikoz 0,5 g/L; LiCl 15 g/L; fenol kırmızısı 0,08 g/L bulunur.

PALCAM Agar (Merck 1.11755) dehidre besi yerinin 35,9 g'ı 500 mL distile su içinde çözüldü ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Süre sonunda katı besi yeri 45 °C' ye soğutuldu ve üzerine 1 mL steril distile su içinde çözülmüş ve içinde her bir şişesi polimiksin B sülfat 5,0 mg; seftazidim 10 mg ve akriflavin 2,5 mg içeren 1 şişe selektif katkı (PALCAM Listeria Selective Supplement; Merck 1.12122) ilave edildi. İyice homojenize edilen besi yeri aseptik olarak petrilere döküldü. Hazırlanan berrak ve kırmızı renkli besi yerinin iki hafta içinde kullanılmasına dikkat edildi. Ekimlerde *L. monocytogenes*' in bu besi yerinde 1,5–2 mm çapında zeytin yeşili–gri renkli, çevresi siyah ve bazen siyah merkezli koloni oluşturmasına dikkat edildi.

UVM Zenginleştirme Sıvı Besi Yerinin Hazırlanması

Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid CM 0863) UVM formülasyonlu sıvı besi yeri hazırlanmasında kullanıldı. Buna göre litre başına proteoz pepton 5,0 g; tripton 5,0 g; Lab-Lemco 5,0 g; maya ekstraktı 5,0 g; NaCl 20 g; disodyum hidrojen fosfat 12 g içeren dehidre besi yerinden 54,4 g tartıldı ve distile su 1000 mL'ye tamamlandı. İyice çözülerek 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edildi.

USDA-FSIS protokolü için mikrobiyolojik ekimden hemen önce eklenen katkı, 225 mL UVM sıvı besi yeri için 1 mL idi. Burada 225 mL için 4,5 mg nalidiksik asit. 2,7 mg akriflavin içeren Listeria Primary Selective Enrichment Supplement (Oxoid SR 0142)

kullanıldı. Bunun için üretici firmanın talimatı doğrultusunda katkı 2250 mL için ayarlanmış her flakona 10 mL steril distile su eklendi ve iyice içerik eritildi. Eritilen içerik aseptik olarak mikrobiyolojik ekimden hemen önce her 225 mL UVM sıvı besi yerine 1 mL olarak eklendi ve sıvı besi yeri iyice homojenize edildi.

MOPS Buffered Listeria Enrichment Broth Sıvı Besiyeri ve Hazırlanması

Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB) sıvı besi yeri enzimatik işlenmiş kazein 17 g/L; enzimatik işlenmiş soya 3 g/L; maya ekstraktı 6 g / L; dekstroz 25 g/L; NaCl 5 g/L; monopotasyum fosfat 135 g/L; dipotasyum fosfat 25 g/L; disodyum fosfat 96 g/L; akriflavin HCl, 45 mg/L; nalidiksik asit, 18 mg / L; sikloheksimid, 225 mg/L içerir.

MOPS-BLEB sıvı besi yeri hazırlamak için; dehidre 47 g Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Acumedia-Neogen 7675), 6,7 g MOPS -3-(N-Morfolino) propanesülfonik asit sodyum tuzu- (Sigma M1254) ve 10,5 g MOPS sodyum tuzu (Sigma M9381) distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı ve iyice karıştırıldı. Karışım 10'ar mL olarak tüplere dağıtıldı ve tüpler 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilip kullanıma hazır hale getirildi.

Oxford Selektif Katı Besi Yeri ve Hazırlanması

Oxford katı besi yerinin hazırlanması için Oxford Listeria Selective Agar (Merck 1.07004) kullanıldı. İçeriğinde pepton 23 g/L; nişasta 1 g/L; NaCl 5 g/L; agar 13 g/L; eskülin 1 g/L; amonyum demir (III) sitrat 0,5 g/L; lityum klorür 15 g/L bulunur. Dehidre besi yerinin 29,25 g'ı 500 mL'ye distile su tamamlandı. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sonrası 45 °C' ye soğutulup üzerine aseptik olarak 5 mL, 1 : 1 oranında hazırlanmış steril distile su :etanol karışımı içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı olarak Oxford Listeria Selective Supplement (Merck 1.07006) eklendi. Homojenize edilip petrilere dağıtıldı. Buzdolabında 2-8 °C' de 2 haftaya kadar saklanarak kullanıldı. Mikrobiyolojik ekimlerde *L. monocytogenes*' in bu besi yerinde 2–3 mm çapında siyahımsı yeşil kahverengi siyah zonlu çökük merkezli koloni oluşmasına dikkat edildi. Eklenen katkı olarak Oxford Listeria Selective Supplement (Merck 1.07006), bir flakonunda sikloheksimid 200 mg; kolistin sülfat 10,0 mg; akriflavin 2,5 mg; sefotetan 1 mg ve fosfomisin 5 mg içermektedir.

Fraser Sıvı Besi Yeri ve Hazırlanması

Dehidre besi yeri olan Fraser Listeria Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398) 55 g/L olacak şekilde distile suda çözüldü. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Mikrobiyoloji ekime kadar 2-8 °C' de saklandı 2 ay içinde kullanılmasına dikkat edildi. Hazırlanmış besi yerinin rengi sarımsı kahverengi, hemen hemen berraktır.

Yarım kuvvet Fraser sıvı besi yeri için 225 mL sıvı besi yerine oda sıcaklığında her ikisi de 1'er mL steril distile su içinde çözülmüş olarak 1 şişe amonyum sitrat, Fraser Listeria Ammonium Iron-3 Supplement (Merck 1.00092) ve 1 şişe selektif ilavelerinden (Fraser Listeria Selective Supplement; Merck 1.00093) 225'er µL ekimden hemen önce eklendi, iyice karıştırıldı ve inkübasyona hazır getirildi.

Tam kuvvet Fraser sıvı besi yeri için ise; sterilize edilmiş her 10 mL Fraser Broth her ikisi de 1'er mL steril distile su içinde çözülmüş olarak 1 şişe amonyum sitrat (Fraser Listeria Ammonium Iron-3 Supplement; Merck 1.00092) katkısından 10 µL ve 1 şişe selektif katkısından (Fraser Listeria Selective Supplement (Merck 1.00093) ise 20'şer µL ekimden hemen önce eklendi, iyice karıştırıldı ve inkübasyona hazır getirildi.

Fraser Listeria Ammonium Iron-3 Supplement' in (Merck 1.00092) şişesinde 500 mg Amonyum demir (III) sitrat; Fraser Listeria Selective Supplement' in (Merck 1.00093) şişesinde ise akriflavin 12,5 mg ve nalidiksik asit 10 mg bulunur.

Modifiye Oxford (MOX) Katı Besi Yeri

Oxford katı besi yerinin hazırlanması için Oxford Listeria Selective Agar (Merck 1.07004) kullanıldı. Dehidre besi yerinin 29,25 g'ı 500 mL'ye distile su tamamlandı. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav sonrası 45 °C' ye soğutulup üzerine 10 mg Moksalaktam ve 5 mg Kolistin içerecek şekilde Modified Oxford Antimicrobial Supplement (BD-Difco 211763) katkısından ilave edildi, karıştırıldı ve petrilere dağıtıldı.

Koyun Kanlı Katı Besi Yeri

Dehidre besi yeri 40 g/L konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritildi ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav çıkışında 45-50 °C' ye soğutuldu, % 7 oranında defibrine koyun kanı ilave edildi, karıştırıldı ve petrilere 12,5'er mL olarak dağıtıldı.

TSA-YE (Tryptic Soy Agar-Yeast Extract)

30 g/L CASO (Casein soja) dehidre besi yeri (Merck 1.05459), 6 g/L maya ekstraktı (Merck 1.03753) ve 15 g/L agar (Merck 1.01613) olacak şekilde karışım hazırlandı. Karışım distile su içinde ısıtılarak eritildi ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edilip steril petrilere 12,5' er mL olacak şekilde dağıtıldı.

SIM (Sulfat-Indole-Motility) Besi Yeri

Dehidre besi yeri SIM medium (Merck 105470) 30 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak tam olarak eritildi. Besi yeri henüz sıvı halde iken, tüplere 4' er mL olarak dağıtılıp, 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav çıkışında besi yeri dik olarak soğumaya bırakılıp, besi yerinin katılaşması beklendi. Agar miktarının düşük olmasına bağlı olarak yarı katı formda olmasına dikkat edildi.

İndikatörlü Karbonhidrat Solüsyonlarının Hazırlanması

100 mL solüsyon için % 1 karbonhidrat olması için her bir karbonhidrattan (mannitol, D-ksiloz, L-ramnoz) 1 g ve beraberinde indikatör olarak 2 mg bromkrezol moru kullanıldı. Karıştırıldı, 5 mL olarak tüplere dağıtıldı. Tüpler 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi.

Oksidaz Testi

Oksidaz testi için hazır bir kit olan Dryslide Oxidase test kiti (BD 231746) kullanıldı.

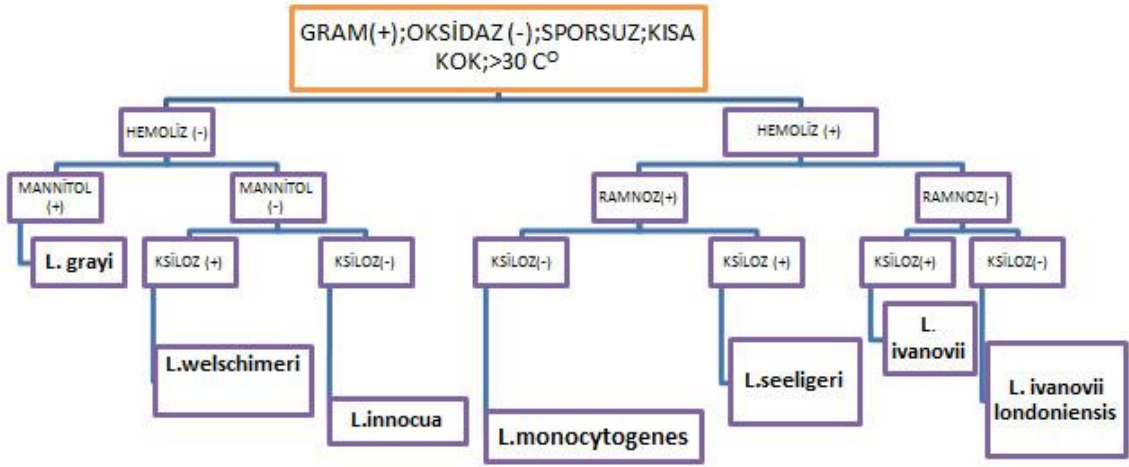
Katalaz Test Solüsyonu

Katalaz test solüsyonu hazırlanmasında hidrojen peroksit (Merck 107209) kullanıldı. Kullanmak için % 3'e seyreltildi.

3.2.2. Biyokimyasal Testler

İzole edilmiş *Listeria* şüpheli kolonilerin biyokimyasal testlerin Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' de tanımlandığı gibi yapıldı. Yapılan test olarak Gram boyama, oksidaz, katalaz, karbonhidrat, hareket ve CAMP testleri yanında karbonhidrat (ramnoz, mannitol, ksiloz) testleri gerçekleştirildi (De Vos ve ark., 2009). Test sonrası *Listeria* izolatları % 10 gliserin içeren Brain Heart sıvı besi yerinde - 80°C' de muhafaza edildi.

İdentifikasyon için testler Şekil 6'daki gibi gerçekleştirildi.



Şekil 6. Listeria identifikasyon tablosu (Gorski; 2008)

3.2.3. Çalışmada Kullanılan Referans Suşlar

Çalışmada kullanılan referans suşlar ve kullanıldıkları testler Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13. Çalışmada kullanılan referans suşlar, kodları ve kullanıldığı aşamaları

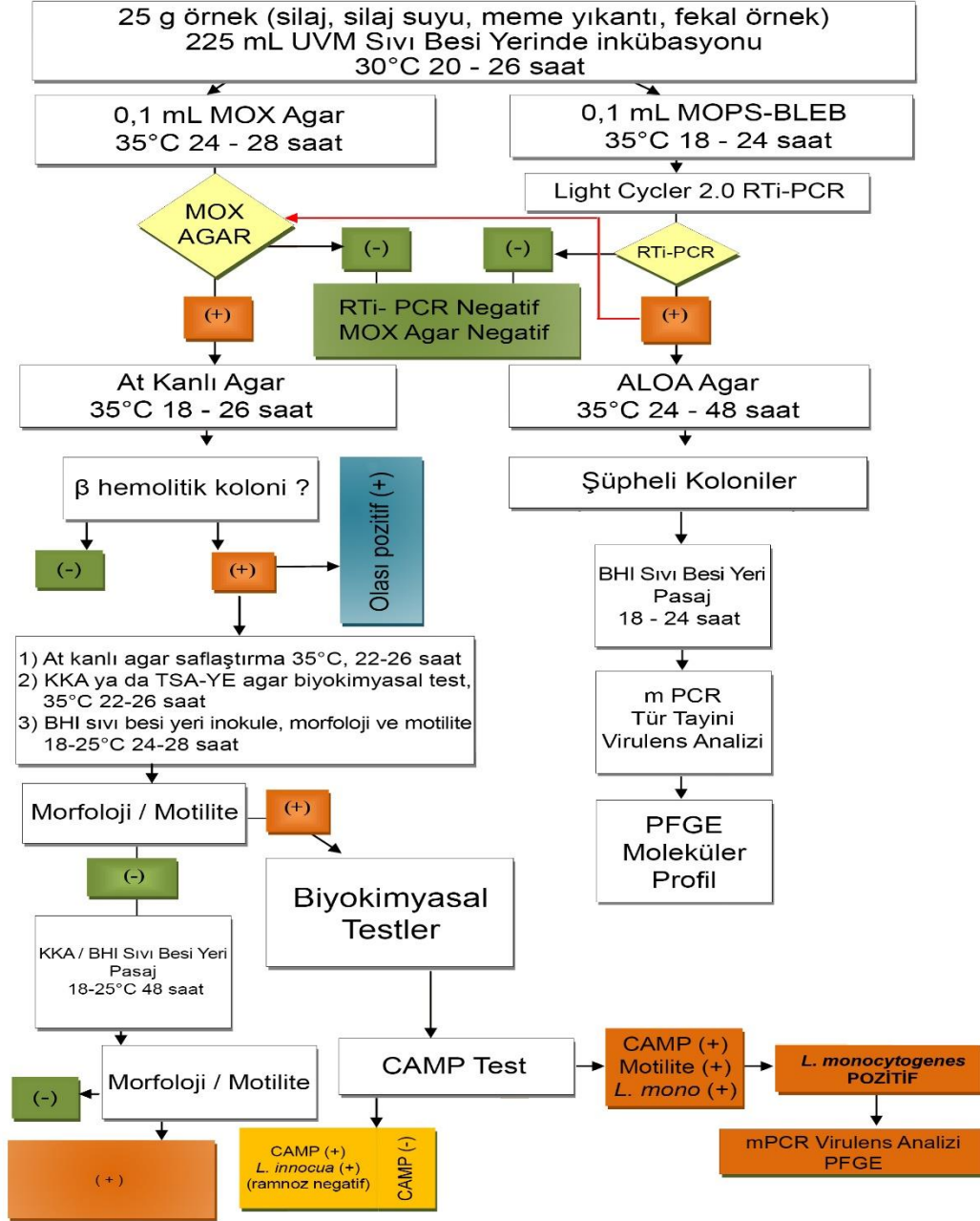
Referans suş	Kodu	Kullanıldığı testler
<i>S. aureus</i>	ATCC 2312	CAMP testi
<i>R. equi</i>	ATCC 6939	
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	Optimizasyon Multipleks PCR Real Time PCR Tüm analizlerde kontrol suşu
<i>L. grayi</i>	ATCC 25401	Optimizasyon Multipleks PCR Bazı analizlerde kontrol örneği
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	Optimizasyon Multipleks PCR Bazı analizlerde kontrol örneği
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	Optimizasyon Multipleks PCR Bazı analizlerde kontrol örneği
<i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897	Optimizasyon Multipleks PCR Bazı analizlerde kontrol örneği
<i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967	Optimizasyon Multipleks PCR Bazı analizlerde kontrol örneği

ATCC: American Type Culture Collection

3.2.4. Modifiye USDA-FSIS

USDA-FSIS analiz metodunun modifiye edilmiş şeklidir. Analizde 25 g örneğin 225 mL UVM sıvı besi yerinde 30 °C’ de 20-26 saat zenginleştirilmesi yapılır. Süre sonunda UVM sıvı besi yerinin 0,1 mL’ si 10 mL MOPS-BLEB sıvı besi yerine geçilir ve 35 °C’ de 18-24 saat inkübe edilir. Ardından MOPS-BLEB sıvı besi yerinin 1 mL’ si santrifüj edilerek çökeltisi Instagene Matrix ekstraksiyon kiti ile ekstrakte edilir. Elde edilen DNA ekstraksiyon örnekleri Real Time PCR ile analize alınır. Pozitif çıkan örnekler ALOA kromojenik katı besi yerine ekilir ve 37 °C’ de 24 saat inkübe edilir. Hale

görünümlü koloniler *L. monocytogenes* şüpheli değerlendirilerek tür ayrımı için multipleks PCR analizine alınır. Analiz akışı Şekil 7' nin sağ tarafındaki gibidir.



Şekil 7. Silaj, silaj suyu, fekal örnek ve meme yıkantı suyu örneklemelelerinde *L. monocytogenes* izolasyonu için kullanılan USDA-FSIS ve Modifiye USDA-FSIS Analiz Metotları (Modifiye USDA-FSIS Analiz Metodu sağ taraftadır)

3.2.5. ISO 11290-1

ISO 11290-1'de 25 mL süt rneği 225 mL yarım kuvvette Fraser sıvı besi yerine eklenir ve 30 °C' de 24 saat inkübe edilir. Ardından tam kuvvette Fraser sıvı besi yerine 0,1 mL pasajlanır. Tam kuvvette Fraser sıvı besiyerinin 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonunda bu sıvı besiyerinin 0,1 mL' si Oxford katı besi yerine (Merck 1.07004) ekilir ve 37 °C' de 24-48 saat inkübe edilir.

Ŗpheli remelere 24 saat sonra bakılır. Üreme olmadığında inkübasyon 48 saate uzatılır. Süre sonunda eskülin pozitif siyah *Listeria* spp. için tipik kolonilerden 5 adet seçilip TSA-YE katı besi yerine pasaj edilir. Ardından USDA-FSIS belirtildiği gibi identifikasyon yapılır. Analiz akıŖı Ŗekil 8'in sol tarafındaki gibidir.

3.2.6. Modifiye ISO 11290-1

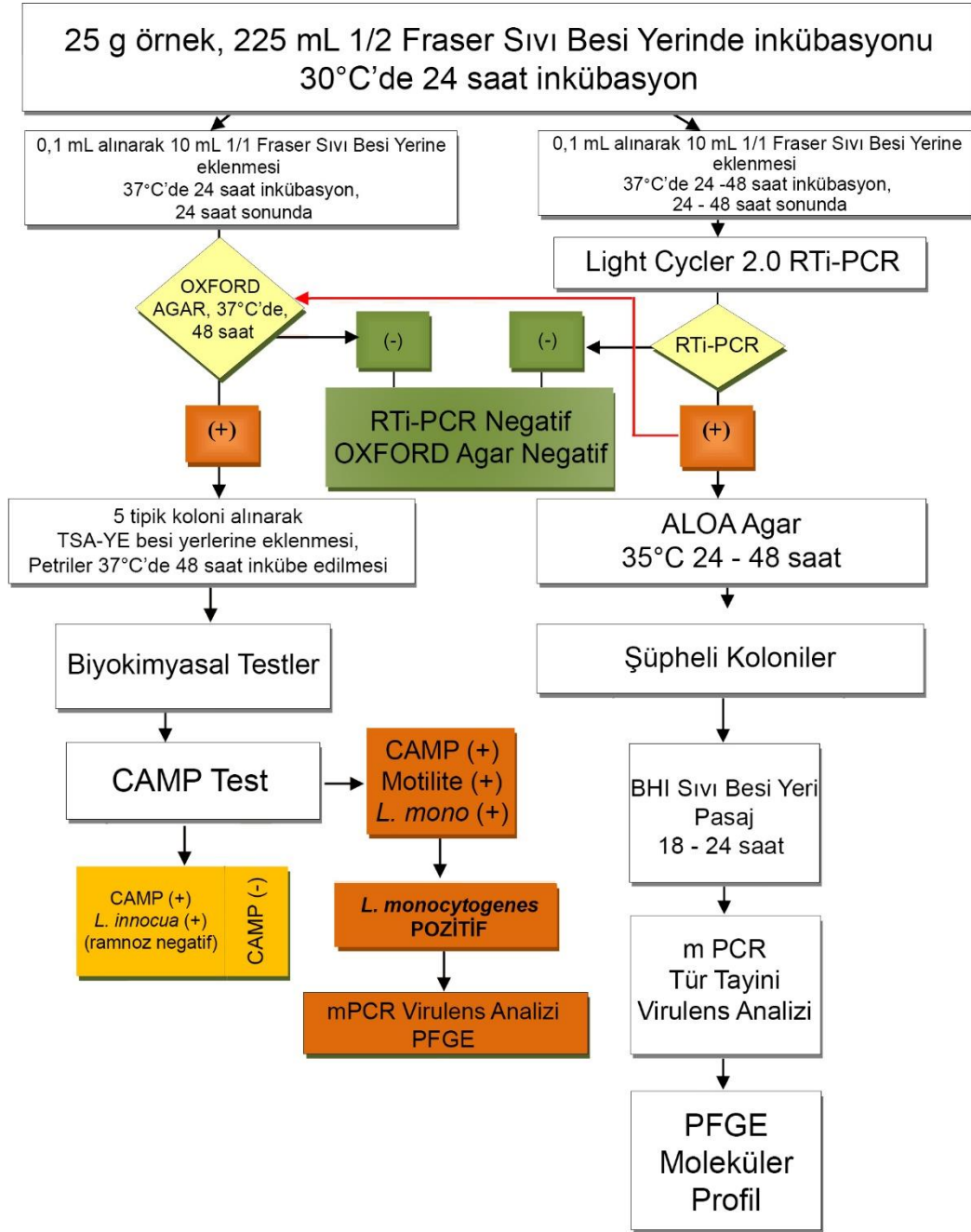
Bu modifiye analiz metodu için 25 mL örnek 225 mL yarım kuvvetli Fraser sıvı ilave edilir. 30 °C' de 24 saat inkübasyon sonrası 10 mL tam kuvvetli Fraser sıvı besi yerine pasajlanır. Ekim 37 °C' de 24-48 saat sonra RTi-PCR analizine alınır.

Bunun için tam kuvvetli Fraser sıvı besi yerinin 1 mL' si 8000 g santrifüj edilerek çökeltisi Instagene Matrix ekstraksiyon kiti ile ekstrakte edilir. Elde edilen DNA ekstraksiyon rnekleri Real Time PCR ile analize alınır. Pozitif çıkan rnekler ALOA kromojenik katı besi yerine ekilir ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilir. Hale görünümlü koloniler *L. monocytogenes* Ŗpheli değerlendirilerek tür ayırımı için multipleks PCR analizine alınır. Ŗayet RTi-PCR negatif ise analiz sonlandırılır. Analiz akıŖı Ŗekil 8' in sağ tarafındaki gibidir.

3.2.7. Analiz Metotlarının Optimizasyonu

Saha örneklemelerinin analizi öncesi metotlar referans suŖlar ile optimize edildi.

1. Referans kültür *L. monocytogenes*' in üretilmesi ve RTi-PCR ile analizi
2. Sütten *L. monocytogenes* izolasyonu ve RTi-PCR ile analizi
3. Silaj ve silaj suyundan *L. monocytogenes* izolasyonu ve RTi-PCR ile analizi
4. Fekal rneklerden *L. monocytogenes* izolasyonu ve RTi-PCR ile analizi
5. *Listeria* tür tayini için Multipleks PCR
6. *L. monocytogenes* virulens tayini için Multipleks PCR



Şekil 8. ISO 11290-1 ve Modifiye 11290-1 analiz akışı

Referans Kültür *L. monocytogenes*' in Üretilmesi ve RTi-PCR ile Analizi

Referans *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu Brain Heart Infusion Broth sıvı besiyerine ekildi, inkübasyon sonunda elde edilen bakteri süspansiyonu RTi-PCR ile analiz edildi.

Referans Kültür *L. monocytogenes*' in Üretilmesi

L. monocytogenes ATCC 7644 vialı üretici tavsiyelerine göre açıldı. Brain Heart Infusion sıvı besi yerine (Oxoid CM1135) ekildi. Besi yeri 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

Referans Bakteri Kültür Süspansiyonunun DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi ile yapıldı. Buna göre; *L. monocytogenes* üremiş 1 mL sıvı besi yeri 8000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz atıldı. Çökelti üzerine 200 µL steril distile su ilave edildi ve pipetle homojenize edildi. Homojenize süspansiyon 95-100 °C'de 900 devirde 10 dakika termal blokta tutuldu. Ardından bakteri süspansiyonu -20 °C'de 1 dakika bekletildi ve 12500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Bakteriler bu aşamadan sonra parçalanmış oldu. Elde edilen üst faz ile DNA eldesi sağlandı. Analiz için DNA Real Time PCR testi için hazır hale getirildi (Schmitt, 2017).

Listeria monocytogenes' in Real Time PCR ile Analizi

Elde edilen *L. monocytogenes* DNA'sı RTi-PCR ile analiz edildi (Rodríguez-Lázaro ve ark., 2004). Real Time PCR analizinde kullanılan hedef bölge, primer / prob, molarite ve primer dizisi değerleri Tablo 14'de gösterildi. Reaksiyon karışımı pozitif beraberinde negatif olmak üzere iki örnek yapıldı (Tablo 15). LightCycler® NanoRoche® (Roche-Almanya)' un mikrotüplerine eşit hacimde (18 µL) dağıtıldı. İlk aşamada elde edilen *L. monocytogenes*' in DNA'sı 2 µL karışıma ilave edildi. Real Time PCR cihazına yerleştirildi. Ana karışım üretici firmanın (Solis BioDyne) talimatları doğrultusunda sıcaklık ve süre değerleri 95 °C'de 15 dakika; 95 °C 15 sn ve 60 °C 60 sn'de 40 döngü olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 14. Real Time PCR analizinde kullanılan hedef bölge, primer-prob, molarite, primer dizisi

Hedef Bölge	Primer Prob	Molarite	Primer Dizisi
<i>hlyQ</i>	Forward Primer	50 nM	5'-CATGGCACCACCAGCATC T-3'
<i>hlyQ</i>	Reverse primer	50 nM	5'-ATCCGCGTGTTCTTTTCG A-3'
<i>hlyQP</i>	Taq-Man Prob	100nM	5'-FAM-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-TAMRA-3'

Tablo 15. *L. monocytogenes* RTi-PCR analizinde örnek için harcanan primer, prob, ana karışım, DNA, distile su değerleri

RTi-PCR karışımı	Molarite	Miktar/Örnek (µl)	Miktar /16 Örnek (µl)
<i>hlyQ</i> F primer	50 nM	0,6	9,6
<i>hlyQ</i> R primer	50 nM	0,6	9,6
<i>hlyQ</i> Prob	100 nM	0,2	3,2
Ana karışım	-	4	64
Distile Su (Nükleaz içermeyen)	-	12,6	201,6
DNA	-	2	
TOPLAM	-	18	288

Yapay Olarak Kontamine Edilmiş Sütün *L. monocytogenes* İzolasyonu ve RTi-PCR ile Analizi

Referans *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşu ile yapay olarak kontamine edilmiş 10 adet süt örneği ile kontamine edilmemiş 4 adet süt örneği ISO 11290-1 metodu ve Modifiye ISO 11290-1 metodu ile analiz edildi.

Yapay olarak kontaminasyon yapılmış süttten ISO 11290-1'in ilk iki basamaktaki zenginleştirmeleri yapıldı. Bunun için yarım ve tam kuvvette Fraser sıvı besi yerleri (Merck 1.10398) kullanıldı. Analizde kullanılan örnekler Tablo 16'da gösterilen "Kontrol örneklemeleri" başlığı altında açıklanmıştır.

Kontrol Örneklemeleri

Kontrol örneklerinin analizinde besi yeri olarak yarım kuvvette Fraser sıvı besi yeri kullanıldı. Analiz optimizasyonu için yapılan kontrol örnekleri Tablo 16'da gösterildiği gibi yapıldı.

Tablo 16. Optimizasyon için kontrol örnekleri

<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Negatif kontrol
Pozitif Kontrol	Negatif kontrol	
10 adet	4 adet	
<i>L. monocytogenes</i> pozitif	<i>L. monocytogenes</i> negatif	Su
25 mL süt	25 mL süt	
+	+	
225 mL Fraser sıvı besi yeri	225 mL Fraser sıvı besi yeri	Su
+		
<i>L. monocytogenes</i> kültürü		

MRD (Maximum Recovery Diluent) Sıvı Besi Yeri ile *L. monocytogenes* Kültür Standardizasyonu

Burada yapay kontaminasyonda kullanılacak 100 µL sıvı besi yerinde 10 kob değerinin dilüsyon değerini bulmak için MRD sıvı besi yerinde (Merck 1.12535) *L. monocytogenes* süspansiyonu homojenize edildi. Bakteri süspansiyonu 10 kat olarak yedinci tüpe kadar dilüsyonu yapıldı. Dilüsyonlarda 5. 6. ve 7. tüplerden ikişer adet olarak PALCAM katı besi yerine (Merck 1.11755) 100 µL yayma yöntemi ile ekildi ve 37 °C' de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda *L. monocytogenes* üremiş bakteri kolonileri sayıldı. Hesaplama ile 10⁻⁷ dilüsyonu 100 µL'inde 10 kob değeri olduğu tespit edildi.

ISO 11290-1 metoduna göre 10⁻⁷ dilüsyonundan analiz yapmak için sayım sonrası analize uygun ve hazır olan 100 µL MRD *L. monocytogenes* süspansiyonu yarım kuvvet Fraser sıvı besi yerine geçmek için hazır hale getirildi.

Sütte *L. monocytogenes*' in Yapay Kontaminasyonu

Pozitif kontrol amacıyla 10 adet stomacher poşetine 25 ml süt kondu ve üzerine 10⁻⁷ kob/ml *L. monocytogenes* MRD kültüründen 100' er µL eklendi. Daha sonra 225 ml yarım kuvvette steril Fraser sıvı besi yeri ilave edilerek poşetler 30 °C' de 24 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonunda elde edilen yarım kuvvette Fraser sıvı besi yerleri DNA ekstraksiyonu amacıyla kullanıldı. Negatif kontrol amacıyla ise 4 adet süt numunesinden 25 ml alındı üzerine *L. monocytogenes* ilave edilmeden 225 ml yarım kuvvette steril Fraser sıvı besi yeri ilave edildi. Aynı işlemler tam kuvvet Fraser sıvı besi yeri ile tekrarlandı. 10 mL tam kuvvette Fraser sıvı besi yerine geçilen 0,1 mL yarım kuvvet

Fraser sıvı besi yeri 37 °C' de 24-48 saat inkübe edildi.

Yapay Kontaminasyonu Yapılarak İnkübasyonu Tamamlanmış Fraser Sıvı Besi Yerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Instagene Matrix® Ekstraksiyon Kiti (BioRad, 732-6030) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı.

Bunun için; *L. monocytogenes* zenginleştirilmesi yapılmış 1 mL tam kuvvette Fraser sıvı besi yeri alındı ve 8000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökelti 1 mL steril distile su içinde süspanse edildi. Süspansiyon 12000 g'de 1 dakika santrifüj ardından süpernatantı atılarak üzerine 200 µL Instagene Matrix® ekstraksiyon süspansiyonu eklendi ve çalkalayıcı inkübatörde 56 °C' de 900 devirde 50 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 10 saniye hızlıca vortekslendi. Ardından çalkalayıcı inkübatörde 100 °C' de 8 dakika inkübasyon sonrası tekrar 10 saniye vortekslendi ve 12000 g'de 2-3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst faz bakteri DNA' sını olarak hazır hale getirildi.

Fraser Sıvı Besi Yerinden Ekstrakte Edilmiş DNA Örneklerinin Real Time-PCR Analizi

Instagene Matrix® (BioRad 732-6030) ekstraksiyon kiti ile hazırlanan DNA örnekleri 4 µL eklendi.

Tablo 15' de belirtildiği gibi karışım hazırlandıktan sonra;

Tüm LightCycler Nano® (Resim 1) reaksiyon mikrotüplerine 16 µL olarak dikkatlice dağıtıldı. Ardından Fraser sıvı besi yerinden ekstrakte edilen DNA örneklerinden 4'er µL ilave edildi. Negatif kontrol için ise DNA yerine DNAaz-RNAaz içermeyen 4 µL distile su eklendi ve her bir reaksiyon karışımı 20 µL'ye tamamlandı (Tablo 17).

RTi-PCR analizinden sonra tüm örnekler üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanan ALOA kromojenik selektif katı besi yerine (Merck 1.00427) pasaj edildi ve 37 °C' de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda üremeler kontrol edildi.

Tablo 17. *L. monocytogenes* RTi-PCR analizinde kullanılan primer /prob / ana karışım / distile su değerleri

RTi-PCR	Konsantrasyon	Normal prosedür Miktar/Örnek (μ l)	Instagene Matrix® prosedürü Miktar/Örnek (μ l)	Instagene Matrix® prosedüründe 16 Örnek (μ l)
<i>hlyQ</i> F primer	50mM	0,6	0,6	9,6
<i>hlyQ</i> R primer	50mM	0,6	0,6	9,6
Prob	100 nM	0,2	0,2	3,2
Ana karışım	-	4	4	64
Distile Su	-	12,6	10,6	169,6
DNA örnek	-	2	4	
TOPLAM		20	20	256

Ana karışım:DNA polimeraz, enzim,5x buffer, 7,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, BSA, Blue dye, Yellow dye (5x Firepol blend Master Mix, Solis Biodyne)



Resim 1. Real time PCR cihazı ve Real Time PCR cihazına tüplerin yerleştirilmesi

Yapay Olarak Kontamine Edilmiş Silaj ve Silaj Suyundan *L. monocytogenes* İzolasyonu ve RTi-PCR ile Analizi

Bu protokol USDA-FSIS'e göre yapıldı.

Modifiye edilen USDA-FSIS protokolüne göre analizin aşamaları aşağıdaki gibidir;

- 25 g veya 25 mL analiz örneği 225 mL hazırlanmış steril UVM I sıvı besi yerine (Oxoid CM 0863) ekildi ve 30 °C'de 20-26 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda UVM I sıvı besi yerinden 0.1 mL MOPS-BLEB sıvı besi yerine

aktarıldı ve bu sıvı besi yeri 35 °C'de 18-24 saat ikinci kez inkübe edildi.

- c) Çift zenginleştirme sonrası sıvı besi yeri Real Time PCR analizine alındı.
- d) Sonucu pozitif çıkan analiz örnekleri kromojenik selektif besi yeri olan ALOA kromojenik selektif katı besi yerine pasaj edildi.
- e) Bu katı besi yerinde 37 °C'de 24-48 saat etüve alındı.
- f) Bu süre ardından kromojenik katı besi yerinde *L. monocytogenes*'e özgü haleli, opak ve mavi-yeşil renk koloni üremelerine bakıldı. Bu koloniler *L. monocytogenes* için şüpheli kabul edildi ve sonraki analizler için BHI (Brain heart infusion) sıvı besi yerine pasaj edildi.

Silaj ve silaj suyunda optimizasyon için önce kontaminasyonda kullanılan standart kültür hazır hale getirildi. Bunun için süt optimizasyonunda anlatıldığı şekilde MRD sıvı besi yerinde kültür standardizasyonu ilk iki günde hazır hale getirildi. Stomacher poşetlerinden 10 adetine *L. monocytogenes* pozitif poşet olarak; 100 µL *L. monocytogenes* kültürü+25 g silaj / 25 mL silaj suyu+ 225 mL UVM sıvı besi yeri, *L. monocytogenes* negatif poşet olarak 4 adetine 25 g silaj / 25 mL silaj suyu + 225 mL UVM sıvı besi yeri ilave edildi. Bag Mixer®'de iyice homojenize edildi ve poşetler kapatılarak 30 °C'de 20-26 saat etüvde inkübe edildi. Süre sonunda ilk zenginleştirme olan UVM sıvı besi yerinden 0,1 mL, ikinci zenginleştirme için olan 10 mL MOPS-BLEB sıvı besi yerine pasaj edildi. İkinci zenginleştirme 35 °C'de 18-24 saat olmak üzere etüve alındı. İkinci inkübasyon sonunda MOPS-BLEB sıvı besi yerleri RTi-PCR analizine alındı. Analiz örnekleri dışında pozitif örnek olarak *L. monocytogenes* standart suşu ve negatif kontrol için ise steril distile su kullanıldı. Süre sonunda MOPS-BLEB sıvı besi yerlerinden 1 mL örnek alındı ve RTi-PCR analizi yapıldı.

Yapay Kontamine Edilmiş Fekal Örnekten *L. monocytogenes* İzolasyonu ve RTi-PCR İle Analizi

Bu protokol modifiye USDA-FSIS' e göre yapıldı. Analiz silaj / silaj suyu örneklerinde tanımlandığı gibi yapıldı.

Listeria Tür Tayini İçin Multipleks PCR' in Optimizasyonu

Bu Real Time PCR testinde *L. monocytogenes* pozitif sonuç vermiş, ardından bu pozitif örneklerin ALOA kromojenik selektif katı besi yerine ekilmiş ve inkübasyonu

sonrası elde edilen hale görüntülü şüpheli kolonilerin *L. monocytogenes* olup olmadığını gösteren PCR analizinin optimizasyonunu amaçlamaktadır. Bunun için multipleks PCR metodu uygulandı (Huang ve ark., 2007) . Analizin optimizasyonu için *Listeria*'nın 6 türü (*L. welshimeri*, *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri*; *L. ivanovii*, *L. grayi* ve *L. innocua*) kullanıldı. Tür tayininde kullanılan primer ve hedef gen hakkında bilgiler aşağıdaki Tablo 18' de gösterildi.

Tablo 18. *Listeria* tür ayırımı için multipleks PCR' da kullanılan primerler

Hedef gen	Hedef <i>Listeria</i> türü	Primer	Primer (bp)
Havuz 1			
<i>lwe7-571</i> (Fosfotransferaz sistem enzimi IIBC)	<i>L. welshimeri</i>	TCCCACCATTGGTGCTACTCA	608
		TTGGCGTACCAAAGAAATACG	
<i>Lmo0733</i>	Tüm <i>L. monocytogenes</i> serotipleri	ACGAGTAACGGGACAAATGC	453
		CCCGACAGTGGTGCTAGATT	
<i>lse2415</i> (internalin)	<i>L. seeligeri</i>	CGCGACGGCTAAAGTACTAA	375
		ATTGCTCGCTTTGAAGTCGT	
Havuz 2			
<i>liv22-228</i> (N-metilmuramidaz)	<i>L. ivanovii</i>	(N) ₁₅ CGAATTCCTTATTCACTTGAGC	493
		(N) ₁₅ GGTGCTGCGAACTTAACTCA	
<i>lgr20-246</i> (oksidoredüktaz)	<i>L. grayi</i>	CTGCACGATCAAGGTCAATC	420
		CGTATTGCGCACCAGTGATA	
<i>iap</i> (invazyon ilişkili protein)	<i>L. innocua</i>	TTGCTACTGAAGAAAAAGCA	250
		TCTGTTTTTGCTTCTGTAGC	

Listeria türleri (*L. welshimeri*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. innocua*) firmanın tavsiyesine göre (ATCC *Listeria* spp. Data sheet) 10 mL BHI (Oxoid CM1135) sıvı besi yerine pasaj edilerek çoğaltıldı. DNA ekstraksiyonları Instagene Matrix® ile yapıldı. Elde edilen DNA ile optimizasyon protokolde tanımlandığı üzere iki ayrı havuz şeklinde yapıldı. Havuzlarda (Havuz 1 ve Havuz 2) üçer adet olmak Listeria türleri toplandı; Havuz 1’de *L. welshimeri*, *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri*; Havuz 2’de *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. innocua* türleri kullanıldı. Protokolde tarif edildiği gibi ve PCR solüsyonları üreticilerinin (Fermentas-Thermo) talimatlarına göre oluşturulan reaksiyon karışımı Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19. Listeria tür ayrımı multipleks PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı içerikleri	Miktar	Konsantrasyon
Steril Distile Su	11,25 µL	-
10x buffer (KCl içeren)	2,5 µL	10 mM Tris pH 8,3; 50 mM KCl
MgCl ₂	2,5 µL	2,5 mM MgCl ₂
dNTPs	0,5 µL	200 µM
F1*	1 µL	25 pmol
R1*	1 µL	25 pmol
F2*	1 µL	25 pmol
R2*	1 µL	25 pmol
F3*	1 µL	25 pmol
R3*	1 µL	25 pmol
Taq polimeraz	0,25 µL	0,5 U
Örnek DNA	2 µL	-
TOPLAM HACİM	25 µL	

* Numaralanmış F ve R primerleri her bir Listeria türüne ait spesifik primerleri ifade eder.

PCR karışımları hazırlanırken optimizasyon amacıyla Listeria türleri ve kombinasyonlarına ait DNA örnekleri PCR karışımı içine ilave edilerek optimizasyonları yapıldı. . Listeria türü ve bunların kombinasyonları Tablo 20’ de gösterilmiştir.

Tablo 20. Multipleks PCR ile analiz edilen *Listeria* türleri ve kombinasyonları

Havuz 1	Havuz 2
<i>L.welshimeri</i>	<i>L.grayi</i>
<i>L.welshimeri</i>	<i>L.grayi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>
<i>L.seeligeri</i>	<i>L.ivanovii</i>
<i>L.seeligeri</i>	<i>L.ivanovii</i>
<i>L.welshimeri, L. monocytogenes, L.seeligeri</i>	<i>L.ivanovii, L.grayi ve L.innocua</i>
<i>L.welshimeri, L. monocytogenes, L.seeligeri</i>	<i>L.ivanovii, L.grayi ve L.innocua</i>
<i>L.welshimeri, L. monocytogenes</i>	<i>L.grayi, L.innocua</i>
<i>L.welshimeri, L. monocytogenes</i>	<i>L.grayi, L.innocua</i>
<i>L.welshimeri, L.seeligeri</i>	<i>L.grayi, L.ivanovii</i>
<i>L.welshimeri, L.seeligeri</i>	<i>L.grayi, L.ivanovii</i>
<i>L. monocytogenes, L.seeligeri</i>	<i>L.innocua, L.ivanovii</i>
<i>L. monocytogenes, L.seeligeri</i>	<i>L.innocua, L.ivanovii</i>
Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
Negatif Kontrol	Negatif Kontrol

PCR döngü ve sıcaklıkları; 1 döngü 95 °C’ de 9 dakika; 30 döngü: °C’ de 30 sn, 60 °C’ de 30 sn, 72 °C’ de 1 dakika; ve 1 döngü 72 °C’ de 7 dakika şeklinde yapıldı. Reaksiyonu bitmiş örneklerde Havuz 1 ve Havuz 2 ayrı olarak elektroforezde (120 V, 80 mA, 43 dakika) yürütüldü. Sonuçlar transillüminatör ile görüntülendi.

***L. monocytogenes* Virulens Tayini İçin Multipleks PCR Optimizasyonu**

Optimizasyonda referans olarak *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşundan ekstrakte edilen DNA’sı kullanıldı. Optimizasyondaki PCR karışımı için 0,8 U Taq DNA polimeraz (Fisher Scientific, Houston, TX), 1 × PCR buffer, 200 µM dNTP (Fermentas-Thermo), 40 pmol *inlA* primeri, 30 pmol *inlC* primeri, 20 pmol *inlJ* (İnternalin J) primeri, 1 µl (yaklaşık 10 nanogram) DNA kullanıldı ve 25 µL için distile su ile tamamlandı. PCR döngü ve sıcaklıkları; 1 döngü 94 °C’ de 2 dakika; 30 döngü: 94 °C’de 20 sn, 55 °C’ de 20 sn, 72 °C’ de 50 sn ve 1 döngü 72 °C’ de 2 dakika şeklinde yapıldı.

Amplifikasyon ürünleri elektroforezde (% 1 agaroz jelde ve 0,1 µg/mL ethidium bromide) 120 V, 80 mA, 40 dakika yürütüldü vetransillüminatörde görüntülendi.

Her örnek iki defa analiz edildi. Multipleks PCR ile *Listeria monocytogenes* virulens analizinde kullanılan primerler Tablo 21’de gösterildi.

Tablo 21. Multipleks PCR ile *Listeria spp.*’ de virulens analizinde dikkate alınan hedef, spesifiteleri, primerleri ve ürün büyüklüğü

Hedef gen	Spesifite	Primer	PCR ürünü (bp)
<i>inlA</i>	Tüm <i>L. monocytogenes</i> serotipleri	ACGAGTAACGGGACAAATGC	800
<i>inlC</i>	Tüm <i>L. monocytogenes</i> serotipleri (4a bazı 4c hariç)	AATTCCCACAGGACACAACC	517
<i>inlJ</i>	Tüm <i>L. monocytogenes</i> serotipleri (4a ve bazı IIIB hariç)	TGTAACCCCGCTTACACAGTT	238

inlA:İnternalin A; *inlC*:İnternalin C; *inlJ*:İnternalin J

3.3. İstatistiksel analiz

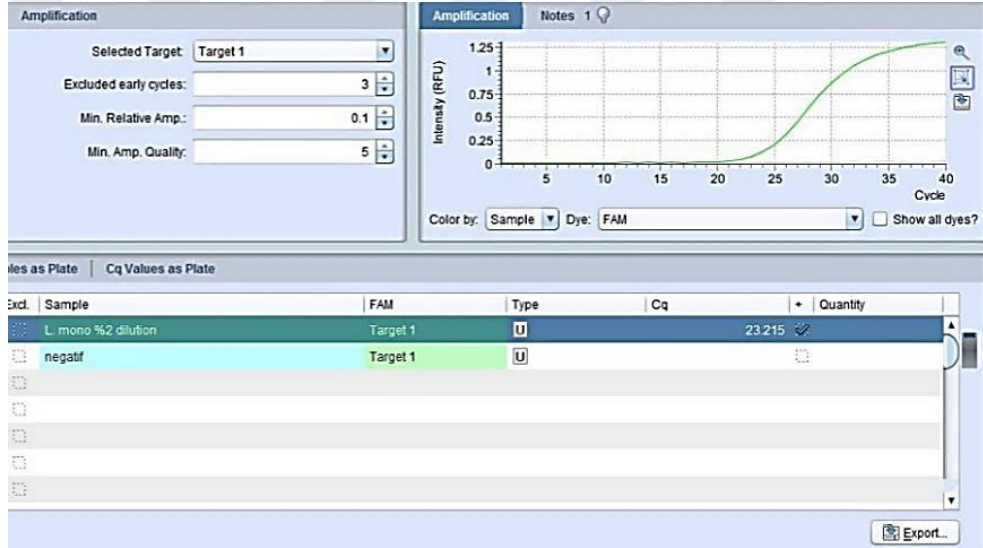
Verilerin istatistiksel analizleri t testi ve χ^2 testi ile SPSS 12.0 paket program kullanılarak yapıldı (Chicago, Illinois). Sonuçlar one-way ANOVA yöntemi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ düzeyi önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Optimizasyon sonuçları

4.1.1. Referans Kültür *L. monocytogenes*' in Üretilmesi ve RTi-PCR Analizinin Optimizasyon Sonuçları

Referans kültür Brain Heart Infusion Broth sıvı besi yerinde üredi. Üreme gerçekleşmiş standart suş *L. monocytogenes* ATCC 7644'ün RTi-PCR analizinin sonuçları Resim 2' de gösterildi. Kültür edilen standart suşun Cq (Quantification cycle) değeri 23,2 gibi olumlu bir değerde oldu. Cq değeri 40'a yakın ise *L. monocytogenes* sonucu negatiftir. *L. monocytogenes* referans kültürü RTi-PCR ile analizi optimize edilmiş oldu.

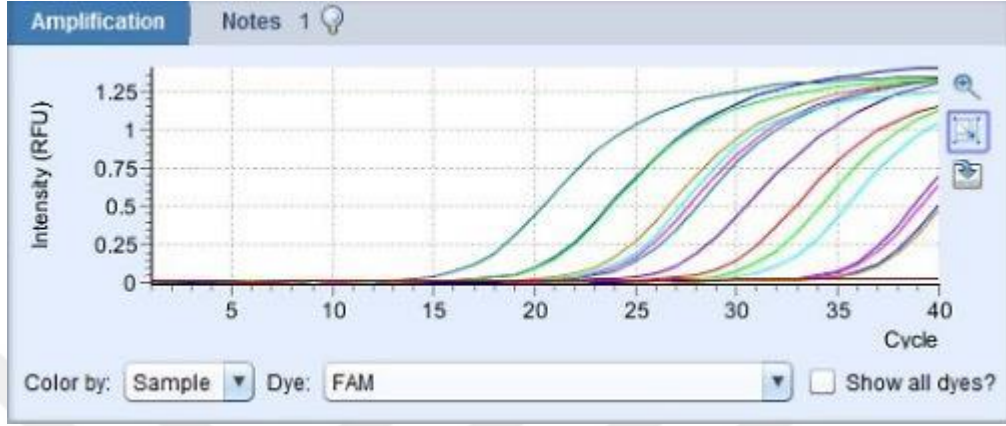


Resim 2. Standart suş olan *L. monocytogenes* ATCC 7644 RTi-PCR sonucu

4.1.2. Yapay Kontamine Edilmiş Örneklerde *L. monocytogenes* İzolasyonu ve RTi-PCR ile Analizinin Optimizasyon Sonuçları

Yapay olarak 10^{-7} kob/ml *L. monocytogenes* ile kontamine edilen süt, silaj, silaj suyu ve fekal örneklerde her iki besiyerlerinde de (Fraser ve MOPS-BLEB sıvı besiyerleri) *L. monocytogenes* üremesi görüldü ve sonuç pozitif kabul edildi. Yapay olarak *L. monocytogenes* ile kontamine edilmeyen süt örneklerinde ise herhangi bir üreme tespit edilemedi ve sonuç negatif kabul edildi. Pozitif ve negatif kontrol örneklerinde benzer sonuçlar elde edildi. Daha sonra edilen süt, silaj, silaj suyu ve fekal

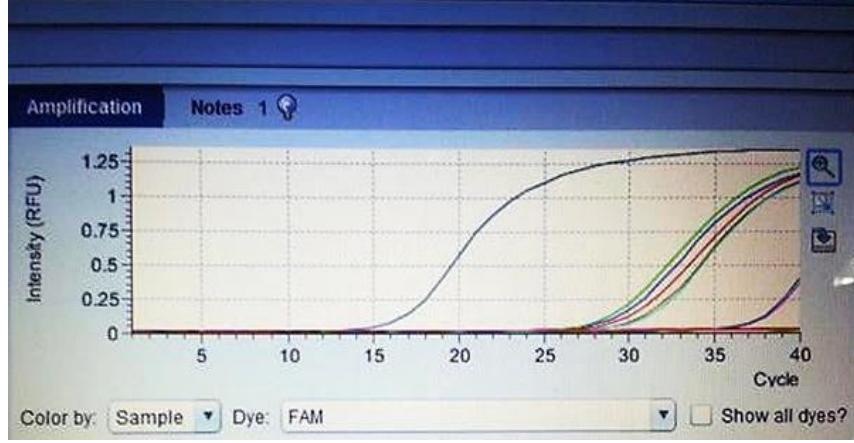
örnekleri ALOA kromojenik katı besi yerine pasajlandı ve RTi-PCR analizi yapıldı. RTi-PCR sonucunda pozitif örneklerde *L. monocytogenes* üremesi görüldü (Resim 3,4,5,6,7). Bu sayede modifiye edilen ISO-11290 ve USDA-FSIS analizleri tüm matrikslerde (süt, silaj, silaj suyu, fekal örnek vs.) optimize edilmiş oldu.



Resim 3. *L. monocytogenes* 10 pozitif ve 4 negatif süt örneğinde RTi-PCR sonuçları



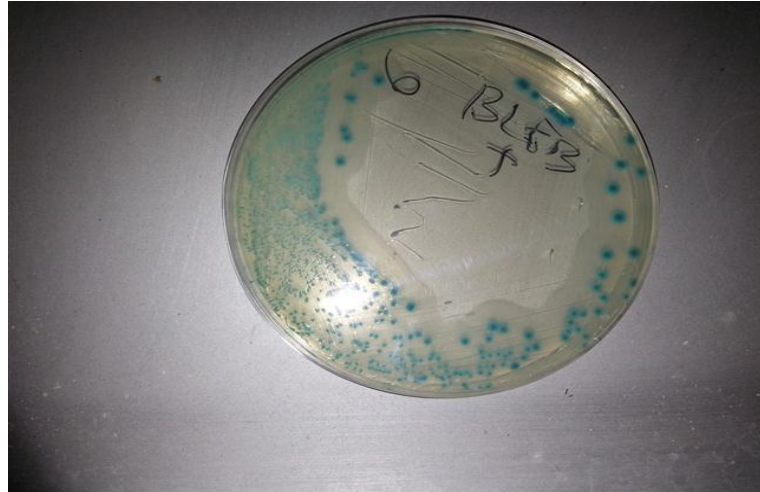
Resim 4. RTi-PCR testinde pozitif sonuç vermiş yapay kontaminasyon yapılmış sütte kromojenik katı besi yeri



Resim 5. Pozitif sonuç grafikleri



Resim 6. Yapay kontamine edilmiş fekal örneklerde RTi-PCR sonuçları

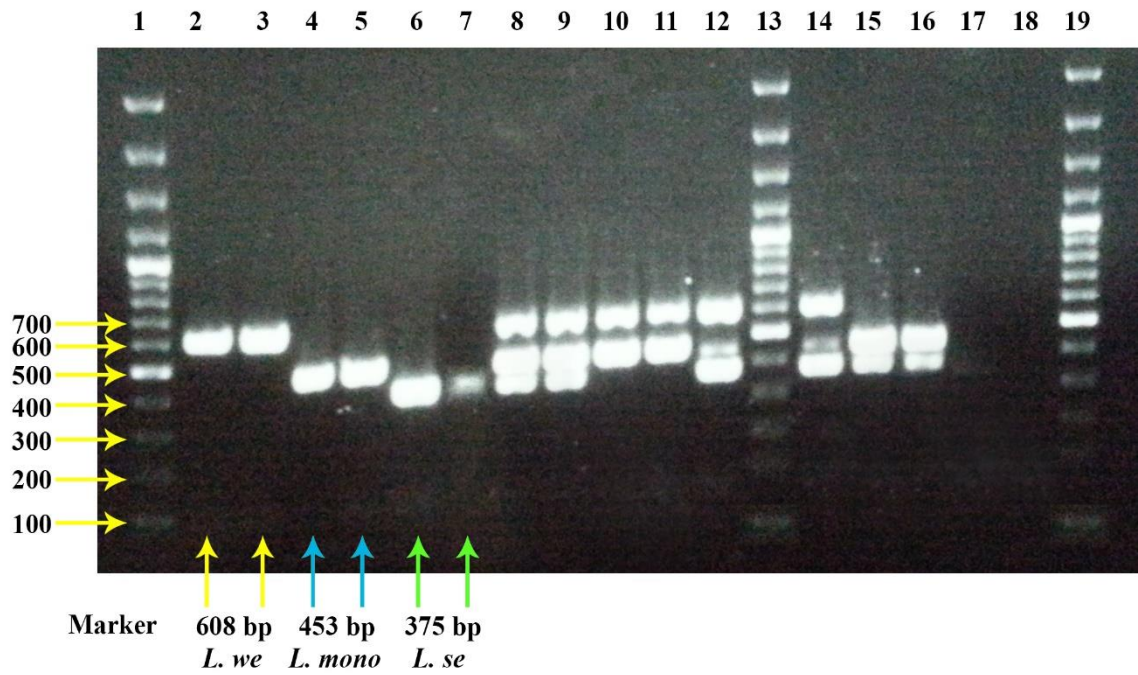


Resim 7. RTi-PCR analizinde *L. monocytogenes* pozitif fekal örnekten yapılan kromojenik katı besi yeri üremeleri

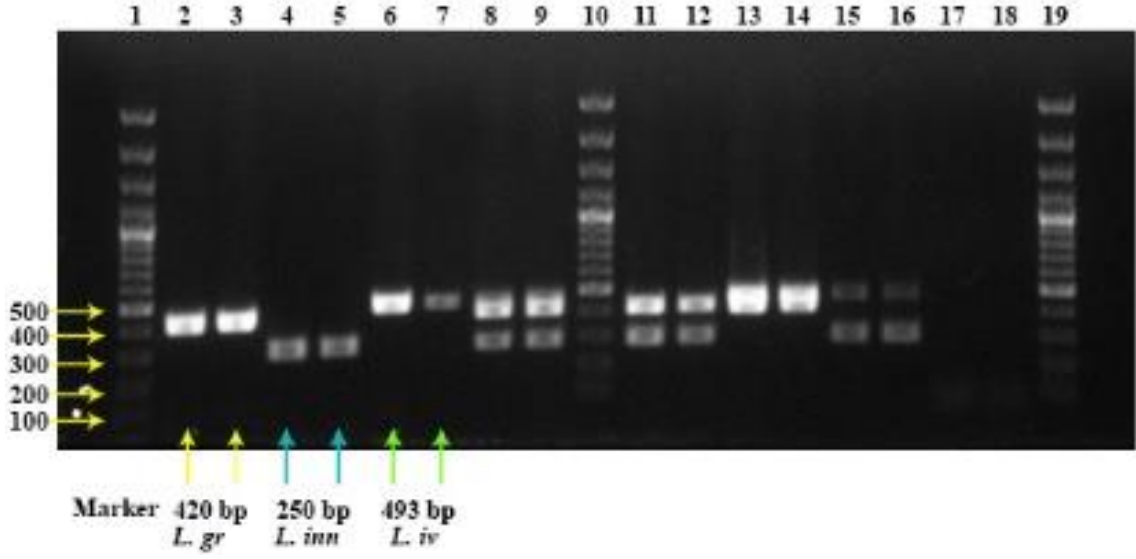
Tüm yapay kontaminasyonlu örnek optimizasyonlarında; ikinci zenginleştirmelerden (Tam kuvvette Fraser ve MOPS-BLEB sıvı besi yerlerinden) ALOA kromojenik katı besi yerine yapılan pasajlar ise RTi-PCR' da elde edilen sonuçlarla paralel sonuçlar verdi. Tüm örnek çeşitlerinde (süt, silaj, silaj suyu, fekal örnek vs.) numaralama aynı (pozitifler:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; negatifler: 11,12,13,14) yapıldı ve negatif olarak belirlenen 11,12,13,14 numaralı tüm örneklerden *L. monocytogenes* izole edilmedi. Bu sayede modifiye edilen ISO-11290 ve USDA-FSIS analizleri tüm matrikslerde (süt, silaj, silaj suyu, fekal örnek vs.) optimize edilmiş oldu.

4.1.3. Listeria Tür Tayini İçin Multipleks PCR' ın Optimizasyon Sonuçları

Spesifik primerler ile çoğaltılan DNA fragmentleri görüntülendi. Tekli Listeria türleri ve Listeria tür kombinasyonunda sonuçların doğruluğu tespit edildi. Elektroforez yürütmelerinde, primer kilobaz değerlerinin birbirine yakın olmasından dolayı görüntüde bazı DNA fragmentlerinin (*L. seeligeri*' nin 372'lik primeri ile *L. monocytogenes* serotiplerini tespit eden 453 bp büyüklüğündeki primeri; ikinci havuzda ise *L. ivanovii*' nin 493'lik primeri ile *L. grayi*' nin 420 bp büyüklüğündeki primerleri) birbirine çok yakın olduğu görüldü. İlk denemedeki olayların yaşanmaması için DNA fragment görüntüleri arasında netlik kazandırmak için 40 dakika olan elektroforez yürütme süresi 43 dakikaya çıkarıldı. Elde edilen görüntüler Resim 8 ve Resim 9' da gösterilmiştir.



Resim 8. Soldan sağa: 1-Marker; 2-*L. welshimeri*; 3-*L. welshimeri*; 4-*L. monocytogenes*; 5-*L. monocytogenes*; 6-*L. seeligeri*; 7-*L. seeligeri*; 8-*L. welshimeri*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*; 9-*L. welshimeri*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*; 10-*L. welshimeri*, *L. monocytogenes*; 11-*L. welshimeri*, *L. monocytogenes*; 12-*L. welshimeri*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*; 13-Marker; 14- *L. welshimeri*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*; 15-*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*; 16-*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*; 17-Negatif; 18-Negatif; 19-Marker

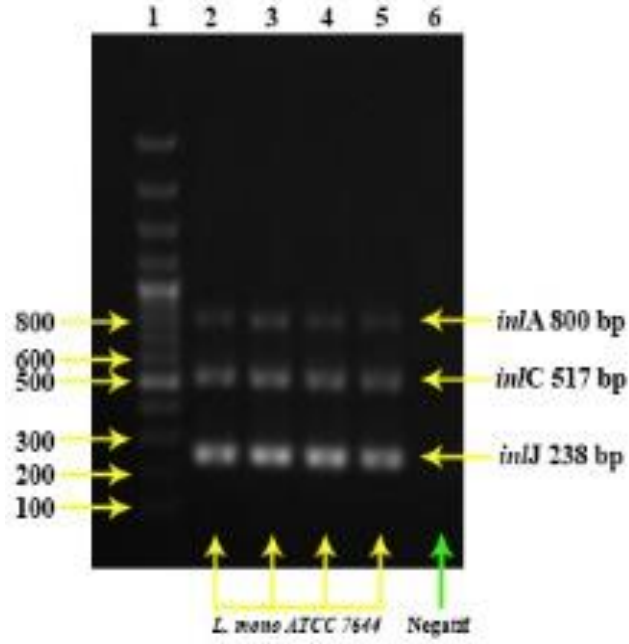


Resim 9. Listeria türlerinin multipleks PCR optimizasyonu (Havuz 2). Soldan sağa:1-*L. ivanovii*; 2- *L. ivanovii*; 3- *L. innocua*; 4- *L. innocua*; 5-Marker; 6- *L. grayi*; 7- *L. grayi*; 8- *L. ivanovii*, *L. grayi* ve *L. innocua*; 9- *L. ivanovii*, *L. grayi* ve *L. innocua*; 10- *L. ivanovii*, *L. grayi*; 11- *L. ivanovii*, *L. grayi*; 12-Marker; 13- *L. grayi*, *L. ivanovii*; 14- *L. grayi*, *L. ivanovii*; 15 - *L. grayi*,*L. innocua*; 16 - *L. grayi*,*L. innocua*; 17 ve 18-Negatif kontrol; 19-Marker

4.1.4. *L. monocytogenes* Virulens Tayini için Multipleks PCR

Optimizasyon Sonuçları

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Optimizasyon sırasında istenen DNA fragment büyüklükleri (*inlA* 238 bp; *inlJ* 517 bp; *inlJ* 800 bp) transillüminatörde görüntülendi (Resim 10).



Resim 10. *L. monocytogenes* ATCC 7644' ün virulens analizi..Soldan sağa: 1-Marker; 2,3,4,5; *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve 6 - Negatif kontrol.

4.2. *L. monocytogenes*' in İzolasyonu

4.2.1. Silaj Yapım Aşamasındaki Örneklerde *L. monocytogenes* İzolasyonu

Modifiye USDA-FSIS metodu ile Silaj yapım aşamasında alınan örneklerde *L. monocytogenes* negatif olarak değerlendirildi. Bu sonuçlara paralel olarak konvansiyonel USDA-FSIS analiz prosedüründe de *L. monocytogenes* izole edilmemiştir. Uygulanan Modifiye Analiz Metodunda Cq değerleri döngü sayısı olan ve son döngü değeri olan 40 değerine yakın bir değerde idi. Bu değerlerde olması örneklerin *L. monocytogenes* yönünden **negatif** olduğunu göstermiştir. USDA-FSIS ve modifiye USDA-FSIS analiz metodu ile sonuçlar her iki metodun sonuçları paralel idi. 0. günde silajlık mısırların tümünde izolat sayısı 1 oldu ve izole edilen tür *L. grayi* idi. Silaj suyu olarak 15. ve 30. günde izole edilen tek tür *L. innocua* oldu. Silaj yeminin hazırlanması aşamasındaki örneklerde her iki metot ile analiz sonuçları ve pH ölçüm değerleri Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Silaj yeminin hazırlanması aşamasındaki örneklerde analiz sonuçları

Örnek zamanı	Materyal	İşletme adı	Analizler		
			pH	USDA-FSIS	Modifiye USDA-FSIS
0.gün	Silajlık mısır	Bafra-1	6,5	TE	TE
		Bafra-2	6,5	TE	TE
		Bafra-3	6,5	TE	TE
		Kavak	6,5	TE	TE
		Tokat	6,5	TE	TE
		Amasya	6,5	<i>L. grayi</i>	TE
15.Gün	Silaj Suyu (Birinci)	Bafra-1	3,7	TE	TE
		Bafra-2	3,0	TE	TE
		Bafra-3	4,4	TE	TE
		Kavak	3,7	TE	TE
		Tokat	6,4	TE	TE
		Amasya	4,1	TE	TE
30.Gün	Silaj Suyu (İkinci)	Bafra-1	3,3	TE	TE
		Bafra-2	3,0	TE	TE
		Bafra-3	4,2	<i>L. innocua</i>	TE
		Kavak	4,0	TE	TE
		Tokat	4,0	TE	TE
		Amasya	2,7	TE	TE

TE: 25 g numuneden tespit edilmediğini ifade eder.

4.2.2.Süt Sığır İşletmelerinden Alınan Örneklerde *Listeria monocytogenes* izolasyonu

Kış dönemi (Aralık-Ocak-Şubat) ayı örneklemelerindeki analizlerde her iki metotla *L. monocytogenes* izole edilmedi ve burada metotların sonuçları uyumlu oldu. Aralık-Ocak-Şubat *L. monocytogenes* analizleride tüm örnekler negatif sonuç verdi.

Kış dönemi örneklemelerinde yapılan analizlerde izole edilen *Listeria* türleri *L. innocua* 22/108 (% 20,37) , *L. grayi* (% 0,92) ve *L. ivanovii* (% 0,92) oldu. *Listeria* spp. izolasyonu edilmeyen tek örnek türü süt oldu. Kış dönemine ait izolasyon sonuçları Tablo 23’de gösterilmiştir.

Tablo 23. Kış döneminde yapılan örneklemelelerde *Listeria* spp. analiz ve sonuçları

Ay	İşletme	pH	USDA-FSIS					Modifiye USDA-FSIS					ISO-11290-1		Modifiye ISO-11290-1	
			Silaj	Silaj Suyu	Fekal Örnek	Meme Yıkantı	Silaj	Silaj Suyu	Fekal Örnek	Meme Yıkantı	Süt	Süt Tankı	Süt	Süt Tankı		
Aralık	Bafra-1	3.9	TE	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Bafra-2	5.1	<i>L.inn</i>	TE	TE	<i>L.gr</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE
	Bafra-3	4.5	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Kavak	3.9	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Amasya	5.9	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Tokat	4	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Ocak	Bafra-1	3.5	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Bafra-2	3.7	TE	TE	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE
	Bafra-3	4.9	TE	TE	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Kavak	4.4	TE	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Amasya	4.6	TE	TE	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Tokat	3.6	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Şubat	Bafra-1	3.5	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Bafra-2	4.3	<i>L.inn</i>	TE	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L.inn</i> <i>L. iv</i>	TE	TE	TE
	Bafra-3	4.5	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Kavak	4	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Amasya	3.8	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Tokat	3.6	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	<i>L.inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

TE: 25 g numuneden tespit edilmediğini ifade eder. *L.inn*: *L. innocua*; *L. iv*: *L. ivanovii*; *L. gr*: *L. grayi*

Yaz dönemi örneklemelerindeki analizlerde *L. monocytogenes* izolat sayısı iki oldu. İzolatların biri Bafra-1 işletmesinden alınan meme yıkantı örneğinden, diğeri ise Kavak işletmesinden alınan süt tankı örneğindendi. Yaz dönemi *L. monocytogenes* analiz ve sonuçları Tablo 24’de gösterilmiştir.



Tablo 24. Yaz döneminde yapılan örneklemelelerde *L. monocytogenes* analiz ve sonuçları

	Silaj	Silaj Suyu	Fekal örnek	Meme Yıkantı	Silaj	Silaj Suyu	İşletme	USDA- FSIS	Modifiye USDA- FSIS	ISO 11290-1	Modifiye ISO 11290-1	Süt Tankı
Bafra-1	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L.mono</i>	TE	<i>L.mono</i>
Bafra-2	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Bafra-3	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kavak	TE	TE	TE	<i>L.mono</i>	TE	TE	TE	<i>L.mono</i>	TE	TE	TE	TE
Tokat	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Amasya	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE

TE: 25 g numuneden tespit edilmediğini ifade eder. ***L.mono:*** *L. monocytogenes*

Modifiye analizler yalnızca *L. monocytogenes* sonuçlarını göstermektedir.

Yaz dönemi örneklemelerinden yapılan analizlerde *L. monocytogenes* dışında izole edilen tek Listeria türü olan *L. innocua* 17/108 (%15,74) oranında tespit edildi. Bu döneme ait izolasyon sonuçları Tablo 25’de gösterilmiştir.

Konvansiyonel USDA-FSIS ve ISO 11290-1 analiz metotları sadece *L. monocytogenes* analizi yapan modifiye analiz metotları ile uyumlu sonuç verdi. Modifiye analizler yalnızca *L. monocytogenes* sonuçlarını göstermektedir.



Tablo 25. Yaz döneminde yapılan örneklemelelerde *Listeria* spp. analiz ve sonuçları

Ay	İşletme	pH	USDA-FSIS				Modifiye USDA-FSIS				ISO-11290-1		Modifiye ISO-11290-1		
			Silaj	Silaj Suyu	Fekal Örnek	Meme Yıkantı	Silaj	Silaj Suyu	Fekal Örnek	Meme Yıkantı	Süt	Süt Tankı	Süt	Süt Tankı	
Mayıs	Bafra-1	3.2	TE	TE	TE	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L. inn</i>	TE	TE	
	Bafra-2	3.7	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	
	Bafra-3	2.8	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Kavak	6.8	TE	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Amasya	3.7	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Tokat	4	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Haziran	Bafra-1	3.1	TE	TE	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Bafra-2	3.8	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Bafra-3	4.3	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Kavak	6.8	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i> <i>L.mono</i>	TE	TE	TE	<i>L.mono</i>	TE	TE	TE	TE	
	Amasya	3.8	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Tokat	3.8	TE	TE	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Temmuz	Bafra-1	3.3	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	<i>L.mono</i>	TE	<i>L.mono</i>		
	Bafra-2	4.6	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	Bafra-3	3.7	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE		
	Kavak	6.8	<i>L. inn</i>	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Amasya	3.7	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	
	Tokat	3.7	TE	TE	<i>L. inn</i>	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	

TE: 25 g numunedan tespit edilmediğini ifade eder. *L.inn*: *L. innocua*; *L.mono*: *L. monocytogenes*

L. monocytogenes ve *Listeria* türlerinin identifikasyonunda kültürel ve biyokimyasal yöntemler kullanıldı. Bu yöntemler ile incelenen örnekler, temin edilen dönemleri ve elde edilen izolatların identifikasyon sonuçları Tablo 26'da verilmiştir. Bu tabloya göre yaz ve kış dönemlerinde iki *L. monocytogenes*, 41 *L. innocua*, iki izolat *L. grayi* ve bir *L. ivanovii* olmak üzere toplam 46 izolat elde edilmiştir.



Tablo 26. Analiz örneklerinden izole ve tanımlanmış *Listeria* türlerinin biyokimyasal test sonuçları

İşletme	Ay	Örnek	<30 °C Hareket	Katalaz	Hemoliz	Eskülin	Mannitol	Ramnoz	Ksiloz	Oksidaz	CAMP	İ tanımlanmış Tür
Amasya	Ağustos	0. Sün Silaj	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. grayi</i>
Tokat	Ağustos	15. Sün Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-3	Ağustos	30. Sün Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-1	Aralık	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Aralık	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Aralık	Meme Yıkantı	-	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>L. grayi</i>
Bafra-2	Aralık	Süt Tankı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Ocak	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Ocak	Meme Yıkantı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Ocak	Süt Tankı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-3	Ocak	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Ocak	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Ocak	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Ocak	Meme Yıkantı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Amasya	Ocak	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Amasya	Ocak	Meme Yıkantı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Şubat	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Şubat	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Şubat	Meme Yıkantı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Şubat	Süt Tankı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Şubat	Süt Tankı	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>R. equi</i>	<i>L.ivanovii</i>

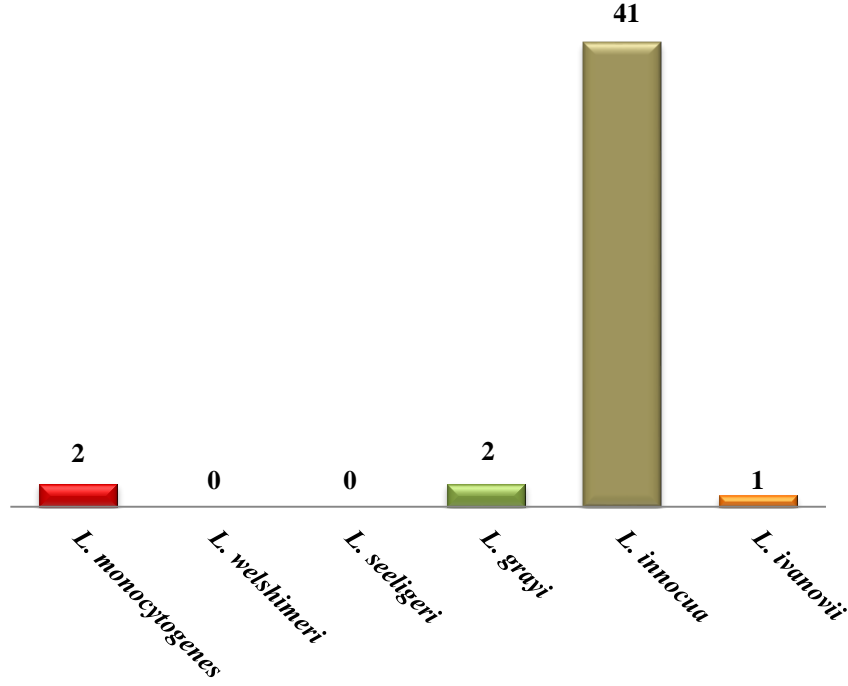
Tablo 26. Analiz örneklerinden İzole ve identifiye edilen *Listeria* türlerinin biyokimyasal test sonuçları (devam)

İşletme	Ay	Örnek	<30 °C Hareket	Katalaz	Hemoliz	Eskülin	Mannitol	Ramnoz	Ksiloz	Oksidaz	CAMP	İdentifiye Tür
Kavak	Şubat	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Şubat	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Şubat	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Tokat	Şubat	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Tokat	Şubat	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Tokat	Şubat	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-1	Mayıs	Meme	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-1	Mayıs	Süt Tankı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-2	Mayıs	Süt Tankı	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Mayıs	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Mayıs	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Mayıs	Meme	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-1	Haziran	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-3	Haziran	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-3	Haziran	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Haziran	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Haziran	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Haziran	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Haziran	Meme	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Haziran	Meme	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Tokat	Haziran	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Bafra-1	Temmuz	Süt Tankı	-	+	+	+	-	+	-	-	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Kavak	Temmuz	Silaj	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Kavak	Temmuz	Silaj Suyu	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>
Tokat	Temmuz	Fekal	-	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>

Her iki aşamada izole edilen *Listeria* türlerinin ; dönemlere ve örnek çeşitlerine göre dağılımı Tablo 27’de ve Şekil 9’da gösterilmiştir.

Tablo 27. İzole edilen *Listeria* türlerinin ; dönemlere ve örnek çeşitlerine göre dağılımı

İzole ve İdentifiye Edilen <i>Listeria</i> Türleri	Yapım Aşamasındaki Silaj Örnekleri			Olgunlaşmış Silajların Süt Sığırlarına Verilmeye Başladığı Günden Sonra Süt Sığır İşletmelerinden Yapılan Örneklemeler												
	Ağustos-Eylül			Kış dönemi						Yaz dönemi						TOPLAM
	Silaj	Silaj suyu	Silaj suyu	Silaj	Silaj Suyu	Fekal örnek	Meme yıkantı	Süt	Süt tankı	Silaj	Silaj suyu	Fekal örnek	Meme yıkantı	Süt	Süt tankı	
	0. gün	15. gün	30. gün													
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>L. welshimeri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. seeligeri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. grayi</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>L. innocua</i>	0	1	1	4	4	7	4	0	3	3	4	5	3	0	2	41
<i>L. ivanovii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
TOPLAM	1	1	1	4	4	7	5	0	4	3	4	5	4	0	3	46



Şekil 9. İzolasyonu yapılan *Listeria* türlerinin dağılımı

Çalışmada elde edilen izolatların tür dağılımı *L. innocua* % 89,1, *L. monocytogenes* % 4,36, *L. grayi* % 4,36 ve *L. ivanovii* % 2,17 şeklinde oldu (Tablo 28).

Tablo 28. İzolasyonu yapılan *Listeria* türleri ve sayıları

İzole edilen tür	İzolat sayısı	Yüzde (%)
<i>L. monocytogenes</i>	2	4,36
<i>L. welshimeri</i>	0	0,00
<i>L. seeligeri</i>	0	0,00
<i>L. grayi</i>	2	4,36
<i>L. innocua</i>	41	89,1
<i>L. ivanovii</i>	1	2,17
TOPLAM	46	100

Süreleri üçer ay olan iki dönemin tüm aylarında *Listeria* spp. izolasyonu yapıldı. İzolat sayıları ay bazında incelendiğinde en düşük izolat sayısı 4 ile Aralık ve Temmuz ayında olurken, en yüksek izolat sayısı 11 ile Şubat ayında gerçekleşti. İki dönemin izolat sayısı karşılaştırıldığında ise kış dönemi (Aralık-Ocak-Şubat) sayısı izolat sayısı 23 iken,

Yaz döneminde (Mayıs-Haziran-Temmuz) bu sayı 19 olarak gerçekleşti. *Listeria* spp. izolatlarının aylara göre ve mevsimsel yüzde oranları Tablo 29’ da gösterilmiştir.

Tablo 29. *Listeria* spp. izolatlarının mevsimsel dağılımları

Dönem	Aylar	Örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı	%	Mevsimsel yüzde oranları
Kış	Aralık	36	4	11,1	55,8
	Ocak	36	9	25	
	Şubat	36	11	30,5	
Yaz	Mayıs	36	6	16,7	44,2
	Haziran	36	9	25	
	Temmuz	36	4	11,1	

Silajların hayvanlara verildiği dönem örneklemelerinde tür bazında mevsimsel dağılımda ise en fazla izolat Şubat ayında 10 (% 23,2) ile *L. innocua* olurken, en düşük izolat sayısı 1’ er (% 2,33) ile Aralık ayında *L. grayi*, Şubat ayında *L. ivanovii*, Haziran ve Temmuz ayında *L. monocytogenes* oldu.

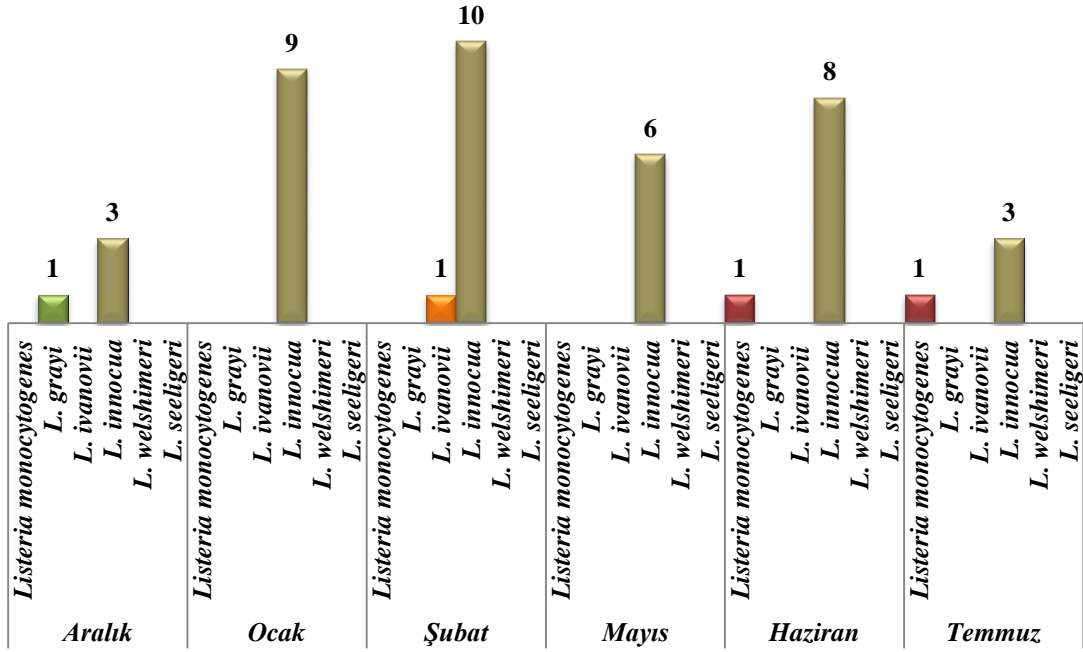
İzolatlardan *L. monocytogenes* kış döneminde izole edilmezken, yaz döneminin Haziran ve Temmuz ayında 1’er olmak üzere toplamda 2 adet izole edildi.

İzole tür olan *L. grayi* 1 adet olmak üzere yalnızca kış döneminin ve silajların hayvanlara verildiği ilk ay olan Aralık ayında izole edildi.

L. ivanovii türü ise 1 adet olmak üzere yalnızca kış döneminin Şubat ayında izole edildi.

İdentifiye edilen *L. innocua* türü ise en fazla izole edilen *Listeria* türü olarak hem kış aylarında, hem de yaz döneminin tüm aylarında izole edilebildi. *L. innocua* izolat sayısı kış döneminde 12, yaz döneminde ise 17 idi. En fazla *L. innocua* izolat sayısı Şubat ayında 10 iken, en az *L. innocua* izolat sayısı 3 ile Aralık ve Temmuz aylarında oldu.

Silajların hayvanlara verildiği dönemde izole edilen *Listeria* türlerinin ay bazında mevsimsel dağılımı Şekil 10’ da gösterilmiştir.



Şekil 10. Silajların hayvanlara verildiği dönemde izole edilen *Listeria* türlerinin mevsimsel dağılımı

Silajların hayvanlara verildiği dönemde yapılan örneklemelerde en yüksek *Listeria* spp. izolat sayısı ve oranı fekal örnekte 12 adet (% 33,33) olarak tespit edilirken, süt örneklerinde izolasyon olmadı. Silaj örneklerinde 7 (% 19,44), silaj suyu örneklerinde 8 (% 22,22), meme yıkantı örneklerinde 9 (% 25) ve süt tankı örneklerinde 7 (% 19,44) adet *Listeria* spp. izole edildi (Tablo 30).

Tablo 30. Silajların hayvanlara verildiği dönemde izole edilen *Listeria* türlerinin örneklere göre dağılımı

Örnek	Toplam örnek	Pozitif örnek	Yüzde (%)
Silaj	36	7	19,44
Silaj suyu	36	8	22,22
Fekal örnek	36	12	33,33
Meme yıkantı	36	9	25
Süt	36	-	-
Süt tankı	36	7	19,44
TOPLAM	216	43	19,97

Silajların hayvanlara verildiği dönemde elde edilen *L. monocytogenes* izolat sayısı 2 (% 1,39) oldu. Bu izolatların 1 (% 2,78) adeti meme yıkantı örneklerinden, diğer

1 (% 2,78) adeti ise süt tankı örneklerindendi. *L. monocytogenes* izolatlarının örneklere göre dağılımı Tablo 31’ de gösterilmiştir.

Tablo 31. *L. monocytogenes* izolatlarının örneklere göre dağılımı

Örnek	Toplam örnek	Pozitif örnek	Yüzde (%)
Silaj	36	-	-
Silaj suyu	36	-	-
Fekal örnek	36	-	-
Meme yıkantı	36	1	2,78
Süt	36	-	-
Süt tankı	36	1	2,78
TOPLAM	216	2	0,93

Silajların hayvanlara verildiği dönemde kış aylarında *L. monocytogenes* izole edilmezken, yaz aylarında 2 (% 1,86) adet *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Tablo 32).

Tablo 32. *L. monocytogenes* izolatlarının mevsimsel dağılımı

Dönem	Aylar	Örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı	Yüzde (%)	Mevsim toplamı	Yüzde (%)
Kış	Aralık	36	-	-	-	-
	Ocak	36	-	-	-	-
	Şubat	36	-	-	-	-
Yaz	Mayıs	36	-	-	-	-
	Haziran	36	1	2,78	2	1,86
	Temmuz	36	1	2,78		

4.2.3 Silaj ve Silaj Suyunda *Listeria monocytogenes*' in İzolasyonu

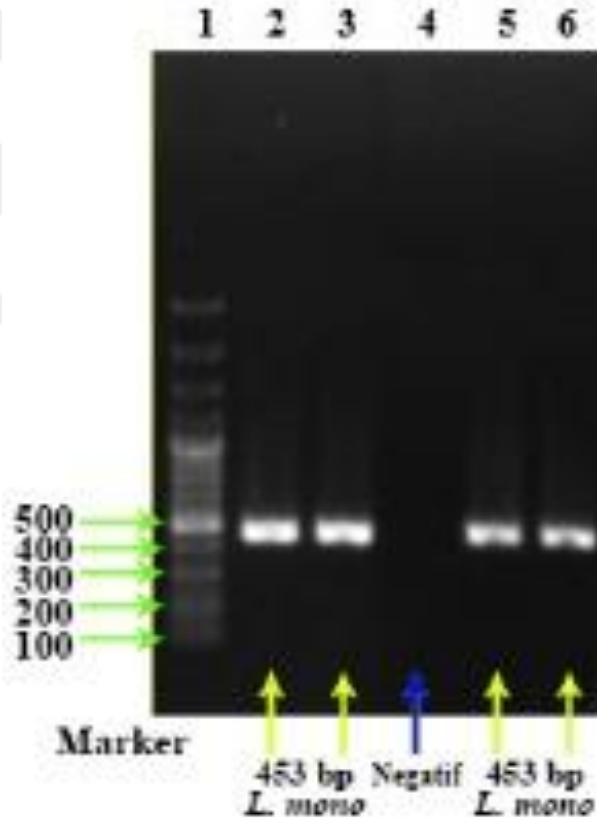
Çevresel örnekleme içine alınabilecek bu çeşit örneklerde hem silajların hazırlanması hem de silajların işletmelerdeki süt sığırlarına verilmesi sırasında *L. monocytogenes* izole edilmedi.

4.2.4 Silaj ve Silaj Suyu Dışındaki Örneklerde *Listeria monocytogenes*' in İzolasyonu

Fekal örnek, meme yıkantı, süt ve süt tankı örneklerinden oluşan bu örnekler profilinde, fekal örnek ve süt örneklerinin tümünden *L. monocytogenes* izole edilmezken, farklı işletmelerin örnekleri olmak üzere 1 (% 0,46) meme yıkantı ve 1 (% 0,46) süt tankı örneklerinden *L. monocytogenes* izole edildi. Her iki izolat yaz dönemine ait idi.

4.3. *Listeria* türlerinin Multipleks PCR Sonuçları

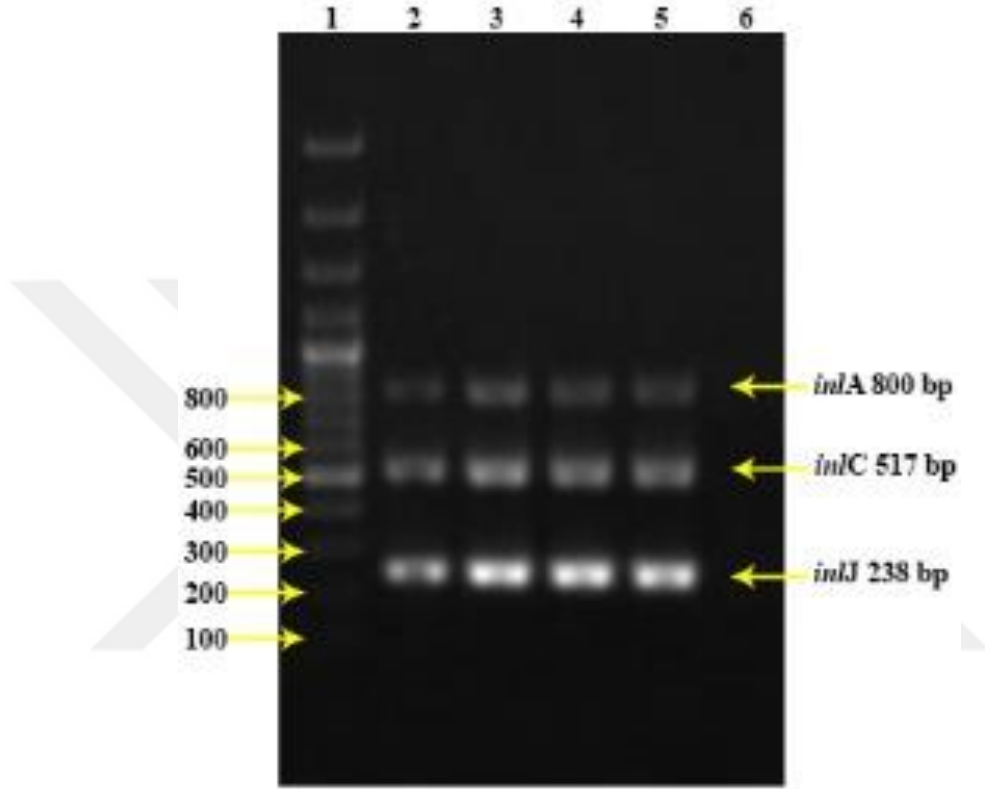
RTi-PCR analizinde pozitif bulunup, ardından ALOA katı besi yerine ekimi yapılan ve inkübasyon sonunda haleli, turkuaz renkteki şüpheli kolonilerin multipleks PCR analizinde 2 izolat istenen 453 bp'lik fragment görüntülerini verdi (Resim 11).



Resim 11. Kromojenik katı besi yerinde haleli *L. monocytogenes* şüpheli koloniden yapılan ve sonucu pozitif vermiş mPCR' in görüntüsü 1-Marker (1500 bp) 2- Kavak meme yıkantı /Haziran 3- Kavak meme yıkantı / Haziran 4-Negatif kontrol 5- Bafra-1 Süt Tankı / Temmuz 6- Bafra-1 Süt Tankı / Temmuz

4.4. *L.monocytogenes* İzolatlarının Multipleks PCR ile Virulens Analiz Sonuçları

Meme yıkantısı ve süt tankından izole edilen iki adet *L. monocytogenes* izolatlarının virulens analizinde her iki izolatta üç internalin genlerinin (*inlA*, *inlC*, *inlJ*) tümü tespit edildi (Resim 12).



Resim 12. 1-Marker, 2- Kavak meme yıkantı /Haziran, 3- Kavak meme yıkantı /Haziran, 4- Bafra-1 Süt Tankı / Temmuz,, 5- Bafra-1 Süt Tankı / Temmuz, 6- Negatif kontrol

4.5. Silaj Yeminin Hazırlanması Sırasında pH'ının ve İzolasyondaki Etkileri

Bu aşamanın örnekleri Ağustos ayı sonu ile Eylül ayı sonu arasındaki bir dönemde alındı. Silaj yeminin hazırlanması sırasında 3 farklı zamanda (0., 15. ve 30. gün) 6 ayrı noktadan alınan silaj örneklerinden yapılan pH ölçümlerine göre ortalama olarak tüm silajlar başlangıç günü olan 0. günden 30. güne kadar olgunlaşmayı sağladı.

Buna göre tüm örneklerde 0. günde 6,5 olan pH değeri, 30. günde 4,5 ve altına geriledi.

Örnek alınan 6 işletmede 4'ünde pH değeri 30 gün içerisinde istenen 4 ve 4' ün altına geriledi. Ancak bir işletmeye ait (Amasya) silajda pH değeri 30. günde 3

değerinin altındaydı. İşletmelerin biri (Tokat) dışında tüm işletmelerde silajda olgunlaşma istenen pH-zaman grafiğini verdi. Tokat işletmesinde ise izlenemeyen bu grafikte 0. günde 6,5 olan pH değeri 15 gün içerisinde yalnızca 6,4'e inerek yatay seyir gösterirken, 30 gün sonunda beklenen 4 değerine geriledi.

Silaj olgunlaşmasının 15. gününde yapılan pH ölçümlerinde en yüksek pH değeri 6,4 ile Tokat'ta, en düşük pH değeri 3,0 ile Bafra-2 ölçülürken, olgunlaşmanın 30. gününde en yüksek pH değeri 4,2 ile Bafra-3, en düşük pH değeri ise 2,7 ile Amasya işletmesinde ölçüldü.

Bu arada silaj yapım aşamasındaki örneklemeler sırasında en iyi sıkıştırılmaların 30. günde pH değerinin tüm işletme ölçümlerinde minimum değerde gözükene 2,7 değeri ile Amasya işletmesinde yapıldığı gözlemlendi ve bu minimum pH değerine sahip silaj suyu örneklerinde *Listeria* spp. izolasyonu yapılamadı.

USDA-FSIS ve karşılaştırması yapılan modifiye USDA-FSIS ile analiz edilen silaj yeminin hazırlanmasında yapılan örneklerin tümünde *L. monocytogenes* tespit edilemedi.

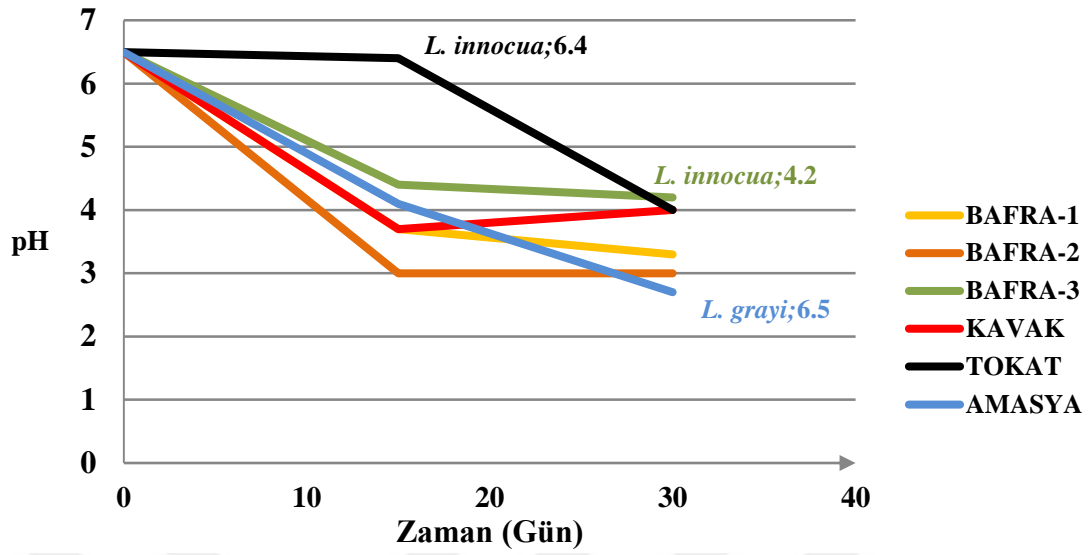
Silaj yeminin hazırlanmasının ilk aşaması 0. gün örneklerinde pH değeri 6,5 olan Amasya dışında tüm örneklerden *Listeria* spp. izole edilemedi. Bu aşamada Amasya işletmesinden izole edilen tür *L. grayi* oldu.

Olgunlaşmanın 15. gününde izolasyon yapılabilen tek işletme olan Tokat işletmesinde pH değeri 6,4 idi. Son örnekleme yapılan olgunlaşmanın 30. gününde ise pH değeri 4,2 olan Bafra-3 işletmesinden *L. innocua* izole edilebildi.

Yalnızca iki işletmede (Bafra-2 ve Kavak) 15. günden sonra minimum pH değerlerinden sonra pH değerinde artış görüldü. Bafra-2 işletmesinde pH 3,0 değeri altına kadar gerileme görüldü ve bu değer 30 gün sonuna kadar sabit kaldı. Kavak işletmesi ise 3,7 değerinden aynı süre zarfında 4,0 değerine yükseldi. Bu iki işletmenin (Bafra-2 ve Kavak) 15. ve 30. gün örneklerinin hiçbirinden *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri izole edilemedi.

İki adet *L. innocua*'nın izolasyon pH değerleri 4,0' dan yukarıda olup, 4,2 ve 6,4' dü. Buna göre silaj yapım aşamasında izolasyon yapılabilen en düşük pH değeri 4,2 olarak gerçekleşti.

Silaj yeminin hazırlanması sırasında pH Değişimleri ve pH değerlerinde izolatların pH noktaları Şekil 11'de gösterilmiştir.



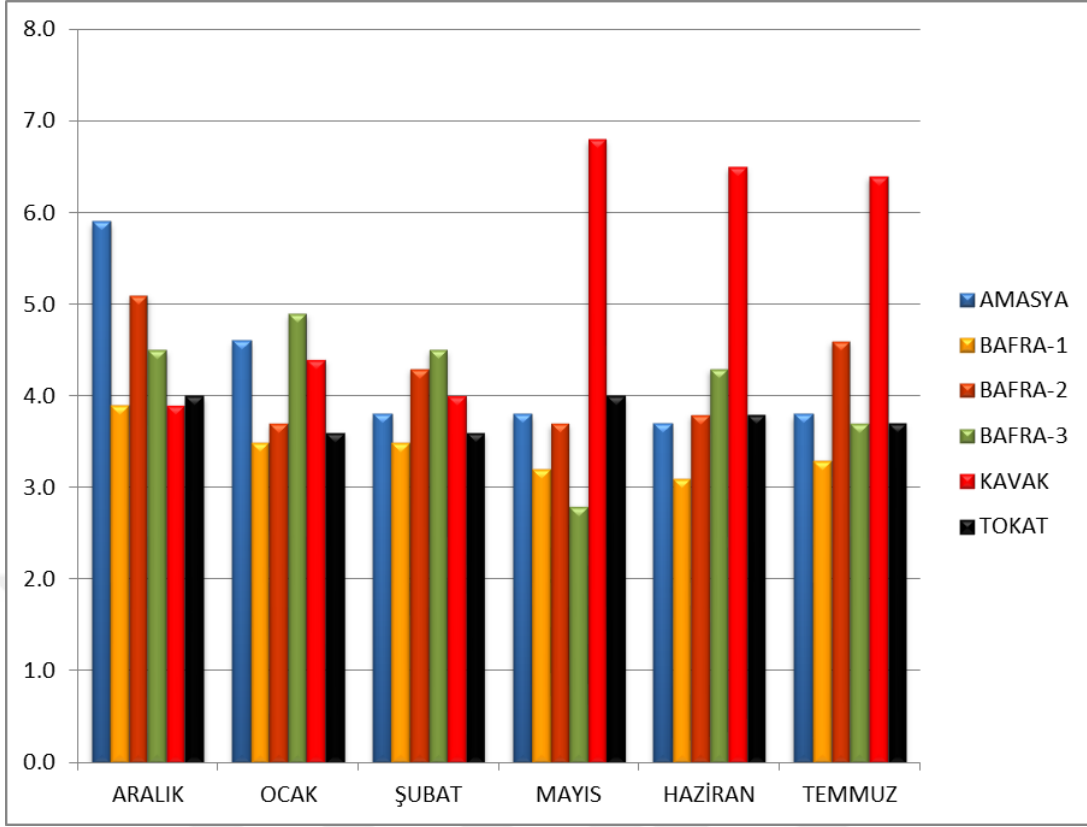
Şekil 11. pH-zaman grafiğinde silaj yeminin hazırlanması sırasında 3 farklı zamanda alınan silaj örneklerinden elde edilen izolatlar

4.6. Süt Sığırlarına Verilen Silajlarda pH Aralığı ve *Listeria* spp.

İzolasyonu

Olgunlaşmış silajların süt sığırlarına verilmeye başlandığı günden sonra süt sığır işletmelerinde silaj suyunun pH ölçümleri yapıldı. Ay bazında elde edilen pH verileri Şekil 12’de verilmiştir.

İncelenen tüm silaj ve silaj suyu örneklerinden *L. monocytogenes* izole edilemedi, ancak *Listeria* spp. içinde izole edilen tek tür *L. innocua* oldu.



Şekil 12. İşletmelerde silajda 6 ay içindeki pH değişim grafiği

Buna göre Kavak dışında tüm işletmelerin silaj suyu pH değerleri azalan bir eğilim gösterdi. İlk ay olan Aralık ayında en yüksek pH değeri 5,9 ile Amasya işletmesinde iken, aynı ayda en düşük pH değeri 3,9 ile Bafra-1 ve Kavak işletmeleri silaj sularında ölçüldü. Yine Aralık ayında istenen 4,0 altında pH değerini sağlamayan işletmeler Bafra-2, Bafra-3 ve Amasya işletmeleri oldu. En düşük 3,9 değeri ölçülen Bafra-1 işletmesi silaj suyundan *L. innocua* izole edildi.

Aralık-Şubat arası olan ilk dönem tüm örnekler pH ölçümlerinde azalan değer gösterdi ve bu değerler Bafra-2 işletmesinde 4,3 ile en yüksek, 3,5 ile Bafra-1 işletmesinde en düşük değerlere kadar geriledi. Kış dönemi örneklerinde yalnızca üç işletmeden izolasyon sağlandı; 3,6 değerinde Tokat, 4,0 değerinde Kavak ve 4,3 pH değerlerindeki Bafra-2 örneklerinden elde edilen isolatlar sadece *L. innocua* idi.

Yaz döneminin ilk ayı olan Mayıs ayı pH değerleri 2,8–6,8 arasında idi. Örnek alınmayan Şubat-Mayıs arasındaki süre zarfında işletmelerin 3'ünde (Bafra-1, Bafra-2, Bafra-3) pH değeri yükselirken, 1'inde (Amasya) değişmedi ve diğer 2'sinde (Kavak ve Tokat) düştü.

Mayıs-Temmuz arası olan yaz döneminde 4 işletmede pH değerleri (Amasya / 3,8 - 3,7 - 3,8; Tokat / 4,0 - 3,8 - 3,7; Kavak / 6,8 - 6,5 - 6,4; Bafra-1 / 3,2 - 3,1 -3,2) yaklaşık olarak yatay bir seyir gösterirken, diğer 2 işletmede (Bafra-3 / 2,8 - 4,3 - 3,7; Bafra-2 / 3,7-3,8-4,6) yükselen değer gösterdi.

En yüksek pH aralığı (5,9-3,8) veren Amasya işletmesinde izolasyon olmazken, en düşük pH aralığı (4,0-3,7) veren Tokat işletmesinin örneklerinden yalnızca Şubat ayında ve pH 3,6 değeri ölçülen silaj ve silaj suyundan iki izolat elde edildi.

İlk üç aylık kış döneminde en fazla izolat sayısı 3,9-4,0 pH aralığındaki Kavak işletmesinde 3 idi. Ölçülen pH aralığı 5,9-3,8 olan Amasya ve yaklaşık 4,5 pH değeri olan Bafra-3 işletmesinde *Listeria* spp. edilemedi.

Kış döneminde alınan tüm silaj suyu örneklerinde yapılan pH ölçümlerinde pH değeri 3,5-5,9 aralığında oldu. Buna göre 3,5-3,6 arasındaki pH değerinde alınan örneklerden *Listeria* spp. izolasyonu olmazken; 3,6-4,4 aralığında izolat sayısı 7 / 36 (% 19,4) idi. Sonraki pH aralığı olan 4,5-4,9 bölgesinde yine izolasyon olmazken; 5,1-5,9 pH bölgesinde bu sayı 1 / 36 (% 2,78) olarak tespit edildi ve tüm izolatlar sadece *L. innocua* oldu.

Kış döneminde izolatlar pH olarak 3,6-4,4 aralığında yoğunluk gösterdi. Sadece bu dönemde 8 izolatın 7' si (% 87,5) bu pH aralığında izole edilebildi (Tablo 33).

Tablo 33. Kış döneminde işletme silaj ve silaj sularının sıralama ile pH izolasyon noktaları

İşletme	Ay	pH	Silaj	Silaj suyu
Bafra-1	Ocak	3,5	Negatif	Negatif
Bafra-1	Şubat	3,5	Negatif	Negatif
Tokat	Ocak	3,6	Negatif	Negatif
Tokat	Şubat	3,6	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
Bafra-2	Ocak	3,7	Negatif	Negatif
Amasya	Şubat	3,8	Negatif	Negatif
Bafra-1	Aralık	3,9	Negatif	<i>L. innocua</i>
Kavak	Aralık	3,9	Negatif	Negatif
Kavak	Şubat	4	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>
Tokat	Aralık	4	Negatif	Negatif
Bafra-2	Şubat	4,3	<i>L. innocua</i>	Negatif
Kavak	Ocak	4,4	Negatif	<i>L. innocua</i>
Bafra-3	Aralık	4,5	Negatif	Negatif
Bafra-3	Şubat	4,5	Negatif	Negatif
Amasya	Ocak	4,6	Negatif	Negatif
Bafra-3	Ocak	4,9	Negatif	Negatif
Bafra-2	Aralık	5,1	<i>L. innocua</i>	Negatif
Amasya	Aralık	5,9	Negatif	Negatif

Yaz döneminde ise (Mayıs-Haziran-Temmuz) alınan tüm örneklerde (silaj suyu) ölçülen pH aralığı 3,1-6,8 oldu. Buna göre 3,1-4,0 arasındaki pH değerindeki örneklerde *Listeria* spp. izolasyonu olmazken; 4,3-6,8 aralığında izolat sayısı yine 7/36 (% 19,4) idi ve tüm izolatlar sadece *L. innocua* oldu. Burada izolasyon yapılamayan işletme sadece pH değeri 4,3-6,8 aralığındaki Bafra-2'de olurken ve bu işletmenin izolasyon yapılamayan zamanı pH değerinin 4,6 ve sıcaklık değerlerinin yüksek değerlerde seyrettiği Temmuz ayı idi.

Yaz döneminde tüm işletmelerde ölçülen pH değerleri 3,1-6,8 gibi geniş bir aralıkta olmasında rağmen, izolatların yığıldığı pH aralığı 4,3-6,8 idi. Bu aralıktaki izolat sayısı 7 (% 100) adetti (Tablo 34).

Tablo 34. Yaz döneminde işletme silaj ve silaj sularının sıralama ile pH izolasyon noktaları

İşletme	Ay	pH	Silaj	Silaj suyu
Bafra-1	Haziran	3,1	Negatif	Negatif
Bafra-1	Mayıs	3,2	Negatif	Negatif
Bafra-1	Temmuz	3,3	Negatif	Negatif
Bafra-3	Mayıs	3,6	Negatif	Negatif
Bafra-2	Mayıs	3,7	Negatif	Negatif
Amasya	Haziran	3,7	Negatif	Negatif
Bafra-3	Temmuz	3,7	Negatif	Negatif
Tokat	Temmuz	3,7	Negatif	Negatif
Amasya	Mayıs	3,8	Negatif	Negatif
Bafra-2	Haziran	3,8	Negatif	Negatif
Tokat	Haziran	3,8	Negatif	Negatif
Amasya	Temmuz	3,8	Negatif	Negatif
Tokat	Mayıs	4	Negatif	Negatif
Bafra-3	Haziran	4,3	<i>L .innocua</i>	<i>L .innocua</i>
Bafra-2	Temmuz	4,6	Negatif	Negatif
Kavak	Temmuz	6,4	<i>L .innocua</i>	<i>L .innocua</i>
Kavak	Haziran	6,5	<i>L .innocua</i>	<i>L .innocua</i>
Kavak	Mayıs	6,8	Negatif	<i>L .innocua</i>

4.7. Konvansiyonel ve Modifiye Analizlerin Karşılaştırması

Tüm analizlerde konvansiyonel ve Modifiye analiz metotları istenen sonuçları verdi. Konvansiyonel USDA-FSIS analizlerinde *L. monocytogenes* izole edilmeyen tüm örneklerde (silaj, silaj suyu, fekal örnek ve meme yıkantı) Modifiye USDA-FSIS metodundaki sonuçlar paraleldi. Aynı paralel sonuçlar süt ve süt tankı örneklerinde de ISO 11290-2 metotlarında da tespit edildi.

Haziran ayında Kavak işletmesinin meme yıkantı örneğinden ve Temmuz ayında Bafra-1 işletmesinden alınan süt tankı örneğinden *L. monocytogenes* izole edildi. Konvansiyonel analiz ile elde edilen izolasyonlar, Modifiye analiz metotlarında da paralel şekillendi. Bu belirtilen pozitifliklerle *L. monocytogenes*' in izolasyon oranı 2/216 (% 0,93) oldu.

Modifiye USDA-FSIS analiz metodunda kış ve yaz dönemleri örneklerinden

30 °C ve 20-24 saat olan UVM sıvı besi yerindeki ilk zenginleştirme sonrası 0,1 mL pasaj yapılmış ve 18-24 saat 35 °C inkübe edilmiş ikinci zenginleştirme sıvı besi yeri olan MOPS-BLEB besi yerinden yapılan Real Time PCR analizinde elde edilen Cq değerleri Tablo 35 ve Tablo 36'daki gibi tespit edilmiştir.

Tabloya 37' ye göre en küçük değer yaz dönemi Haziran ayında Kavak işletmesinin meme yıkantı örneklemeinden elde edildi ve değeri 25,6 olarak *L. monocytogenes* izolasyonunu da sağladı. En yüksek değer ise 37,7 ile Bafra-1 işletmesinin silaj suyu örneğinde oldu ve bu örnekte *L. monocytogenes* izolasyonu olmadı. İzolasyon sağlayan diğer örnek olan Bafra-1 işletmesinin süt tankı örneğinde ise Cq değeri 30 idi. Diğer tüm örneklerde (kış ve yaz dönemi örnekleri) belirtilen Cq değer aralığında *L. monocytogenes* izolasyonu olmadı.

Belirtilen iki örneğin (Kavak / Meme yıkantı / Haziran ve Bafra-1 / Süt Tankı / Temmuz) Cq değerleri aralığında (25,6-28,7) Kavak ve Amasya işletmelerinin silaj, silaj suyu meme yıkantı, süt örneklerinden oluşan 5 örnek daha olsa da, bunlar *L. monocytogenes*' de hem konvansiyonel metotlarla analizde negatif sonuç verdi, hem de Modifiye analiz metotlarında düşük Cq değerlerine sahip olmalarına rağmen ALOA kromojenik katı besi yerinde üreme gerçekleştirmedi.

Cq değerleri 30' dan sonra 37,7' ye kadar olan 71 örnekte *L. monocytogenes* yönünden MOPS-BLEB sıvı besi yerinde şüpheli görünüm (renk olarak biraz açık) 3 örnek (Tokat / Fekal içerik/ Haziran; Kavak / Silaj / Temmuz ve Kavak / Silaj suyu / Temmuz) dışında oluşmadı. Ancak bu 3 örnek konvansiyonel metotta *L. monocytogenes* izolasyonu da sağlamadı ve bunlar *L. innocua* olarak identifiye edildi.

Tablo 35. Kış dönemi RTi-PCR örneklerinin sonuçları

ARALIK			OCAK			ŞUBAT		
İşletme	Örnek	Cq	İşletme	Örnek	Cq	İşletme	Örnek	Cq
Bafra-1	Silaj	-	Bafra-1	Silaj	-	Bafra-1	Silaj	-
Bafra-1	Silaj suyu	-	Bafra-1	Silaj suyu	-	Bafra-1	Silaj suyu	-
Bafra-1	Fekal örnek	-	Bafra-1	Fekal örnek	-	Bafra-1	Fekal örnek	-
Bafra-1	Meme	34,7	Bafra-1	Meme yıkantı	-	Bafra-1	Meme yıkantı	36,7
Bafra-1	Süt	-	Bafra-1	Süt	-	Bafra-1	Süt	-
Bafra-1	Süt tankı	-	Bafra-1	Süt tankı	-	Bafra-1	Süt tankı	-
Bafra-2	Silaj	-	Bafra-2	Silaj	-	Bafra-2	Silaj	34,9
Bafra-2	Silaj suyu	-	Bafra-2	Silaj suyu	-	Bafra-2	Silaj suyu	32,7
Bafra-2	Fekal örnek	-	Bafra-2	Fekal örnek	-	Bafra-2	Fekal örnek	35,7
Bafra-2	Meme	-	Bafra-2	Meme yıkantı	-	Bafra-2	Meme yıkantı	33,3
Bafra-2	Süt	-	Bafra-2	Süt	-	Bafra-2	Süt	-
Bafra-2	Süt tankı	-	Bafra-2	Süt tankı	-	Bafra-2	Süt tankı	-
Bafra-3	Silaj	-	Bafra-3	Silaj	-	Bafra-3	Silaj	-
Bafra-3	Silaj suyu	-	Bafra-3	Silaj suyu	-	Bafra-3	Silaj suyu	-
Bafra-3	Fekal örnek	-	Bafra-3	Fekal örnek	-	Bafra-3	Fekal örnek	-
Bafra-3	Meme	-	Bafra-3	Meme yıkantı	-	Bafra-3	Meme yıkantı	37,2
Bafra-3	Süt	-	Bafra-3	Süt	-	Bafra-3	Süt	-
Bafra-3	Süt tankı	-	Bafra-3	Süt tankı	-	Bafra-3	Süt tankı	-
Kavak	Silaj	-	Kavak	Silaj	-	Kavak	Silaj	30
Kavak	Silaj suyu	-	Kavak	Silaj suyu	-	Kavak	Silaj suyu	-
Kavak	Fekal örnek	-	Kavak	Fekal örnek	34.8	Kavak	Fekal örnek	-
Kavak	Meme	-	Kavak	Meme yıkantı	35.3	Kavak	Meme yıkantı	-
Kavak	Süt	-	Kavak	Süt	-	Kavak	Süt	-
Kavak	Süt tankı	-	Kavak	Süt tankı	-	Kavak	Süt tankı	-
Tokat	Silaj	-	Tokat	Silaj	-	Tokat	Silaj	-
Tokat	Silaj suyu	-	Tokat	Silaj suyu	-	Tokat	Silaj suyu	-
Tokat	Fekal örnek	34,3	Tokat	Fekal örnek	-	Tokat	Fekal örnek	-
Tokat	Meme	-	Tokat	Meme yıkantı	-	Tokat	Meme yıkantı	-
Tokat	Süt	-	Tokat	Süt	-	Tokat	Süt	-
Tokat	Süt tankı	-	Tokat	Süt tankı	-	Tokat	Süt tankı	-
Amasya	Silaj	-	Amasya	Silaj	-	Amasya	Silaj	-
Amasya	Silaj suyu	-	Amasya	Silaj suyu	-	Amasya	Silaj suyu	-
Amasya	Fekal örnek	-	Amasya	Fekal örnek	-	Amasya	Fekal örnek	-
Amasya	Meme	-	Amasya	Meme yıkantı	-	Amasya	Meme yıkantı	-
Amasya	Süt	-	Amasya	Süt	-	Amasya	Süt	-
Amasya	Süt tankı	-	Amasya	Süt tankı	-	Amasya	Süt tankı	-

Tablo 36. Yaz dönemi RTi-PCR örneklerinin sonuçları

MAYIS			HAZİRAN			TEMMUZ		
İşletme	Örnek	Cq	İşletme	Örnek	Cq	İşletme	Örnek	Cq
Bafra-1	Silaj	-	Bafra-1	Silaj	-	Bafra-1	Silaj	-
Bafra-1	Silaj suyu	-	Bafra-1	Silaj suyu	-	Bafra-1	Silaj suyu	-
Bafra-1	Fekal örnek	-	Bafra-1	Fekal örnek	-	Bafra-1	Fekal örnek	-
Bafra-1	Meme yıkantı	-	Bafra-1	Meme yıkantı	-	Bafra-1	Meme yıkantı	-
Bafra-1	Süt	-	Bafra-1	Süt	-	Bafra-1	Süt	-
Bafra-1	Süt tankı	-	Bafra-1	Süt tankı	-	Bafra-1	Süt tankı	-
Bafra-2	Silaj	37,4	Bafra-2	Silaj	37,4	Bafra-2	Silaj	37,4
Bafra-2	Silaj suyu	34,8	Bafra-2	Silaj suyu	34,8	Bafra-2	Silaj suyu	34,8
Bafra-2	Fekal örnek	36,4	Bafra-2	Fekal örnek	36,4	Bafra-2	Fekal örnek	36,4
Bafra-2	Meme yıkantı	36,6	Bafra-2	Meme yıkantı	36,6	Bafra-2	Meme yıkantı	36,6
Bafra-2	Süt	-	Bafra-2	Süt	-	Bafra-2	Süt	-
Bafra-2	Süt tankı	36,4	Bafra-2	Süt tankı	36,4	Bafra-2	Süt tankı	36,4
Bafra-3	Silaj	-	Bafra-3	Silaj	-	Bafra-3	Silaj	-
Bafra-3	Silaj suyu	-	Bafra-3	Silaj suyu	-	Bafra-3	Silaj suyu	-
Bafra-3	Fekal örnek	-	Bafra-3	Fekal örnek	-	Bafra-3	Fekal örnek	-
Bafra-3	Meme yıkantı	-	Bafra-3	Meme yıkantı	-	Bafra-3	Meme yıkantı	-
Bafra-3	Süt	-	Bafra-3	Süt	-	Bafra-3	Süt	-
Bafra-3	Süt tankı	-	Bafra-3	Süt tankı	-	Bafra-3	Süt tankı	-
Kavak	Silaj	-	Kavak	Silaj	-	Kavak	Silaj	-
Kavak	Silaj suyu	33,8	Kavak	Silaj suyu	33,8	Kavak	Silaj suyu	33,8
Kavak	Fekal örnek	34,5	Kavak	Fekal örnek	34,5	Kavak	Fekal örnek	34,5
Kavak	Meme yıkantı	28,7	Kavak	Meme yıkantı	28,7	Kavak	Meme yıkantı	28,7
Kavak	Süt	26,7	Kavak	Süt	26,7	Kavak	Süt	26,7
Kavak	Süt tankı	-	Kavak	Süt tankı	-	Kavak	Süt tankı	-
Tokat	Silaj	35,3	Tokat	Silaj	35,3	Tokat	Silaj	35,3
Tokat	Silaj suyu	-	Tokat	Silaj suyu	-	Tokat	Silaj suyu	-
Tokat	Fekal örnek	35,7	Tokat	Fekal örnek	35,7	Tokat	Fekal örnek	35,7
Tokat	Meme yıkantı	36,2	Tokat	Meme yıkantı	36,2	Tokat	Meme yıkantı	36,2
Tokat	Süt	-	Tokat	Süt	-	Tokat	Süt	-
Tokat	Süt tankı	36,9	Tokat	Süt tankı	36,9	Tokat	Süt tankı	36,9
Amasya	Silaj	33,8	Amasya	Silaj	33,8	Amasya	Silaj	33,8
Amasya	Silaj suyu	37,7	Amasya	Silaj suyu	37,7	Amasya	Silaj suyu	37,7
Amasya	Fekal örnek	-	Amasya	Fekal örnek	-	Amasya	Fekal örnek	-
Amasya	Meme yıkantı	35,9	Amasya	Meme yıkantı	35,9	Amasya	Meme yıkantı	35,9
Amasya	Süt	-	Amasya	Süt	-	Amasya	Süt	-
Amasya	Süt tankı	-	Amasya	Süt tankı	-	Amasya	Süt tankı	-

İşletmelerden yapılan tüm örneklemelerin RTi-PCR analizinde elde edilen Cq değerlerinin küçükten büyüğe sıralaması Tablo 37’de verilmiştir.

Tablo 37. İşletme örneklerinin RTi-PCR analizi Cq değerlerine göre sıralaması

No	İşletme	Örnek	Cq	No	İşletme	Örnek	Cq
1	Kavak	Meme yıkantı	25,6	40	Bafra-2	Fekal örnek	35,7
2	Kavak	Süt	26,7	41	Tokat	Fekal örnek	35,7
3	Kavak	Silaj suyu	26,7	42	Amasya	Meme yıkantı	35,9
4	Amasya	Silaj	28	43	Kavak	Fekal örnek	35,9
5	Kavak	Meme yıkantı	28,7	44	Tokat	Silaj	35,9
6	Kavak	Silaj	30	45	Amasya	Fekal örnek	35,9
7	Bafra-1	Süt tankı	30	46	Bafra-3	Silaj	36
8	Bafra-3	Meme yıkantı	32,5	47	Kavak	Silaj suyu	36
9	Bafra-3	Meme yıkantı	32,5	48	Bafra-3	Silaj	36
10	Bafra-2	Silaj suyu	32,7	49	Amasya	Silaj suyu	36,1
11	Bafra-2	Meme yıkantı	33,3	50	Tokat	Meme yıkantı	36,2
12	Tokat	Meme yıkantı	33,6	51	Bafra-2	Süt tankı	36,3
13	Amasya	Süt tankı	33,6	52	Tokat	Silaj suyu	36,3
14	Bafra-2	Meme yıkantı	33,7	53	Bafra-2	Süt tankı	36,3
15	Bafra-2	Meme yıkantı	33,7	54	Bafra-2	Fekal örnek	36,4
16	Kavak	Silaj suyu	33,8	55	Bafra-2	Süt tankı	36,4
17	Amasya	Silaj	33,8	56	Kavak	Silaj	36,4
18	Kavak	Fekal örnek	33,9	57	Bafra-2	Süt	36,5
19	Bafra-1	Meme yıkantı	34	58	Bafra-3	Silaj suyu	36,5
20	Bafra-2	Fekal örnek	34,2	59	Bafra-2	Süt	36,5
21	Bafra-2	Fekal örnek	34,2	60	Bafra-3	Silaj suyu	36,5
22	Tokat	Fekal örnek	34,3	61	Tokat	Silaj	36,5
23	Tokat	Süt	34,3	62	Bafra-2	Meme yıkantı	36,6
24	Kavak	Fekal örnek	34,5	63	Bafra-1	Meme yıkantı	36,7
25	Amasya	Meme yıkantı	34,6	64	Amasya	Silaj	36,7
26	Bafra-1	Meme yıkantı	34,7	65	Amasya	Silaj suyu	36,7
27	Kavak	Fekal örnek	34,8	66	Bafra-1	Süt	36,7
28	Bafra-2	Silaj suyu	34,8	67	Bafra-3	Süt tankı	36,8
29	Tokat	Silaj suyu	34,8	68	Bafra-3	Süt tankı	36,8
30	Bafra-2	Silaj	34,9	69	Tokat	Süt tankı	36,9
31	Kavak	Meme yıkantı	34,9	70	Amasya	Süt tankı	36,9
32	Bafra-3	Fekal örnek	35	71	Kavak	Süt	36,9
33	Tokat	Fekal örnek	35	72	Bafra-3	Meme yıkantı	37,2
34	Amasya	Süt	35	73	Amasya	Fekal örnek	37,3
35	Bafra-3	Fekal örnek	35	74	Bafra-2	Silaj	37,4
36	Kavak	Meme yıkantı	35,3	75	Tokat	Süt tankı	37,5
37	Tokat	Silaj	35,3	76	Amasya	Silaj suyu	37,7
38	Amasya	Süt	35,3	77	Bafra-1	Silaj suyu	37,7
39	Amasya	Meme yıkantı	35,6				

MOPS-BLEB sıvı besi yeri zenginleştirmelerinden yapılan kış ve yaz ayı örneklemeleri RTi-PCR analizlerinde negatif dışında sonuç veren örneklerde Cq değerleri küçükten büyüğe olmak şeklinde Tablo 38' de sıralandı.

Tablo 38'e göre Bafra-1 süt tankı (Cq değeri 30) örneğine kadar 7 örneğin 5'i çevresel örnek idi. Düşük Cq değerlerine rağmen izolasyon sağlamayan bu örneklerin tümü yaz dönemi örnekleme idi. İkinci zenginleştirme olan MOPS-BLEB' den yapılan RTi-PCR analizi her ne kadar düşük Cq değeri verse de yaz dönemi olan bu örneklerden yapılan ekimlerde hem modifiye metodun kromojenik katı besi yerinde, hem de konvansiyonel metodun MOX ve Oxford katı besi yerlerinde *L. monocytogenes* izolasyonu sağlamadı.

En iyi Cq değeri 59 / 77 (% 76,6) oranı ile çevresel örneklerde (12 silaj, 13 silaj suyu, 15 fekal örnek, 19 meme yıkantı) görülürken, düşük olarak 18 / 77 (% 23,4) oranı ile süt ve süt ile ilgili örneklerde (8 süt, 10 süt tankı) tespit edildi.

Tablo 38. İşletme örneklerinde RTi-PCR değerlerinin aylar ve mevsimsel ilişkisi

No	İşletme	Örnek	Cq	Ay	No	İşletme	Örnek	Cq	Ay
1*	Kavak	Meme yıkantı	25,6	Haziran	40	Bafra-2	Fekal örnek	35,7	Şubat
2	Kavak	Süt	26,7	Mayıs	41	Tokat	Fekal örnek	35,7	Mayıs
3	Kavak	Silaj suyu	26,7	Temmuz	42	Amasya	Meme yıkantı	35,9	Mayıs
4	Amasya	Silaj	28,0	Temmuz	43	Kavak	Fekal örnek	35,9	Haziran
5	Kavak	Meme yıkantı	28,7	Mayıs	44	Tokat	Silaj	35,9	Haziran
6	Kavak	Silaj	30,0	Şubat	45	Amasya	Fekal örnek	35,9	Temmuz
7*	Bafra-1	Süt tankı	30,0	Temmuz	46	Bafra-3	Silaj	36,0	Haziran
8	Bafra-3	Meme yıkantı	32,5	Haziran	47	Kavak	Silaj suyu	36,0	Haziran
9	Bafra-3	Meme yıkantı	32,5	Temmuz	48	Bafra-3	Silaj	36,0	Temmuz
10	Bafra-2	Silaj suyu	32,7	Şubat	49	Amasya	Silaj suyu	36,1	Temmuz
11	Bafra-2	Meme yıkantı	33,3	Şubat	50	Tokat	Meme yıkantı	36,2	Mayıs
12	Tokat	Meme yıkantı	33,6	Haziran	51	Bafra-2	Süt tankı	36,3	Haziran
13	Amasya	Süt tankı	33,6	Temmuz	52	Tokat	Silaj suyu	36,3	Haziran
14	Bafra-2	Meme yıkantı	33,7	Haziran	53	Bafra-2	Süt tankı	36,3	Temmuz
15	Bafra-2	Meme yıkantı	33,7	Temmuz	54	Bafra-2	Fekal örnek	36,4	Mayıs
16	Kavak	Silaj suyu	33,8	Mayıs	55	Bafra-2	Süt tankı	36,4	Mayıs
17	Amasya	Silaj	33,8	Mayıs	56	Kavak	Silaj	36,4	Temmuz
18	Kavak	Fekal örnek	33,9	Temmuz	57	Bafra-2	Süt	36,5	Haziran
19	Bafra-1	Meme yıkantı	34,0	Temmuz	58	Bafra-3	Silaj suyu	36,5	Haziran
20	Bafra-2	Fekal örnek	34,2	Haziran	59	Bafra-2	Süt	36,5	Temmuz
21	Bafra-2	Fekal örnek	34,2	Temmuz	60	Bafra-3	Silaj suyu	36,5	Temmuz
22	Tokat	Fekal örnek	34,3	Aralık	61	Tokat	Silaj	36,5	Temmuz
23	Tokat	Süt	34,3	Haziran	62	Bafra-2	Meme yıkantı	36,6	Mayıs
24	Kavak	Fekal örnek	34,5	Mayıs	63	Bafra-1	Meme yıkantı	36,7	Şubat
25	Amasya	Meme yıkantı	34,6	Temmuz	64	Amasya	Silaj	36,7	Haziran
26	Bafra-1	Meme yıkantı	34,7	Aralık	65	Amasya	Silaj suyu	36,7	Haziran
27	Kavak	Fekal örnek	34,8	Ocak	66	Bafra-1	Süt	36,7	Temmuz
28	Bafra-2	Silaj suyu	34,8	Mayıs	67	Bafra-3	Süt tankı	36,8	Haziran
29	Tokat	Silaj suyu	34,8	Temmuz	68	Bafra-3	Süt tankı	36,8	Temmuz
30	Bafra-2	Silaj	34,9	Şubat	69	Tokat	Süt tankı	36,9	Mayıs
31	Kavak	Meme yıkantı	34,9	Temmuz	70	Amasya	Süt tankı	36,9	Haziran
32	Bafra-3	Fekal örnek	35,0	Haziran	71	Kavak	Süt	36,9	Temmuz
33	Tokat	Fekal örnek	35,0	Haziran	72	Bafra-3	Meme yıkantı	37,2	Şubat
34	Amasya	Süt	35,0	Haziran	73	Amasya	Fekal örnek	37,3	Haziran
35	Bafra-3	Fekal örnek	35,0	Temmuz	74	Bafra-2	Silaj	37,4	Mayıs
36	Kavak	Meme yıkantı	35,3	Ocak	75	Tokat	Süt tankı	37,5	Temmuz
37	Tokat	Silaj	35,3	Mayıs	76	Amasya	Silaj suyu	37,7	Mayıs
38	Amasya	Süt	35,3	Temmuz	77	Bafra-1	Silaj suyu	37,7	Temmuz
39	Amasya	Meme yıkantı	35,6	Haziran					

*Koyu renkle yazılanlar örneklerde *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmıştır.

4.8. İstatistiksel değerlendirmeler

L. monocytogenes' de Risk Noktaları Değerlendirmeleri

Tablo 39'da gösterildiği gibi yapılan risk değerlendirmelerinde silaj suyu pH değeri 4,5 ve üzeri olanlarda pozitiflik oranı % 29,6 bulunurken, pH değeri 4,5 altında olanlarda bu oran % 15,9 olarak tespit edildi. Silaj suyu pH değeri 4,5 ve üzeri olanların olmayanlara göre *Listeria* spp. pozitiflik riski 2,23 kat pozitiflik riski taşıdığı tespit edildi.

Tablo 39. Silaj suyundaki pH' nın *Listeria* spp. pozitif olan silaj ve silaj suyu örnekleri ile ilişkisi

	<i>Listeria</i> spp. pozitif silaj /silaj suyu; % n	Tahmini risk oranı	% 95 güven aralığı
<i>Listeria</i> spp, Silaj suyu			
pH \geq 4,5			
Evet	8/27 (29,6)	2,23	0,768-6,488
Hayır	10/63 (15,9)		

Silaj-fekal örnek ilişkisinde *Listeria* spp. oranı silajda pozitiflik oranı % 57,1, *Listeria* spp. negatiflik oranı % 27,6 olarak elde edilmiştir. *Listeria* spp. pozitif silajların, *Listeria* spp. negatiflere göre 3,5 kat fazla risk taşıdığı görüldü (Tablo 40).

Tablo 40. Örneklerden silajın *Listeria* spp. pozitif fekal örnek ile ilişkisi

	<i>Listeria</i> spp. pozitif fekal örnek % n	Tahmini risk oranı	% 95 güven aralığı
<i>Listeria</i> spp.-Silaj			
Var	4/7 (57,1)		
Yok	8/29 (27,6)	3,500	0,637-19,238

Süt tankı için *Listeria* spp. izole edilen meme yıkantılarının izole edilmeyenlere göre 2,13 kat daha fazla riskli olduğu tespit edildi (Tablo 41).

Tablo 41. *Listeria* spp. pozitiflikte meme yıkantı –süt tankı ilişkisi

	<i>Listeria</i> spp. pozitif- Süt tankı % n	Tahmini risk oranı	% 95 güven aralığı
<i>Listeria</i> spp.-Meme yıkantı			
Var	4/36 (11,1)	2,13	0,648-9,789
Yok	2/36 (5,5)		

Bu analizlerle silaj-silaj suyu, silaj-fekal, süt-süt tankı noktaları arasında risk değerlendirmeleri yapılmış ve risk oranları tespit edilmiştir. Elde edilen risk oranları bu kritik noktaların bulaşmada aktif olarak rol aldıkları sonucuna varılmıştır.

Yapılan istatistiksel analizlerde elde edilen izolat sayılarında mevsimsel olarak fark olmadığı tespit edilirken ($p>0,05$), bulaşma noktaları olarak süt ve fekal noktaların bulaşmada önemli noktalar olduğu analiz edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma iki bölümde gerçekleşti. Çalışmanın ilk bölümünde *Listeria* türlerinin izolasyon ve identifikasyon metotları olarak daha çok yüksek kontamine ve çevresel örneklerde tercih edilen USDA-FSIS analiz metodu ile daha çok gıda ve özellikle süt ürünlerinde kullanılan ISO 11290-1 analiz metodunun 6-7 gün süren analiz sürelerinin kısaltılması amaçlandı. Bunun için metotlara Real-Time PCR eklenerek modifiye edildi ve 3 gün gibi kısa bir süreye düşürüldü ve bu metotların konvansiyonel bu metotlarla karşılaştırılması gerçekleştirildi.

İkinci bölümde; Karadeniz bölgesinde silaj ile yemleme yapılan 6 işletmede silaj yapım aşaması örneklemeleri (silajlık mısır, silaj 15. gün, silaj 30. gün) ve silajların hayvanlara verildiği aşama örneklemeleri (silaj, silaj suyu, fekal örnek, meme yıkantı, süt, süt tankı) yapılarak kritik noktalarda *L. monocytogenes* varlığı araştırılmıştır. Bu bölümde hem konvansiyonel, hem de modifiye analiz metotları ile analiz edilmiş, sonuçları karşılaştırılmıştır.

Elde edilen bulgular ile kritik noktaların birbirleri ile ilişkine bakılmış, izolasyon sırasında izole edilen diğer *Listeria* türleri de değerlendirilmiştir.

Silaj yapım aşamasındaki çalışmalarda 0. günden 30. güne kadar tüm silajlar örneklerinde pH aralığı 6,5-2,7 aralığında ölçülmüştür. Bu aşamadaki *Listeria* spp. izolasyonu 6/18 (% 33,3) olurken, *L. monocytogenes* hiç izole edilmemiştir. Elde edilen 3 izolatın 1'i *L. grayi* iken, diğer 2'si *L. innocua* olmuştur. İki örnek dışında *L. monocytogenes* izole edilememesinin nedenlerden birinin düşük pH olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar ile benzer sonuçlar bildirilmiştir (Fenlon, 1986; Czuprynski, 2005; Nucera ve ark., 2016). Silajda *L. monocytogenes* varlığı üzerine yapılan bir çalışmada 113 çiftlikten 291 silaj örneği, pH değeri 4'den düşük örneklerde %22 düzeyinde *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Grønsto H; 1979) Bunun yanında mikrobiyolojik aktiviteye doğrudan etki edebilecek katkı maddelerinin eklenmemesi de bu izolasyon sayısındaki düşüklüğün bir sebebi olabilir.

Silajların hayvanlara verildiği dönemde *L. monocytogenes* izolasyonu 2/216 (% 0,93), *Listeria* spp. izolasyonu ise 41/216 (% 18,98) olmuştur. Burada *L. monocytogenes* sadece meme yıkantı ve süt tankı örneğinde izole edilmiştir. En fazla izole edilen tür 39/216 (% 18,05) ile *L. innocua* olmuştur.

Yine bu dönemde silajlarda pH aralıkları kış aylarında 3,5-5,9 aralığında iken, yaz aylarında bu aralık 2,8-6,8 idi. Önemli bir faktör olan pH' nın floradaki etkisi farklı çalışmalarda ortaya konmuştur (Ryser ve ark., 1997; Pauly ve Tham, 2003). Silajların hayvanlara verildiği aşamada silaj ve silaj sularından izole edilen tek tür *L. innocua* idi. Silajlardan *L. monocytogenes* izolasyonunun olmaması ve RTi-PCR' da çok yüksek Cq değeri vermelerinin nedenlerinden biri de silaj florasında mevcut olan *Lactobacillus* gibi fermentasyon bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler olabilir. *Lactobacillus*, *Pediococcus* gibi bakterilerin silaj fermentasyonunun bir fazında üremelerini artırıp ortama saldıkları bakteriyosinlerin floradaki diğer bakterileri baskıladığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Bal ve ark., 2012; Muck, 2013; Amado ve ark., 2016) Özellikle ortamda bulunan *L. innocua* bakterisinin de tripsine hassas bakteriyosin üreterek *L. monocytogenes* üremesini baskıladığı çalışmalarda gösterilmiştir (Yokoyama ve ark., 1998). *L. innocua* popülasyonundaki baskınlığın önemli bir nedeni olarak bu düşünülebilir. Silajlarda *L. innocua*' nın popülasyon baskıladığını gösteren başka çalışmalar da mevcuttur (Ryser ve ark., 1997).

Yüksek kontaminasyona sahip olan tüm fekal örneklerden 12/36 (% 33,3) oranında *L. innocua* izole edilmiştir. Florada olabilecek *L. innocua* zenginliğinin *L. monocytogenes* izole edilmemesinde farklı bir neden olmayacağı akla gelmektedir. Fekal örneklerin *L. monocytogenes* ile ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar (Husu, 1990; Weber ve ark., 1995; Latorre ve ark., 2009) olsa da bu çalışmada *L. monocytogenes* izolasyonu olmamıştır. Süt sığırları fekal örneklerinde yapılan bir çalışmada; kış döneminde % 12,7 oranında *Listeria* spp., % 9,2 oranında *L. monocytogenes* tespit edilmiş, ancak silaj yemlemesi yapılmayan bahar aylarında bu oranların sırasıyla % 5,1 ve % 3,1 olduğu bildirilmiştir (Husu, 1990). Yapılan diğer çalışmalarda ise sığira ait fekal örneklerde % 1,53 (Kalender, 2003), % 6 (Unnerstad ve ark., 2000), % 33 (Skovgaard ve Morgen, 1988), % 0,8 (Atıl ve ark., 2011) oranlarında *L. monocytogenes* izole edilmiştir.

Meme yıkantı örneklerinin sadece 1' inde (% 2,78) *L. monocytogenes* izole edildi. *Listeria* spp. izolasyonu ise 8 (% 22,2) olup, bunların tümü *L. innocua* idi. Hayvanlarda meme bölgelerinin çevresel olarak özellikle toprak, feçes vs. ile kontamine olması bu örnek sonuçlarını paralel olarak beraberinde getirmiştir. Yapılan çalışmalarda meme ile ilişkili olabilecek (meme svapı, meme yıkantı ve meme başlıkları) örneklerde

L. monocytogenes varlığı % 6,5-9,1 oranlarında bulunmuştur (Yoshida ve ark., 1998; van Kessel ve ark., 2004). Meme yıkantı örneklerinde izolasyonun sadece yaz aylarında yapılabilmiş olması stresten daha uzakta olmasını ve beraberinde çevresel bir kontaminasyon ile *Listeria* varlığını düşündürmektedir.

Süt örneklerinde *L. monocytogenes* ve *Listeria* spp. izole edilmedi. Yapılan tüm RTi-PCR analizlerinde ise negatif sonuç alındı. Her ne kadar sütün sağımı sırasında kontaminasyon oluşturabilecek manüplatif riskler mevcut olsa da *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir. Bu kadar düşük olmasına paralel olarak geçmişte yapılmış çalışmalarda da Türkiye’de çiğ sütte *L. monocytogenes* insidensi genel itibari ile % 0,4-5 arasında değişmektedir (Sağun ve ark., 2001; Aygün ve Pehlivanlar, 2006; Çolak ve ark., 2007; Arslan ve Özdemir, 2008; Kahraman ve ark., 2010; Cagri-Mehmetoglu ve ark., 2011; Güner ve Telli, 2011).

Süt tankı örneklerinde ise *L. monocytogenes* 1/36 (% 2,78) oranında izole edildi. Bunun yanında süt tankında diğer türlerden izole edilen tek tür *L. innocua* 2/36 (% 5,56) idi. Yapılan 1987-2013 yılları arasındaki süt tankı çalışmalarında Brezilya, Fransa, İtalya, İsviçre ve Türkiye’de (Destro ve ark., 1996; Stephan ve Buhler, 2002; Aygun ve Pehlivanlar, 2006; Amagliani ve ark., 2012; Destro ve ark., 1996; Mallet ve ark., 2012) *L. monocytogenes* insidensi % 0 bulunurken, Suriye, İskoçya, Çekya, Nijerya ve Almanya’da (Fenlon ve Wilson, 1989; Bardon ve ark., 2012; Yakubu ve ark., 2012; Al-Mariri ve ark., 2013) % 6,67-10,1 arasında tespit edilmiştir.

Analiz süresinin kısaltılması amacıyla tasarlanan modifiye analiz metotlarında süreyi azaltan esas unsurun Real Time PCR olduğu bilinen bir gerçektir. Bu çalışmada örnekler hem konvansiyonel, hem de modifiye yöntemlerle aynı anda analiz edildi ve sonuçlar tümünde paralel sonuçlandı. Tüm örneklerin Real Time analizleri 25,6-37,7 arasında ve beraberinde negatif olarak sonuçlanmıştır. Pozitif yakın Cq sıralamaları yapıldığında 9 örnek 25,5-32,5 arasında bulunmaktadır. Ancak Real Time analizi sonrası bunlar ALOA kromojenik selektif katı besi yerine geçilmiş, sadece Temmuz ayı süt tankı ve Haziran ayı meme yıkantı örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu sağlanabilmiştir. Her ne kadar bu Cq aralığındaki bu iki pozitif örnek dışındaki yedi örnekten izolasyon beklense de, alınan negatif sonuçlar konvansiyonel metotlardan da alınmıştır.

Bir çalışmada 8,4 kob *L. monocytogenes* içeren et örneği yarım kuvvet Fraser sıvı besi yerine ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bu sıvı besi yerinin 1 mL' sinden DNA ekstraksiyonu yapılmış, Real Time PCR ile analiz edilmiştir. Analiz sonunda Cq değeri 36 olarak bulunmuştur. Aynı örnek ISO 11290-1 analizinde ise izolasyon elde etmişlerdir (Gattuso ve ark., 2014). Ancak bu çalışmada Real Time PCR analizleri ikinci zenginleştirme sonrası tam kuvvetli Fraser ve MOPS-BLEB sıvı besi yerlerinden yapılmasına rağmen elde edilen bu Cq değerlerinde bile *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmamıştır ve beraberinde konvansiyonel metotlarda sonuçlar aynı çıkmıştır. Yüksek Cq değerleri vermesi *L. monocytogenes*' lerin ilk aşamada ölü ya da yüksek stres altında kaldığını, ikinci zenginleştirmede de kendi koşullarını değiştirmeyip aynı kaldığını ve kob değerlerinde bir değişikliğe neden olduğunu, aksine düşüşe geçmiş olabileceğini akla getirmektedir. Özellikle silaj örneklerinde bu şekilde Cq değerleri elde edilmiştir. Silajın ortam şartları (pH, bakteriyosin, sıcaklık vs.) mevcut olan *L. monocytogenes*' leri stres altına almış, daha ileri aşamalarda öldürmüş olabilir. Dolayısıyla ilk zenginleştirme sonrası ikinci zenginleştirme DNA konsantrasyonunda bir değişikliğe (1/100), bir başka ifade ile düşmeye sebep olmuş olabilir. Burada Real Time PCR analizinde *L. monocytogenes* varlığı gösterilmiştir. Ancak gıda analizleri için gerekli olan söz konusu patojenlerin canlılığı beraberindeki bakteriyolojik ekim ile araştırılmış ve canlı olmayabilecekleri gösterilmiştir.

Kromojenik katı besi yerleri özel olarak geliştirilmiş, ekimlerde aranan bakteriyi spesifik bir şekilde görsel olarak ortaya koyan besi yerleridir. Yaptığı bu kolaylıklar sonrası yapılan optimizasyonlar ile bir kromojenik katı besi yeri olan ALOA kromojenik katı besi yerinin ISO 11290-1 içinde kullanılabilmesi açıklanmıştır. Burada bu selektif besi yeri bu çalışmada USDA-FSIS analiz metoduna da uyarlanmıştır. Ancak bu besi yerini üreten firmalar oluşan koloni görüntüleri hakkında, spesifik görüntünün *L. monocytogenes* yanında *L. ivanovii*' de de oluşabileceği konusunda uyarılmıştır. Bu risk değerlendirilmiş, *L. monocytogenes* olduğunu onaylamak için bu besi yerinden alınan koloniler multipleks PCR ile tür analizine alınmıştır. Elde edilen şüpheli tüm koloniler bu analizde *L. monocytogenes* pozitif sonuç vermiştir. Burada Real Time PCR kullanılmamasının nedeni Real Time PCR testinin sadece *L. monocytogenes* için değerlendirme yapması olmuştur. Oysa yapılan multipleks PCR testi gerek *L. monocytogenes*, gerekse *L. ivanovii* olarak sonucu gösterebilmektedir. Multipleks PCR

Listerialarda tür ayrımı için farklı gıdalarda, çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Cocolin ve ark., 2002; Jamali ve ark., 2013; Ryu ve ark., 2013; Liu ve ark., 2015; Botsaris ve ark., 2016; Rosimin ve ark., 2016). Bunun yanında Real Time PCR beraberinde ALOA katı besiyerinin kullanılması ile USDA-FSIS’de 144-168 saat ile biten analiz süresi maksimum 72-84 saate düşürülebilmektedir. Bu süre ISO 11290-1’de ise maksimum 96-102 saate düşmektedir. Her iki metot da genel bir ifade olarak identifikasyon için konvansiyonel analizlerdeki son 3 günde yapılan fenotipik ayırım testlerini gerekli kılmadan avantajlı hale geçmektedir.

Elde edilen iki adet *L. monocytogenes*, virulensleri için multipleks PCR ile analiz edilmiştir. İncelenen üç internaline ait (*inlA*, *inlC*, *inlJ*) genlerin tümü iki izolatta da bulunmuştur. Bu internalinlerden *inlA* esas olarak en önemli ve ana internalinlerden biri kabul edilir ve *L. monocytogenes*’ in konakçı hücreye invazyonu sırasında ϵ -kaderine bağlanır. Virulensin ana etmenlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda *inlC* veya *inlJ* genlerinin çıkartılması ile *L. monocytogenes*’ in patojenitelerinde önemli derecede zayıflama olduğu bildirilmiştir (Engelbrecht ve ark., 1996; Sabet ve ark., 2005). *L. monocytogenes*’ de *inlC* ve *inlJ*’ nin varlıklarının LD₅₀ değerlerinde önemli değişiklikler şekillendirdiği tespit edilmiştir. Buna göre farelerde denenmiş bir tavuk izolatu 4c serotipi ve *inlC* +, *inlJ*- olan ATCC 19116 suşunda LD₅₀ değeri $2,6 \times 10^8$, gıda izolatu 7 serotipi ve *inlC*-, *inlJ*+ R2-142 suşunda $<5 \times 10^7$, kobay izolatu 1/2a serotipi ve *inlC* +, *inlJ*+ olan EGD suşunda $<1,1 \times 10^7$, insan izolatu 2 serotipi ve *inlC* -, *inlJ*- olan ATCC 19112 suşunda ise $1,6 \times 10^9$ olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007). Bu bilgiler ile internalinlerde tüm genlerin mevcut olması ile patojenitenin önemli düzeyde etkileneceği anlaşılmaktadır. Çalışmada elde edilen 2 *L. monocytogenes* izolatının yüksek virulense sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada silaj yapım aşamasından başlayarak sonrasında kontaminasyon riski oluşturacak kritik bulaşma noktalarında insan için patojen olan *L. monocytogenes* varlığına bakılmıştır. İlk bulaşma noktası olarak silajdan izolasyon sağlanmasa da Real Time PCR ile *L. monocytogenes* varlığı ortaya konulmuştur. Sonrasındaki diğer bulaşma noktalarından ise sadece meme yıkantı ve süt tankında ayrıca izolasyon sağlanmıştır. Diğer bulaşma noktalarından izolasyon sağlanmasa da Real Time PCR testi ile varlığı gösterilmiştir. Diğer Listeria türlerinin izole edilmesi ve son çalışmalarda da bu türlerin insanlarda enfeksiyon oluşturabildiği yeni vakalar alınması gereken tedbirlerin önemini ortaya koymaktadır.

Bu sebeple; burada silaj yapım aşamasından süt tankına olan noktaların *L. monocytogenes* açısından iyi değerlendirilmesi, bulaşma olasılıklarının karşısına geçmek için gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Çalışma yapılan işletme sayısının düşük olmasına rağmen dikkat çekici bu verilerin elde edilmesi yüksek bir örnekleme ile insidensde olabilecek büyüklüğü ortaya koyabilmektedir. Bu yüzden daha geniş çalışmalar ve araştırmalar ile güçlü epidemiyolojik veriler ortaya konabilir. Az sayıda işletmeden elde edilen bu sonuçlar *L. monocytogenes*' deki potansiyeli güçlü kılmaktadır. Gelecekte bu sorunların devam etmemesi için çiftçilere gerek silaj yapım konusunda, gerekse diğer konular hakkında bilgilendirmelerin yapılmasını ve hayvan kayıpları yanında gıda patojeni olarak ikinci bir sorun oluşturan bu etken hakkında resmi otoriteler tarafından gerekli programların düzenlenmesini ve eğitim verilmesini elzem hale getirmektedir. Analiz süresinin kısaltılması amacıyla geliştirilen modifiye metotlar farklı materyaller (diğer gıda maddeleri ve yemler ile) ile çalışılmalı ve optimize edilmelidir. Bu sayede bu metodun geniş bir skalada çalışabilirliği, tekrar üretilebilirliği gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

- Alvarez-Domínguez C, Vázquez-Boland JA, Carrasco-Marín E, López-Mato P, Leyva-Cobián F. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *L. monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun* 1997;65(1):78-88.
- Agrotime. Türkiye’de mısır üretimi rekora ulaştı.
<http://www.agrotimeyayincilik.com.tr/2016/05/10/turkiyede-misir-uretimi-rekora-ulasi,2017>
- al Ghazali M, SK al A. Effects of sewage treatment on the removal of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 1988;65:203-208.
- al Ghazali M, SK A. Storage effects of sewage sludge cake on the survival of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol*.1988;65:209-213.
- Al-Mariri A, Younes AA, Ramadan L. Prevalance of *Listeria* spp. in raw milk in Syria. *Bulg J Vet Med* 2013;16(2):112-122.
- Amado IR, Fuciños C, Fajardo P, Pastrana L. Pediocin SA-1: A selective bacteriocin for controlling *Listeria monocytogenes* in maize silages. *J Dairy Sci* 2016;99(10):8070-8080. DOI:10.3168/jds.2016-11121.
- Amagliani G, Petruzzelli A, Omiccioli E, Tonucci F, Magnani M, Brandi G. Microbiological surveillance of a bovine raw milk farm through multiplex Real-Time PCR. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9(5):406-411. DOI:10.1089/fpd.2011.1041.
- Amezaga MR, Davidson I, McLaggan D, Verheul A, Abee T, Booth IR. The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology* 1995;141(1):41-49. DOI:10.1099/00221287-141-1-41.
- Angelidis AS, Smith GM. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(2):1013-1022. DOI:10.1128/AEM.69.2.1013-1022.2003.
- Appelberg R, Leal IS. Mutants of *Listeria monocytogenes* defective in in vitro invasion and cell-to-cell spreading still invade and proliferate in hepatocytes of neutropenic mice. *Infect Immun* 2000;68(2):912-914. DOI:10.1128/IAI.68.2.912-914.2000.
- Arslan S, Özdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. *Food Control* 2008;19(4):360-363. DOI:10.1016/j.foodcont.2007.04.009.
- Arslantaş Ö, Yıldız P. Kars ilinde çiğ sütlerden *Listeria monocytogenes* izolasyonu. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilim Vet Derg.* 2003;17(1):11-15.

- Arvanitidou M, Papa A, Constantinidis TC, Danielides V, Katsouyannopoulos V. The occurrence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in surface waters. *Microbiol Res* 1997;152(4):395-397. DOI:10.1016/S0944-5013(97)80057-2.
- Atil E, Ertas HB, Özbey G. Isolation and molecular characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environmental samples. *Vet Med (Praha)* 2011;56(8):386-394.
- Aygun O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food control* 2006;17(8):676-679.
- Bakardjiev AI, Stacy BA, Fisher SJ, Portnoy DA. Listeriosis in the Pregnant Guinea Pig: A Model of Vertical Transmission. *Infect Immun* 2004;72(1):489-497.
- Bal EBB, Isevi T, Bal MA. Characterization of an anti-listerial enterocin from wheat silage based *Enterococcus faecium*. *J Basic Microbiol* 2012;52(5):496-503. DOI:10.1002/jobm.201100235.
- Bardon J, Ondruskova J, Oslikova M, Vyroubalova S. Zoonotic potential of raw cow's milk in the Czech Republic. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2012;18(2):32-37.
- Barrett E, Hayes M, O'Connor P, et al. Salivaricin p, one of a family of two-component antilisterial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(11):3719-3723. DOI:10.1128/AEM.00666-06.
- Barza M. Listeriosis and milk. *N Engl J Med* 1985;312(7):438-440.
- Basmacıoğlu H, Ergül M. Silaj Mikrobiyolojisi. *Hayvansal üretim* 2002;43(1):12-24.
- Becker L a, Cetin MS, Hutkins RW, Benson AK. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J Bacteriol* 1998;180(17):4547-4554.
- Benkerroum N, Sandine WE. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci.* 1988;71(12):3237-3245. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(88)79929-4.
- Bereksi N, Gavini F, Bénézech T, Faille C. Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *J Appl Microbiol* 2002;92(3):556-565. DOI:10.1046/j.1365-2672.2002.01564.x.
- Bernagozzi M, Bianucci F, Sacchetti R, Bisbini P. Study of the prevalence of *Listeria* spp. in surface water. *Zentralblatt für Hyg und Umweltmedizin* 1994;196:237-244.
- Bernbom N, Licht TR, Saadbye P, Vogensen FK, Norrung B. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *Int J Food Microbiol* 2006;108(1):10-14. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.021.

- Bertsch D, Rau J, Eugster MR, et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. Int J Syst Evol Microbiol 2013. DOI:10.1099/ijms.0.036947-0.
- Beumer RR, Hazeleger WC. *Listeria monocytogenes*: Diagnostic problems. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;35(3):191-197. DOI:10.1016/S0928-8244(02)00444-3.
- Beumer RR, te Giffel MC, Anthonie SVR, Cox LJ. The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. Food Microbiol 1996;13:137-148. DOI:10.1006/fmic.1996.0018.
- Bielecki J, Youngman P, Connelly P, Portnoy DA. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. Nature 1990;345(6271):175-176. DOI:10.1038/345175a0.
- BioRad. InstaGene™ Matrix: Prepare dna templates for PCR with no phenol/chloroform extractions and no deproteinization steps prepare. 1810:181134. DOI:10.1016/S0956-5663(03)00123-4.
- Biyologlar. RFLP Analiz Protokolü. <http://biyologlar.com/rflp-analiz-protokolu?page=24>, 2017
- Blanot S, Joly MM, Vilde F, et al. A gerbil model for rhombencephalitis due to *Listeria monocytogenes*. Microb Pathog 1997;23(1):39-48.
- Botsaris G, Nikolaou K, Liapi M, Pipis C. Prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in cattle farms in Cyprus using bulk tank milk samples. J Food Saf 2016;36(4):482-488. DOI:10.1111/jfs.12265.
- Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. Clin Microbiol Rev 2008;21(2):262-273. DOI:10.1128/CMR.00026-07.
- Braun L, Ohayon H, Cossart P. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. Mol Microbiol 1998;27(5):1077-1087. DOI:10.1046/j.1365-2958.1998.00750.x.
- Brøndsted L, Kallipolitis BH, Ingmer H, Knöchel S. kdpE and a putative RsbQ homologue contribute to growth of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity and low temperature. FEMS Microbiol Lett 2003;219(2):233-239. DOI:10.1016/S0378-1097(03)00052-1.
- Brzin B. The effect of NaCl on the morphology of *Listeria monocytogenes*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie 1973;225(1), 80.
- Bubert A, Sokolovic Z, Chun SK, Papatheodorou L, Simm A, Goebel W. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. Mol Gen Genet 1999;261(2):323-336. DOI:10.1007/s004380050973.
- Cagri-Mehmetoglu A, Yaldirak G, Bodur T, Simsek M, Bozkir H, Eren NM. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese

- processing environments. *Food Control* 2011;22(5):762-766. DOI:10.1016/j.foodcont.2010.11.011.
- Camilli A, Goldfine H, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 1991;173(3):751-754.
- Castellano P, Vignolo G. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Lett Appl Microbiol* 2006;43(2):194-199. DOI:10.1111/j.1472-765X.2006.01933.x.
- CDC. Foodborne Disease Active Surveillance Network. 2015 Surveillance Report <https://www.cdc.gov/foodnet/pdfs/FoodNet-Annual-Report-2015-508c.pdf>,2017
- CDC. Listeriosis outbreaks. Selected multistate outbreaks.2011-2017. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>,2017
- Centers of Disease Control and Prevention. PulseNet <https://www.cdc.gov/pulsenet/about/index.html>. Accessed November 1, 2017.
- Chakraborty T, Ebel F, Domann E, et al. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* 1995;14(7):1314-1321.
- Chakraborty T, Hain T, Domann E. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* 2000;290(2):167-174. DOI:10.1016/S1438-4221(00)80086-7.
- Chambers J V. *The Microbiology of Raw Milk*. Vol 1.; 2002. DOI:10.1201/b17297-2.
- Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P. Conjugative mobilization of the rolling-circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram-positive and gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1999;181(11):3368-3374.
- Charpentier E, Gerbaud G, Jacquet C, Rocourt J, Courvalin P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J Infect Dis* 1995;172(1):277-281.
- Chaturongakul S, Raengpradub S, Wiedmann M, Boor KJ. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* 2008;16(8):388-396.
- Chihib NE, Ribeiro Da Silva M, Delattre G, Laroche M, Federighi M. Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2003;218(1):155-160. DOI:10.1016/S0378-1097(02)01116-3.
- Chunk Y. Control of *Clostridium botulinum* by bacteriocins and characterization of nisin action during sport-to-cell transformation. Ohio State Univ. 2001.
- Clokier MRJ, Kropinski AM. *Bacteriophages: Methods and Protocols*.; 2009. DOI:10.1007/978-1-60327-164-6.

- Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Cantoni C, Comi G. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. Society 2002;68(12):6273-6282. DOI:10.1128/AEM.68.12.6273.
- Colak H, Hampikyan H, Bingol EB, Ulusoy B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. Food Control 2007;18(5):576-579. DOI:10.1016/j.foodcont.2006.02.004.
- Colburn KG, Kaysner CA, Abeyta C, Wekell MM. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. Appl Environ Microbiol 1990;56(7):2007-2011.
- Collins MD, Wallbanks S, Lane DJ, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on Reverse Transcriptase sequencing of 16s rRNA. Int J Syst Bacteriol 1991;240-246. DOI:10.1099/00207713-41-2-240.
- Coma V, Sebti I, Pardon P, Deschamps A, Pichavant FH. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. J Food Prot 2001;64(4):470-475.
- Conte MP, Longhi C, Polidoro M, et al. Iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2 iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the Enterocytelike Cell Line Caco-2. 1996;64(9):3925-3929.
- Cordano AM, Jacquet C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. Int J Food Microbiol 2009;132(2-3):176-179. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.008.
- Coroneo V, Carraro V, Aissani N, et al. Detection of virulence genes and growth potential in *Listeria monocytogenes* strains isolated from Ricotta Salata Cheese. J Food Sci 2016;81(1):M114-M120. DOI:10.1111/1750-3841.13173.
- Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC, Berche P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct evidence obtained by gene complementation. Infect Immun 1989;57(11):3629-3636.
- Cotter PD, Gahan CGM, Hill C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Mol Microbiol 2001;40(2):465-475. DOI:10.1046/j.1365-2958.2001.02398.x.
- Cousins C, Bramley AJ. The Microbiology of Raw Milk. Dairy Microbiology. 1st ed.; 1981.
- Curry B, Crow V. *Lactobacillus casei* group. 3rd ed. London Academic Press.; 2002.
- Czuprynski CJ. *Listeria monocytogenes*: silage, sandwiches and science. Anim Heal Res Rev. 2005;6(2):211-217. DOI:10.1079/AHR2005111.
- Çokal Y. The presence of *Listeria* species in dairy cattle farms in Bandırma province, Turkey. Etlik Vet Mikrobiyoloji Derg 2014;25(2):39-46.

- Dalmasso M, Jordan K. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol.* 2014;1157:63-72. DOI:10.1007/978-1-4939-0703-8_5,.
- Degnan AJ, Buyong N, Luchansky JB. Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *Int J Food Microbiol* 1993;18(2):127-138. DOI:10.1016/0168-1605(93)90217-5.
- den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64(PART 6):1882-1889. DOI:10.1099/ijs.0.052720-0.
- Destro MT, Leita MFF, Farber JM. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Microbiology* 1996;62(2):705-711.
- Dijkstra RG. *Listeria monocytogenes* in intestinal contents and faeces from healthy broilers of different ages in the litter and its potential danger for other animals, ie, cattle. In proceedings from the 7th International Symposium on Problems of Listeriosis, National Agroindustrial Union. Center for Scientific Information. Sofia, Bulgaria, 1979, 289-294
- Dijkstra RG. Investigations on the survival times of *Listeria* bacteria in suspensions of brain tissue, silage and faeces and in milk. *Zentralbl Bakteriologie* 1971;216:92-95.
- Domann E, Zechel S, Lingnau A, et al. Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect Immun* 1997;65(1):101-109.
- Dominguez L, Garayzabal JFF, Vazquez JA, Blanco JL, Suarez G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. *Lett Appl Microbiol* 1987;4(6):125-127. DOI:10.1111/j.1472-765X.1987.tb01598.x.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3819-3822. DOI:10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.
- Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *InIB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 1995;16(2):251-261. DOI:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02297.x.
- Dramsi S, Dehoux P, Lebrun M, Goossens PL, Cossart P. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* 1997;65(5):1615-1625.

- Drevets DA, Bronze MS. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53(2):151-165.
- Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H. The Continuing Story of Class Iia Bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70(2):564-582. DOI:10.1128/MMBR.00016-05.
- Driehuis F. Silage and the safety and quality of dairy foods: A review. *Agric Food Sci* 2013;22(1):16-34.
- Duodu S, Mehmeti I, Holst-Jensen A, Loncarevic S. Improved sample preparation for real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in hot-smoked salmon using filtering and immunomagnetic separation techniques. *Food Anal Methods* 2009;2(1):23-29. DOI:10.1007/s12161-008-9043-2.
- Durmaz H, Avci M, Aygün O. Türkiye'nin güneydoğu bölgesinde üretilen mısır silajı ve sütlerde *Listeria* türlerinin varlığı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2015;21(1):41-44. DOI:10.9775/kvfd.2014.11664.
- Endrikat S, Gallagher D, Pouillot R, et al. A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. *J Food Prot* 2010;73(4):612-619. doi:10.4315/0362-028X-73.4.612
- EFSA. EFSA updates EU scientific advice on listeria risk in ready-to-eat foods. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/080122,2017>
- Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C, et al. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* 1996;21(4):823-837. DOI:10.1046/j.1365-2958.1996.541414.x.
- Engelbrecht F, Dickneite C, Lampidis R, Götz M, DasGupta U, Goebel W. Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (inlC) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol Gen Genet* 1998a;257(2):186-197. DOI:10.1007/s004380050638.
- Engelbrecht F, Dominguez-Bernal G, Hess J, et al. A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol Microbiol* 1998b;30(2):405-417. DOI:10.1046/j.1365-2958.1998.01076.x.
- Engelhardt T, Ágoston R, Belák Á, Mohácsi-Farkas C, Kiskó G. The suitability of the ISO 11290-1 method for the detection of *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Sci Technol* 2016;71:213-220. doi:10.1016/j.lwt.2016.03.038.
- Erdogan HM. An epidemiological study of Listeriosis in dairy cattle. 1998:1-335.
- Ertaş HB, Şeker E. Isolation of *Listeria monocytogenes* from fish intestines and RAPD analysis. *Turkish J Vet Anim Sci* 2005;29(4):1007-1011.

- European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis - Annual Epidemiological Report 2016 (2014 data). <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/Listeriosis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>, 2017
- Facinelli B, Giovanetti E, Varaldo PE, Casolari P, Fabio U. Antibiotic resistance in foodborne listeria. *Lancet* 1991;338(8777):1272. DOI:10.1016/0140-6736(91)92138-R.
- FAO.Milk and milk products. Food Outlooks 2016. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/FO_Dairy_June_2016.pdf, 2017
- FAO/WHO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series., 2004, 4, 1–48.
- Farber J M PPI. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. 1991;55(3):476-511.
- FDA-BAM. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Bacteriological Analytical Manual. Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm#fn30>, 2017
- Fenlon DR, Stewart T, Donachie W. The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks. *Lett Appl Microbiol* 1995;20(1):57-60. DOI:10.1111/j.1472-765X.1995.tb00407.x.
- Fenlon DR, Wilson J, Weddell JR. The relationship between spoilage and *Listeria monocytogenes* contamination in bagged and wrapped big bale silage. *Grass Forage Sci* 1989;44(1):97-100. DOI:10.1111/j.1365-2494.1989.tb01915.x.
- Fenlon DR, Wilson J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. *J Appl Bacteriol* 1989;66(3):191-196. DOI:10.1111/j.1365-2672.1989.tb02469.x.
- Fenlon DR. Growth of naturally occurring *Listeria* spp. in silage: a comparative study of laboratory and farm ensiled grass. *Grass Forage Sci* 1986a;41(4):375-378. DOI:10.1111/j.1365-2494.1986.tb01828.x.
- Fenlon DR. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. *List List food Saf* 1999:21-37.
- Fenlon DR. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of Listeriosis in calves. *Vet Rec* 1986b;118(9):240-242.
- Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of σ B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(10):4454-4457. DOI:10.1128/AEM.67.10.4454-4457.2001.

- Finley GG, Long JR. An epizootic of Listeriosis in chinchillas. The Canadian Veterinary Journal 1977;18(6), 164.
- Fox E, Hunt K, O'Brien M, Jordan K. *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. Int J Food Microbiol 2011;145(SUPPL. 1). DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.012.
- Fox EM, Delappe N, Garvey P, et al. PFGE analysis of *Listeria monocytogenes* isolates of clinical, animal, food and environmental origin from Ireland. J Med Microbiol 2012;61(4):540-547. DOI:10.1099/jmm.0.036764-0.
- Frece J, Markov K, Čvek D, Kolarec K, Delaš F. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. J Dairy Res 2010;77(1):112. DOI:10.1017/S0022029909990379.
- Freitag NE. From hot dogs to host cells: how the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* regulates virulence gene expression. Future Microbiol 2006;1(1):89-101.
- Fuchs RS, Nicolaides L. Incidence of Listeria in hot- and cold-smoked fish. Lett Appl Microbiol. 1994;19(5):394-396. DOI:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00485.x.
- Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouln E, Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cell 1991;65(7):1127-1141. DOI:10.1016/0092-8674(91)90009-N.
- Gandhi M, Chikindas ML. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol 2007;113(1):1-15. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008.
- Garcia E, DePaz M, Rodriguez J, Gaya P, Medina M, Nunez M. Exogenous sources of Listeria contamination in raw ewe's milk. J Food Prot 1996;59(9):950-954.
- Gardan R, Cossart P, Labadie J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. Appl Environ Microbiol 2003;69(6):3137-3143. DOI:10.1128/AEM.69.6.3137.
- Garrido V, Torroba L, García-Jalón I, Vitas AI. Surveillance of Listeriosis in Navarre, Spain, 1995-2005--epidemiological patterns and characterisation of clinical and food isolates. Euro Surveill 2008;13(49)
- Gasnov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. FEMS Microbiol Rev 2005. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.002.
- Gattuso A, Gianfranceschi MV, Sonnessa M, et al. Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. Int J Food Microbiol 2014;184:106-108. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.015.

- Geuenich HH, Müller HE. Isolation and germ count of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated waste water. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 1984;179(3):266-273.
- Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux pump Ide is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(2):704-708. DOI:10.1128/AAC.47.2.704-708.2003.
- Goff JH, Bhunia AK, Johnson MG. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with Pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* Cells:j. *J Food Prot* 1996;59(11):1187-1192.
- Gonzalez-Zorn B, Dominguez-Bernal G, Suarez M, et al. The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol* 1999;33(3):510-523. DOI:10.1046/j.1365-2958.1999.01486.x.
- Gorski L. Serotype assignment by sero-agglutination, ELISA and PCR. *Methods Mol Biol* 2014;1157:41-61. DOI:10.1007/978-1-4939-0703-8_4.
- Gouin E, Mengaud J, Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect Immun* 1994;62(8):3550-3553.
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60(6):1280-1288. DOI:10.1099/ijs.0.014118-0.
- Gray ML, Killinger AH. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* 1966;30(2):309-382.
- Greenwood MH, Roberts D, Burden P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *Int J Food Microbiol* 1991;12:197-206. DOI:10.1016/0168-1605(91)90070-6.
- Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells *in vivo*. *Infect Immun* 1996;64(10):3983-3986.
- Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, et al. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: *InlB*-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun* 1998;66(11):5260-5267.
- Grønstøl H. Listeriosis in sheep. Isolation of *Listeria monocytogenes* from grass silage. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1979;20(4), 492.
- Groves RD, Welshimer HJ. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three *in vitro* reactions. *J Clin Microbiol* 1977;5(6):559-563.

- Guner A, Telli N. A survey on the presence of *Listeria monocytogenes* in various semi-hard cheeses from different regions of Turkey. *J Anim Vet Adv* 2011;10(14):1890-1894. DOI:10.3923/javaa.2011.1890.1894.
- Hadorn K, Hächler H, Schaffner A, Kayser FH. Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12(12):928-937. DOI:10.1007/BF01992167.
- Halter EL, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63(Part2):641-647. DOI:10.1099/ijs.0.036830-0.
- Harakeh S, Saleh I, Zouhairi O, Baydoun E, Barbour E, Alwan N. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Sci Total Environ* 2009;407(13):4022-4027. DOI:10.1016/j.scitotenv.2009.04.010.
- Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC19115, Scott-A, and UAL500 to nisin. *J Food Prot* 1991;54(11):836-840.
- Hassan Z, Purwati E, Radu S, Rahim RA, Rusul G. Prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in meat and fermented fish in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32(2):402-407.
- Heffron S, Moe GR, Sieber V, et al. Sequence Profile of the Parallel b Helix in the Pectate Lyase Superfamily. *J Struct Biol* 1998;122:223-235. DOI:10.1006/jsbi.1998.3978.
- Heron SJE, Wilkinson JF, Duffus CM. *Enterobacteria* associated with grass and silages. *J Appl Bacteriol* 1993;75(1):13-17. DOI:10.1111/j.1365-2672.1993.tb03401.x.
- Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2007;2(3):677-684. DOI:10.1038/nprot.2007.94.
- Hilbi H, Weber SS, Ragaz C, Nyfeler Y, Urwyler S. Environmental predators as models for bacterial pathogenesis: Minireview. *Environ Microbiol* 2007;9(3):563-575.
- Ho AJ, Her Z, Grohn YT, et al. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. 2004. DOI:10.1128/AEM.70.8.4458.
- Ho AJ, Ivanek R, Gröhn YT, Nightingale KK, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Prev Vet Med* 2007. DOI:10.1016/j.prevetmed.2007.03.005.

- Hoepfner AELM, Swennenhuis JF, Terstappen LWMM. Immunomagnetic separation technologies. *Recent Results Cancer Res* 2012;195:43-58. DOI:10.1007/978-3-642-28160-0_4.
- Hof H. History and epidemiology of Listeriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35(3):199-202.
- Huang B, Eglezos S, Heron BA, et al. Comparison of multiplex PCR with conventional biochemical methods for the identification of *Listeria* spp. isolates from food and clinical samples in Queensland, Australia. *J Food Prot* 2007;70(8):1874-1880.
- Hudson JA. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 1992;14(4):178-180. DOI:10.1111/j.1472-765X.1992.tb00678.x.
- Husu JR. Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *Zentralblatt fur Vet R B J Vet Med Ser B* 1990;37(4):276-282.
- Ingham A, Ford M, Moore RJ, Tizard M. The bacteriocin piscicollin 126 retains antilisterial activity *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(6):1365-1371. DOI:10.1093/jac/dkg229.
- ISO. International Organization for Standardization. EN ISO 11290e1:1996/ A1:2004 microbiology of food and animal feeding stuffs d Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* d Part 1: Detection method.2004
- ISO. International Organization for Standardization. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 1: Detection method.,2017
- Isom, L. L., Khambatta, Z. S., Moluf, J. L., Akers, D. F., Martin, S. E Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*.1995;58(9), 1031-1033.
- Issa G, Kahraman T, Kahraman B. Prevalence of *Listeria monocytogenes* , *Salmonella* spp . and *Escherichia coli* O157 : H7 in Raw Milk. *İstanbul üni Vet Fakültesi Derg* 2010;36(1):57-63.
- Jadhav S, Bhavne M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*.*J Microbiol Methods* 2012;88(3):327-341. DOI:10.1016/j.mimet.2012.01.002.
- Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. *Int J Food Microbiol* 2008;122(3):336-340. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.082.
- Jallewar PK, Kalorey DR, Kurkure N V., Pande V V., Barbuddhe SB. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *Int J Food Microbiol* 2007;114(1):120-123. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.034.

- Jamali H, Radmehr B, Thong KL. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control* 2013;34(1):121-125. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.04.023.
- Jersek B, Gilot P, Gubina M, et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):103-109.
- Jeyasekaran G, Karunasagar I, Karunasagar I. Incidence of *Listeria* spp. in tropical fish. *Int J Food Microbiol* 1996;31(1-3):333-340. DOI:10.1016/0168-1605(96)00980-4.
- Johannessen GS, Loncarevic S, Kruse H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int J Food Microbiol* 2002;77(3):199-204. DOI:10.1016/S0168-1605(02)00051-X.
- Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products - a Review. *J Food Prot* 1990;53(1):81-91.
- Jones DA, Jones JDG. The Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in Plant Defences. *Adv Bot Res* 1997;24:89-167. DOI:10.1016/S0065-2296(08)60072-5.
- Joseph B, Goebel W. Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* 2007;9(10):1188-1195.
- Juneja VK, Eblen BS. Predictive thermal inactivation model for *Listeria monocytogenes* with temperature, pH, NaCl, and sodium pyrophosphate as controlling factors. *J Food Prot* 1999;62(9):986-993.
- Kahraman T, Cetin O, Dumen E, Buyukunal SK. Incidence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on equipment surfaces and personnel hands in meat plants. *Rev Med Vet (Toulouse)*. 2010;161(3):108-113.
- Kajava A V. Structural diversity of Leucine-Rich Repeat Proteins. *J Mol Biol* 1998;277(3):519-527. DOI:10.1006/jmbi.1998.1643.
- Kalchayanand N, Sikes T, Dunne CP, Ray B. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(11):4174-4177.
- Kalender H. Detection of *Listeria monocytogenes* in Faeces from Chickens, Sheep and Cattle in Elazığ Province. *Turk J Vet Anim Sci* 2003;27:449-451.
- Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB. *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. *Food Control* 2008;19(2):109-112. DOI:10.1016/j.foodcont.2007.02.006.
- Karli, A., Sensoy, G., Unal, N., Yanik, K., Cigdem, H., Belet, N., & Sofuoglu, A. Ventriculoperitoneal shunt infection with *Listeria innocua*. *Pediatrics International* 2014; 56(4), 621-623.

- Kathariou S, Kanenaka R, Allen RD, Fok AK, Mizumoto C. Repression of motility and flagellin production at 37 degrees C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*. *Can J Microbiol* 1995;41(7):572-577. DOI:10.1139/m95-076.
- Kathariou S, Metz P, Hof H, Goebel W. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1987;169(3):1291-1297.
- Kawasaki S, Fratamico PM. Development of the multiplex PCR detection kit for *Salmonella* spp ., *Listeria monocytogenes* , and *Escherichia*. development. 2011;45(1):77-81.
- Kent M. Sorrells DCE. Effect of pH, acidulant, sodium chloride and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Saf* 1990;11(1):31-37.
- Keto-Timonen RO, Autio TJ, Korkeala HJ. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. *Syst Appl Microbiol* 2003;26:236-244. DOI:10.1078/072320203322346083.
- Khelef N, Lecuit M, Buchrieser C, Cabanes D. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria* The discovery of Listeriosis and *Listeriae*. In: Dworkin M, ed. *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd ed. Springer. 2006 ;404-476
- Kılınç B, Üniversitesi E, Ürünleri S, et al. Su Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*. *U J Fish Aquat Sci Cilt Sayı/Issue*. 2001;18:3-4.
- Kızıllısimşek M, Erol A, Ertekin İ, Dönmez R, Katrancı B. Silaj mikro florasının birbirleri ile ilişkileri, silaj fermentasyonu ve kalitesi üzerine etkileri. *KSU J Nat Sci* 2016;19(2):136-140.
- Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994;19(10):415-421. DOI:10.1016/0968-0004(94)90090-6.
- Konosonoka IH, Jemeljanovs A, Osmane B, Ikaunieca D, Gulbe G. Incidence of *Listeria* spp. in dairy cows feed and raw milk in Latvia. *Int Sch Res Netw ISRN Vet Sci Artic ID* 2012;435187(5). DOI:10.5402/2012/435187.
- Kreft J, Vázquez-Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* 2001;291:145-157. DOI:10.1078/1438-4221-00111.
- Kubicová Z, Filipová M, Jurovčíková J, Cabanová L. Collection of *Listeria monocytogenes* isolates from milk, dairy products and food processing environments in Slovakia for the Purposes of European Molecular Database. *Folia Vet* 2017;61(1):60-65. DOI:10.1515/fv-2017-0009.
- Kutlu HR. Tüm yönleri ile silaj yapımı ve silaj ile besleme. Çukurova Zootekni Derneği. http://www.zootekni.org.tr/upload/File/SILAJ_EI_KTABI.pdf, 2017.

- Larson AE, Johnson EA, Nelson JH. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *J Dairy Sci* 1999;82(9):1860-1868. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(99)75419-6.
- Latorre AA, Van Kessel JAS, Karns JS, et al. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(5):1315-1323. DOI:10.1128/AEM.01826-08.
- Latorre L, Fraccalvieri R, Parisi A, Santagada G, Normanno G. Study on *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination of sheep and goat milk and dairy products. *Ind Aliment* 2008;47(March):737-744.
- Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2001;20(4):172-194. DOI:10.1002/mas.10003.
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;60(9):2210-2214. DOI:10.1099/ijms.0.017376-0.
- Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 1997;65(12):5309-5319.
- Lecuit M. Human Listeriosis and animal models. *Microbes Infect* 2007;9(10):1216-1225. DOI:10.1016/j.micinf.2007.05.009.
- Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* 1992;174(3):947-952.
- Liao C -C, Yousef AE, Richter ER, Chism GW. *Pediococcus acidilactici* PO2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in Foods. *J Food Sci* 1993;58(2):430-434. DOI:10.1111/j.1365-2621.1993.tb04291.x.
- Lingnau A, Domann E, Hudel M, et al. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* 1995;63(10):3896-3903.
- Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol.* 2007;24(7-8):711-717. DOI:10.1016/j.fm.2007.03.009.
- Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*.,USA , CRC Press. 2008;153.
- Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol* 2007. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.045.
- Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol.* 2006;55(6):645-659. DOI:10.1099/jmm.0.46495-0.

- Liu H, Lu L, Pan Y, et al. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*. 2015;52(June):78-84. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.12.017.
- Liu L, O'Conner P, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin a by *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol* 2008;104(4):1059-1066. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03640.x.
- Loff M, Mare L, de Kwaadsteniet M, Khan W. 3MTM Molecular detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of *Escherichia coli* Oa157:H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. *J Microbiol Methods* 2014;101C:33-43. DOI:10.1016/j.mimet.2014.03.015.
- Lohans CT, Vederas JC. Development of class IIa bacteriocins as therapeutic agents. *Int J Microbiol*. 2012. DOI:10.1155/2012/386410.
- Lou Y, Yousef AE. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(4):1252-1255.
- Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, et al. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):15-19.
- Lovett, J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 1988;71(3), 658-660.
- Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J London Engl* 1997. 1997;153(1):9-29.
- Low JC, Donachie W. *Listeria* in food: A veterinary perspective. *Lancet* 1989;333(8633):322. DOI:10.1016/S0140-6736(89)91324-X.
- Lukinmaa S, Aarnisalo K, Suihko ML, Siitonen A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(6):562-568. DOI:10.1111/j.1469-0691.2004.00876.x.
- Lundén JM, Autio TJ, Korkeala HJ. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *J Food Prot* 2002;65(7):1129-1133.
- Ma H, Shieh K-J, Lee S. Study of ELISA technique. *Nature* 2006;4(2):36-37.
- MacGowan AP, Bowker K, McLauchlin J, Bennett PM, Reeves DS. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int J Food Microbiol* 1994;21(4):325-334. DOI:10.1016/0168-1605(94)90062-0.

- MacGowan AP, Holt HA, Reeves DS. In-vitro synergy testing of nine antimicrobial combinations against *Listeria monocytogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1990;25(4):561-566.
- Magalhães R , Mena C , Ferreira V, Almeida G ,Silva J, Teixeira P. *Listeria monocytogenes: Methods and Protocols*. Springer New York; 2016;27
- Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2003;219(1):129-135. DOI:10.1016/S0378-1097(02)01207-7.
- Makhov AM, Hannah JH, Brennan MJ, et al. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol*. 1994;241(1):110-124. DOI:10.1006/jmbi.1994.1478.
- Mallet A, Guéguen M, Kauffmann F, Chesneau C, Sesboué A, Desmasures N. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int Dairy J* 2012;27(1-2):13-21. DOI:10.1016/j.idairyj.2012.07.009.
- Marquis H, Bouwer HGA, Hinrichs DJ, Portnoy DA. Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect Immun* 1993;61(9):3756-3760.
- Marquis H, Doshi V, Portnoy DA. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun* 1995;63(11):4531-4534.
- McDonald P. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Scholium Intl; 1991.
- Meloni D, Galluzzo P, Mureddu A, Piras F, Griffiths M, Mazzette R. *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: Prevalence and automated EcoRI ribotyping of the isolates. *Int J Food Microbiol* 2009;129(2):166-173. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.014.
- Mendum M Lou, Smith LT. Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(2):813-819. DOI:10.1128/AEM.68.2.813-819.2002.
- Mengaud J, Braun-Breton C, Cossart P. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol Microbiol* 1991;5(2):367-372.
- Miao EA, Scherer CA, Tsolis RM, et al. *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* 1999;34(4):850-864. DOI:mimi1651 [pii].

- Miettinen H, Wirtanen G. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *Int J Food Microbiol* 2005;104(2):135-143. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.01.013.
- Miller AJ. Combined Water Activity and Solute Effects on Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot* 1992;55(6):414-418.
- Miller FA, Ramos B, Gil MM, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. *Int J Food Microbiol* 2009. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.007.
- Minahk CJ, Dupuy F, Morero RD. Enhancement of antibiotic activity by sub-lethal concentrations of enterocin CRL35. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(2):240-246. DOI:10.1093/jac/dkh079.
- Moors MA, Levitt B, Youngman P, Portnoy DA. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1999;67(1):131-139.
- Moshtaghi H, Mohamadpour AA. Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathog Dis* 2007;4(1):107-110. DOI:10.1089/fpd.2006.61.
- Muck RE. Recent advances in silage microbiology. *Agric Food Sci* 2013;22(1):3-15.
- Mukhopadhyay A, K. Mukhopadhyay U. Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2007;68(1):193-200. DOI:10.1016/j.mimet.2006.07.009.
- Muriana, PM. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*, 1996;59(13), 54-63.
- Murray EGD, Webb R a., Swann MBR. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol* 1926;29(4):407-439. DOI:10.1002/path.1700290409.
- Müller S, Hain T, Pashalidis P, et al. Purification of the inlB gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun* 1998;66(7):3128-3133.
- Nicolau AI, Bolocan AS. Sampling the Processing Environment for *Listeria*. *Listeria monocytogenes: Methods and Protocols*. Humana Press.2014.
- Niebuhr K, Ebel F, Frank R, et al. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J* 1997;16(17):5433-5444. DOI:10.1093/emboj/16.17.5433.
- Nightingale KK, Windham K, Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal Listeriosis cases and foods evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated

- from human and animal Listeriosis cases and foods. *J Bacteriol* 2005;187(16):5537-5551. DOI:10.1128/JB.187.16.5537.
- Nilsson L, Chen Y, Chikindas ML, Huss HH, Gram L, Montville TJ. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(2):769-774. DOI:10.1128/AEM.66.2.769-774.2000.
- Nolan DA, Chamblin DC, Troller JA. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int J Food Microbiol* 1992;16(4):323-335. DOI:10.1016/0168-1605(92)90034-Z.
- Nout MJR, Bouwmeester HM, Haaksma J, Vandijk H. Fungal growth in silages of sugar-beet press pulp and maize. *J Agric Sci* 1993;121:323-326. DOI:10.1017/S0021859600085506.
- Nucera D, Grassi M, Morra P, Piano S, Tabacco E, Borreani G. Detection, identification, and typing of *Listeria* species from baled silages fed to dairy cows. *J Dairy Sci* 2016;99. DOI:10.3168/jds.2016-10928.
- Palumbo JD, Borucki MK, Mandrell RE, Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *J Clin Microbiol* 2003;41(2):564-571. DOI:10.1128/JCM.41.2.564-571.2003.
- Palumbo Jeffrey D., Monica K., Mandrell R.. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Identification of Mixed-Serotype Cultures by Colony Immunoblotting. *J Clin Microbiol* 2000;41(2):564-571.
- Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 2004;4(10):812-823. DOI:10.1038/nri1461.
- Panesar PS, Kaur S. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. *Int J Food Sci Technol* 2015;50(10):2143-2151. DOI:10.1111/ijfs.12886.
- Parida SK, Domann E, Ronde M, et al. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* 1998;28(1):81-93. DOI:10.1046/j.1365-2958.1998.00776.x.
- Paris A., Riboldi E, Salmi F, Bacci C, Bonardi S, Brindani F. First results on the detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk: comparison of two different analytical methods. *Vet Res Commun* 2009;33(S1):253-255. DOI:10.1007/s11259-009-9290-8.
- Pauly T, Tham W. Survival of *Listeria monocytogenes* in wilted and additive-treated grass silage. *Acta Vet Scand* 2003;44(2):73-86.
- Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J. Clin. Microbiol* 2003;41(11):5308-5310. doi:10.1128/JCM.41.11.5308.
- Petran RL, Zottola EA. A Study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Sci* 1989;54(2):458-460. DOI:10.1111/j.1365-2621.1989.tb03105.x.

- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. J Pathol 2006;208(2):215-223..
- Ponniah J, Robin T, Paie MS, et al. *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. Food Control. 2010;21(5):774-778. DOI:10.1016/j.foodcont.2009.09.008.
- Portanti O, di Febo T, Luciani M, Pompilii C, Lelli R, Semprini P. Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. Vet Ital 2011;47(3):281-290.
- Portnoy DA. Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. Curr Opin Immunol 1992;4(1):20-24.
- Power EG. RAPD typing in microbiology--a technical review. J Hosp Infect 1996;34:247-265. DOI:10.1016/S0195-6701(96)90106-1.
- Poyart-Salmeron C, Trieu-Cuot P, Carlier C, MacGowan A, McLauchlin J, Courvalin P. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36(2):463-466. DOI:10.1128/AAC.36.2.463.
- Pron B, Boumaila C, Jaubert F, et al. Comprehensive study of the intestinal stage of Listeriosis in a rat ligated ileal loop system. Infect Immun 1998;66(2):747-755.
- Raffelsbauer D, Bubert A, Engelbrecht F, et al. The gene cluster inlC2DE of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. Mol Gen Genet 1998;260(2-3):144-158. DOI:10.1007/s004380050880.
- Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. Food Control 2010;21(11):1448-1452. DOI:10.1016/j.foodcont.2010.03.014.
- Rahimi E, Momtaz H, Behzadnia A, Baghbadorani ZT. Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. Asian Pacific J Trop Dis 2014;4(1):50-53. DOI:10.1016/S2222-1808(14)60313-3.
- Ravyts F, Barbuti S, Frustoli MA, et al. Competitiveness and antibacterial potential of bacteriocin-producing starter cultures in different types of fermented sausages. J Food Prot 2008;71(9):1817-1827.
- Reissbrodt R. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. - An overview. Int J Food Microbiol 2004;95(1):1-9. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.025.
- Renterghem B Van, Huysman F, Rygole R, Verstraete W. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. J Appl Bacteriol 1991;71(3):211-217. DOI:10.1111/j.1365-2672.1991.tb04450.x.

- Renzoni A, Cossart P, Dramsl S. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Mol Microbiol* 1999;34(3):552-561. DOI:10.1046/j.1365-2958.1999.01621.x.
- Revazishvili T, Kotetishvili M, Stine OC, Kreger AS, Morris JG, Sulakvelidze A. Comparative Analysis of Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterizing *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Environmental and Clinical Sources. *J Clin Microbiol* 2004;42(1):276-285. DOI:10.1128/JCM.42.1.276-285.2004.
- Ripio MT, Domínguez-Bernal G, Lara M, Suárez M, Vázquez-Boland JA. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1997;179(5):1533-1540.
- Ripio MT, Domínguez-Bernal G, Suárez M, Brehm K, Berche P, Vázquez-Boland JA. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol* 1996;147(5):371-384. DOI:10.1016/0923-2508(96)84712-7.
- Rocourt J, Jacquet C, Reilly a. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int J Food Microbiol*. 2000;62(3):197-209.
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Pla M. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004;233(2):257-267. DOI:10.1016/j.femsle.2004.02.018.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 1999;97(2):221-231. DOI:10.1016/S0092-8674(00)80732-1.
- Rosimin AA, Kim MJ, Joo IS, Suh SH, Kim KS. Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. *LWT - Food Sci Technol* 2016;69:601-607. DOI:10.1016/j.lwt.2016.02.007.
- Rota C, Yanguela J, Blanco D, Carramilana JJ, Arino A, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in 144 *Listeria* isolates from Spanish dairy and meat products. *J Food Prot* 1996;59(9):938-943(6).
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Preface to the First Edition. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007a; 11
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007b; 23
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Natural environment and transmission of human Listeriosis. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007c; 35

- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Surrogate Microorganisms for thermal studies. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007d; 168
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Water Activity. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007e; 171
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. *Listeria* spp. in soil and vegetation. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007f; 28
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Fresh, raw-milk cheese, Sweden. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007g; 342-343
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Ecology of *Listeria* species in different environments. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007h; 27
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Transmission to animals. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007i; 57
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Listeriosis in animals. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007j; 67-68
- Ryser, E. ve Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. 3rd Ed., NW, USA. CRC Press. 2007k; 227
- Ryser ET, Arimi SM, Donnelly CW. Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(9):3695-3697.
- Ryu J, Park SH, Yeom YS, et al. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* 2013;32(2):659-664. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.01.048.
- Saavedra L, Minahk C, De Ruiz Holgado AP, Sesma F. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH₂-terminal sequence. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(7):2778-2781. DOI:10.1128/AAC.48.7.2778-2781.2004.
- Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P, Bierne H. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun* 2005;73(10):6912-6922. DOI:10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005.
- Sağun E, Sancak YC, İşleyici Ö, Ekici K. The presence and prevalence of *Listeria* Species in milk and herby cheese in and around Van. *Turkish J Vet Anim Sci* 2001;25(1):15-19.
- Sallen B, Rajoharison a, Desvarenne S, Quinn F, Mabilat C. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46(3):669-674. DOI:10.1099/00207713-46-3-669.
- Salvucci E, Saavedra L, Hebert EM, Haro C, Sesma F. Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9:68-74. DOI:10.1089/fpd.2011.0972.

- Sauders BD, Fortes ED, Morse DL, et al. Molecular subtyping to detect human Listeriosis clusters. *Emerg Infect Dis* 2003;9(6):672-680.
- Saunders N a. Real-time PCR. *Methods Mol Biol.* 2004;266:191-211. DOI:10.1385/1-59259-763-7:191.
- Scannell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin®. In: *International Journal of Food Microbiology* Vol 60. ; 2000:241-249. DOI:10.1016/S0168-1605(00)00314-7.
- Schlüter D, Domann E, Buck C, et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral Listeriosis. *Infect Immun* 1998;66(12):5930-5938.
- Schmid MW, Ng EYW, Lampidis R, et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol.* 2005;28(1):1-18. DOI:10.1016/j.syapm.2004.09.005.
- Schmitt M. Protocol for boiling extraction of genomic DNA from cultured cells. https://www.dkfz.de/gpcf/fileadmin/ccontrol/lysate_Protocol_DKFZ.pdf, 2017
- Schnupf P, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes Infect* 2007;9(10):1176-1187.
- Schoder D, Melzner D, Schmalwieser A, Zangana A, Winter P, Wagner M. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *J Food Prot.* 2011;74(6):919-924.
- Seeliger KH. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol* 1993;13(11):31-49.
- Seeliger, HPR. Listeriosis, Hafner. New York, 1961;122-123
- Seveau S, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes Infect* 2007;9(10):1167-1175.
- Skovgaard N, Morgen CA. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int J Food Microbiol* 1988;6(3):229-242. DOI:10.1016/0168-1605(88)90015-3.
- Slade P, Collins-Thompson D. Listeria, plasmids, antibiotic resistance, and food. *Lancet* 1990;336(8721):1004. DOI:10.1016/0140-6736(90)92464-S.
- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1995;63(11):4231-4237.

- Smith LT. Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill- stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(9):3088-3093.
- Smith MA, Takeuchi K, Anderson G, et al. Dose-response model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths in nonhuman primates. *Infect Immun* 2008;76(2):726-731.
- Sokolovic Z, Fuchs A, Goebel W. Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1990;58(11):3582-3587.
- Soontharanont, S., & Garland, C D. (1995, October). The occurrence of *Listeria* in temperate aquatic habitats. In proceedings of XII international symposium on problems of Listeriosis. Perth, Western Australia, Publication Promaco Conventions (pp. 145-146).
- Soriano JM, Rico H, Moltó JC, Mañes J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. *J Food Prot* 2001;64(4):551-553.
- Spanu C, Scarano C, Ibba M, Spanu V, De Santis EPL. Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. *Food Control* 2015;47:318-325. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.07.027.
- Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog Dis* 2005;2(3):201-211. DOI:10.1089/fpd.2005.2.201.
- Stephan R, Buhler K. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in bulk-tank milk samples from north-east Switzerland. *Arch Lebensmittelhyg* 2002;53(3):62-65.
- Stephens PJ, Jones M V. Reduced ribosomal thermal denaturation in *Listeria monocytogenes* following osmotic and heat shocks. *FEMS Microbiol Lett* 1993;106(2):177-182.
- Strydom A, Witthuhn CR. *Listeria monocytogenes*: A target for bacteriophage biocontrol. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2015;14(6):694-704. DOI:10.1111/1541-4337.12153.
- Szabo EA, Cahill ME. Nisin and ALTA(TM) 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100% CO₂. *Lett Appl Microbiol* 1999;28(5):373-377. DOI:10.1046/j.1365-2672.1999.00547.x.
- Taşçı F, Türütoğlu H, Ögütçü H. Burdur yöresinde üretilen süt ve silajlarda *Listeria* türlerinin araştırılması.Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010;16(Suppl.A):93-97. DOI:10.9775/kvfd.2010.1744.
- Telli N. *Listeria monocytogenes*'in Salamura beyaz peynir üretim hattında kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve PFGE metodu ile genotiplendirilmesi. Sağlık Bilim Enstitüsü Doktora Tezi. 2012.

- Thévenot D, Dernburg A, Vernozy-Rozand C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. J Appl Microbiol 2006;101(1):7-17.
- Tıknaçoğlu B. Yem bitkileri tarımı ve silaj yapımı. Samsun İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü- Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şube Müdürlüğü. https://samsun.tarim.gov.tr/Belgeler/Yayinlar/Kitaplarimiz/yem_bitkileri_tarimi_ve_silaj_yapimi.pdf, 2009.
- Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J Cell Biol 1989;109(4 Pt 1):1597-1608. DOI:10.1083/jcb.109.4.1597.
- Tompkin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J Food Prot 2002;65(4):709-725. DOI:10.4315/0362-028X-65.4.709.
- Türk gıda kodeksi.2017
- Türkmen,İ. Silaj yerel basın buluşmaları. İl gazetesi. <http://www.ilgazetesi.com.tr/silajda-yanlis-uygulama-250-milyon-dolardan-ediyor-216888h.htm>,2017
- Unnerstad H, Romell A, Ericsson H, Danielsson-Tham ML, Tham W. *Listeria monocytogenes* in faeces from clinically healthy dairy cows in Sweden. Acta Vet Scand 2000;41(2):167-171.
- USDA.<https://www.ars.usda.gov/northeast-area/wyndmoor-pa/eastern-regional-research-center/residue-chemistry-and-predictive-microbiology-research/docs/pathogen-modeling-program>, 2017
- USDA-FSIS. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat siluriformes (fish) and egg products, and environmental samples.<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES> ,2017
- Ünal RN, Besler T.. Beslenmede sütün önemi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. 40 sayfa. Ankara, 2008.
- Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, McCluskey BJ, Perdue ML. Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. J Dairy Sci 2004;87(9):2822-2830. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(04)73410-4.
- Vazquez-Boland JA, Kocks C, Dramsi S, et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. Infect Immun 1992;60(1):219-230.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 2001;14(3):584-640.DOI:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.

- Vilar MJ, Yus E, Sanjuán ML, Diéguez FJ, Rodríguez-Otero JL. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *J Dairy Sci* 2007;90(11):5083-5088.
- Viswanath P, Murugesan L, Knabel SJ, Verghese B, Chikthimmah N, Laborde LF. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in a small-scale mushroom production facility. *J Food Prot* 2013;76(4):608-615. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-12-292.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23(21):4407-4414. DOI:10.1093/nar/23.21.4407.
- Vuyst L De, Vandamme E. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications. Vol 5., 5th edition, Springer, 1994. DOI:10.1016/0924-2244(94)90027-2.
- Waak E, Tham W, Danielsson-Tham ML. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl Environ Microbiol* 2002. DOI:10.1128/AEM.68.7.3366-3370.2002.
- Watkins J, Sleath KP. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage-sludge and river water. *J Appl Bacteriol* 1981;50(1):1-9.
- Way SS, Thompson LJ, Lopes JE, et al. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol* 2004;6(3):235-242. DOI:10.1111/j.1462-5822.2004.00360.x.
- Weber A, Potel J, Schäfer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. Studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. *Zentralblatt für Hyg und Umweltmedizin. Int J Hyg Environ Med* 1995;198(2):117-123.
- Welch MD. Interaction of Human Arp2/3 Complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* (80) 1998;281(5373):105-108. DOI:10.1126/science.281.5373.105.
- Welsh RD.. Equine abortion caused by *Listeria monocytogenes* serotype 4. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983
- White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect* 2002;4(4):405-412. DOI:10.1016/S1286-4579(02)01554-X.
- Wiedmann M, Bruce JL, Knorr R, et al. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of Listeriosis in ruminants. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1086-1090.
- Wiedmann M, Czajka J, Bsat N, et al. Diagnosis and epidemiologic association of *Listeria monocytogenes* strains in 2 outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants. *J Clin Microbiol* 1994;32(4):991-996.

- Wollert T, Pasche B, Rochon M, et al. Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* 2007;129(5):891-902.
- Yakubu Y, Salihu M, Faleke O, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in raw milk from cattle herds within Sokoto Metropolis, Nigeria. *Sokoto J Vet Sci* 2012;10(2):13-17. DOI:10.4314/sokjvs.v10i2.3.
- Yang H, Qu L, Wimbrow AN, Jiang X, Sun Y. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and Real-Time PCR. *Int J Food Microbiol* 2007;118(2):132-138. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.019.
- Yeung PSM, Na Y, Kreuder AJ, Marquis H. Compartmentalization of the broad-range phospholipase C activity to the spreading vacuole is critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun* 2007;75(1):44-51.
- Yoder MD, Keen NT, Jurnak F. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Sci* 1993;260(5113):1503-1507. DOI:10.1126/science.8502994.
- Yokoyama E, Maruyama S, Katsube Y. Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 1998;40(1-2):133-137. DOI:10.1016/S0168-1605(98)00017-8.
- Yoshida T, Kato Y, Sato M, Hirai K. Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. *J Vet Med Sci* 1998;60:1165-1168.
- Yücel N, Balcı S. Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. *J Food Prot* 2010;73:380-384.
- Zaika LL, Fanelli JS. Growth kinetics and cell morphology of *Listeria monocytogenes* Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. *J Food Prot* 2003;66(7):1208-1215.
- Zenewicz LA, Shen H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect* 2007;9(10):1208-1215.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yunus GÜR

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 03.05.1977

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Erzincan Laborant Meslek Lisesi 1991-1994

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1996-2003

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2009-2018

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü 1996-1996

Sinop/Boyabat İlçe Gıda Tarım ve Hay. Müd. 1996-1997

Konya Veteriner Kontrol Ens. Müd. 1997-2004

Samsun Veteriner Kontrol Ens. Müd. 2004-.....

İletişim Bilgileri

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü

Yeşildere Mahallesi, Atatürk Bulvarı Alaçam Cad. 55200 Atakum/Samsun

E-posta:

yunus.gur@tarim.gov.tr

kuzeyli@gmail.com

Telefon:

(362) 437 0836-164