ERZURUM PİYASASINDAN TOPLANAN TAVUK ETİ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *LİSTERİA MONOCYTOGENES* TÜRÜNÜN MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Ebru YÜREKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL

Yüksek Lisans Tezi - 2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERZURUM PİYASASINDAN TOPLANAN TAVUK ETİ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *LİSTERİA MONOCYTOGENES* TÜRÜNÜN MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Ebru YÜREKLİ

Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL

ERZURUM
2014

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ERZURUM PİYASASINDAN TOPLANAN TAVUK ETİ ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *LİSTERİA MONOCYTOGENES* TÜRÜNÜN MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Ebru YÜREKLİ

Tez Savunma Tarihi : **24/06/2014**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Meryem AYDEMİR ATASEVER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM – 2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **III**

ÖZET ..... **IV**

ABSTRACT ..... **V**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VI**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **VIII**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **IX**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **6**

2.1. *Listeria monocytogenes* 13

2.1.1. Tarihçesi 13

2.1.2. Taksonomisi 14

3. MATERYAL VE METOT **16**

3.1. Materyal 16

3.1.1. Yararlanılan Cihazlar 16

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışı 17

3.2. Metot 20

3.2.1. Tavuk Eti Örneklerinin Toplanması 20

3.2.2. İzolasyon 21

3.2.3. Konvensiyonel Testler 21

3.2.4. VITEK 2 Kompakt ile Tanılama 23

3.2.5. Genomik DNA İzolasyonu ve Çalışma Konsantrasyonun Belirlenmesi 23

3.2.6. Spesifik PCR 26

3.2.7. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Genomik Parmakizi Belirlenmesi 27

3.2.8. Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu 29

3.2.9. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması, Sekans Analizi ve Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırması 30

4. BULGULAR 32

4.1. İzolasyon Sonuçları 32

4.2. Konvensiyonel Test Sonuçları 33

4.3. VITEK 2 Kompakt Sonuçları 33

4.4. Spesifik PCR Sonuçları 33

4.5. rep-PCR Sonuçları 34

4.5.1. ERIC-PCR 34

4.5.2. REP-PCR 35

4.5.3. BOX-PCR 36

4.5.4. $(GTG)_5$-PCR 38

4.6. ERIC-PCR Sonucuna Göre Cluster Analizi 39

4.7. 16S rRNA PCR Sonucu 40

4.8. İzolatların 16S rRNA Sekans Analiz Sonuçları 40

5. TARTIŞMA 42

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 45

KAYNAKÇA 46

EKLER 59

EK 1. ÖZGEÇMİŞ 59

EK 2. L2 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası 60

EK 3. L5 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası 61

EK 4. L11 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası 62

EK 5. ETİK KURUL ONAY FORMU 63

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasını titizlikle takip eden, maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL'e, desteklerinden dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa ATASEVER, Sayın Prof. Dr. Ziya Gökalp CEYLAN ve Yrd. Doç. Dr. Meryem AYDEMİR ATASEVER'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca fikirleri ve becerileri ile hep yanımda olan Arş. Gör. Berna ÖZTÜRK KARAGÖZ'e ve Vet. Hekim. Mehmet KAÇAR'a, yine çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL ve seçimlerimi yargılamadan bana destek olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Ebru YÜREKLİ

Haziran-2014

ÖZET

Erzurum Piyasasından Toplanan Tavuk Eti Örneklerinden İzole Edilen *Listeria Monocytogenes* Türünün Moleküler Tanımlanması

Amaç: Erzurum ilinde tüketime sunulan tavuk eti örneklerinden izole edilen *Listeria monocytogenes* izolatlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonu.

Materyal ve Metot: Bu çalışma, Erzurum yöresindeki kasap ve parekende marketlerden toplanan 200 adet tavuk eti örneği üzerinden yürütülmüştür. Kromojenik besiyeri kullanılarak *L. monocytogenes* suşları izole edilmiş, elde edilen izolatlar konvensiyonel ve moleküler testlere tabi tutulmuştur.

Bulgular: Yapılan izolasyon çalışması sonucunda 200 adet tavuk eti örneğinin; 11 tanesinde *L. monocytogenes* varlığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar konvensiyonel testler, VITEK ve spesifik PCR verileriyle desteklenmiştir. Daha sonra, test izolatları arasında ki genotipik farklılıkların tespiti amacıyla yapılan rep-PCR analizi sonucunda ERIC-PCR yönteminin tür seviyesinde *L. monocytogenes* bakterisinin identifikasyonu ve karakterizasyonda başarılı bir şekilde kullanılabileceği tespit edilmiştir. En fazla polimorfik bant veren ERIC-PCR verileri kullanılarak gerçekleştirilen cluster analizi sonucunda, farklı clusterlarda yer alan 3 örnek seçilmiş ve 16S rRNA sekans analizine tabi tutulmuştur. Yapılan bu çalışma sonucunda her 3 izolatın da, %99 oranında *L. monocytogenes*'e benzediği belirlenmiştir.

Sonuç: *L. monocytogens* strainlerinin genotipik karakterizasyonunda ERIC-PCR yönteminin, kullanılan diğer rep-PCR çeşitlerine göre oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir

Anahtar Kelimeler: *L. monocytogenes,* rep-PCR (BOX-, ERIC-, $(GTG)_5$-, REP-PCR), Spesifik-PCR, Tavuk eti, VITEK, 16S rRNA sekans analizi

ABSTRACT

Moleculer Identification *Listeria monocytogenes* Isolated from Chicken Meat Collected from Erzurum Market

Purpose: Phenotypic and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates, which were isolated from chicken meat samples presented for consumption in Erzurum province

Materials and Methods: A sum of 200 chicken meat samples, which were obtained from butchers and retail stores in Erzurum. *L. monocytogenes* strains was isolated using chromogenic medium. The obtained isolates were subjected to conventional and molecular tests.

Results: Eleven of 200 chicken meat samples were found to be contaminated with *L. monocytogenes*. This result was supported with conventional tests, VITEK and specific PCR data. Results of rep-PCR, which was performed to determine genotypic differences between test isolates, showed that ERIC-PCR method can be successfully used in identification and characterization of *L. monocytogenes* at species. Three samples, which were in different clusters according to cluster analyzes performed with the most band-giving ERIC-PCR data, were chosen and subjected to 16S rRNA sequence analyzes. The results indicated that all three isolates 99% resemble *L. monocytogenes*

Conclusion: In genotypic characterization of *L. monocytogenes* strains, ERIC-PCR method was found to be much more succesful when compared to other rep-PCR methods.

Keywords: Chicken meat, *L. monocytogenes,* rep-PCR (BOX-, ERIC-, $(GTG)_5$-, REP-PCR), Specifik-PCR, VITEK, 16S rRNA sequence analysis

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
µM	: Mikromolar
nmol	: Nano mol
nm	: Nanometre
ml	: Mililitre
M	: Molar
N	: Normal
L	: Litre
g	: Gram
A	: Absorbans
a_w	: Su aktivitesi
dk	: Dakika
s	: Saniye
sdH_2O	: Steril distile su
dH_2O	: Distile su
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
NaCl	: Sodyum klorit tuzu
KOH	: Potasyum hidroksit
bp (bç)	: Base pair (Baz çifti)
BSA	: Bovine serum albumin

CTAB : Hekzadesil trimetil-amonyum bromit

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleikasit

dNTP : Deoksinükleotittrifosfat

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

ERIC-PCR : Enterobacterial repetitive intragenic consensus

Rep-PCR : Repetitive extragenic palindromic

NA : Nutrient agar

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD : Randomly amplified polymorphic DNA

RNA : Ribonükleik asit

rRNA : Ribozomal RNA

SDS : Sodyum dedosil sülfat

TAE : Tris-asetat-edta tamponu

TBE : Tris-brote-edta tamponu

TE : Tris-EDTA tamponu

Tris-HCl : Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 4.1. Saflaştırılmış *Listeria monocytogenes* kültürü 32

Şekil 4.2. Bakteri izolatlarının spesifik-PCR elektroforez sonuçları..... 33

Şekil 4.3. Bakteri izolatlarının ERIC-PCR elektroforez sonuçları.. 35

Şekil 4.4. Bakteri izolatlarının REP-PCR elektroforez sonuçları..... 36

Şekil 4.5. Bakteri izolatlarının BOX-PCR elektroforez sonuçları..... 37

Şekil 4.6. Bakteri izolatlarının $(GTG)_5$-PCR elektroforez sonuçları..... 39

Şekil 4.7. ERIC-PCR Sonuçlarına göre cluster analiz sonuçları..... 40

Şekil 4.8 16S rRNA PCR sonuçları..... 40

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 3.1. Primerler ve PCR programı 31

1. GİRİŞ

Toplumların kalkınması ve ekonomilerinin güçlendirilmesinde sağlıklı insan gücü önemli bir faktör olup, bunda dengeli beslenme büyük önem taşımaktadır.[1] Yeterli ve dengeli beslenme; vücudun büyümesi, dokuların yenilenmesi için gerekli olan besin öğelerinin (proteinler, yağlar, karbonhidratlar, mineral maddeler ve vitaminler) her birinin yeterli miktarlarda alınıp vücutta özümsenmesidir.[2]

Bütün insanların temel ihtiyaçlarından biri olan beslenme, gıda ve sağlık açısından önemli olup, bu hizmetin yeterli ve dengeli sunumunun yanı sıra hijyenik ve güvenilir olması oldukça önemlidir.[3, 4] Gıda güvenliğinin sağlanamadığı durumlarda, gıda kaynaklı hastalıklar ortaya çıkabilmekte ve bazen ölümcül sonuçlara neden olabilmektedir. Bu da toplumlar için büyük bir sosyal ve ekonomik yük oluşturmaktadır.[5]

Besin bir yandan yeterli ve dengeli beslenme için gerekli olan öğeleri sağlamakta, diğer yandan da gıda zehirlenmesine neden olabilecek risk faktörlerinin taşınmasına da aracılık ederek ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.[6] Özellikle üretim, pazarlama ve benzeri faaliyetler sırasında bulaşan fekal (dışkı) kaynaklı bakteriler, gıdaları kontamine ederek insan ve hayvan sağlığını ciddi düzeyde tehdit eden gıda kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır.[7]

İnsan vücudu için gerekli temel aminoasitleri, yağları, karbonhidratları, vitaminleri ve mineralleri bulundurması, besin içeriğinin zengin olması, su aktivitesinin yüksekliği ve pH değerinin patojen mikroorganizmalar da dahil olmak üzere çoğu mikroorganizmanın gelişmesine olanak sağlamasından dolayı, et ve et ürünleri çok geniş bir mikroorganizma grubunun gelişimi için ideal bir kültür ortamıdır.[8-12] Bundan dolayı günümüzde dünyada meydana gelen gıda kaynaklı sağlık sorunları içerisinde et ve et ürünlerinin oluşturduğu riskler ilk sırada yer almaktadır. Et ve et ürünlerinden

kaynaklanan sağlık problemlerinin; üretim, işleme, muhafaza, taşıma, pazarlama ve tüketim zincirindeki yetersiz ve bilinçsiz uygulamalara bağlı olarak meydana geldiği belirtilmektedir.[13]

Son zamanlarda, dünyada tavuk endüstrisinde görülen hızlı gelişme ve diğer etlerle karşılaştırıldığında daha az yağlı, protein oranı daha yüksek, sindirimi daha kolay, vitamin ve mineraller açısından daha zengin ve kırmızı ete oranla fiyatı daha ucuz olmasından dolayı tavuk eti tüketimi giderek artmaktadır. Bu değişime paralel olarak tavuk etinden kaynaklanan gıda enfeksiyon ve zehirlenme vakalarında önemli artışlar gözlemlenmektedir.[10, 14, 15]

Taze ette genel olarak 20 ayrı bakteri türü, 10 çeşit mantar, küf ve benzeri mikroorganizmlar bulunabilmektedir. Bakteri olarak *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Archromobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Escherichia* spp., *Aerobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus* spp., *Microbacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., görülmekte olup, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni, Staphylococcus aureus* ve *L. monocytogenes* tavuk eti ürünlerinde de sıklıkla görülen patojenik bakterilerdir. [8, 11]

L. monocytogenes'e hayvan kaynaklı pişmemiş gıdalarda, deniz ürünlerinde, et ve et ürünlerinde, taze ve donmuş kümes hayvanlarının etlerinde, balıkta, çiğ ve pastörize edilmiş süt ve süt ürünlerinde, pişmiş tavukta, pişmemiş sebze ve meyvelerde rastlamak mümkün olup, kanatlı etler bu organizmanın üremesi için diğer gıdalara göre daha elverişlidir.[16, 17]

Besin zehirlenmelerinde genellikle izole edilen en önemli patojenlerden biri olan *L. monocytogenes*; çevreye geniş ölçüde yayılmış, pH'ya, sıcaklığa, tuz koşullarına aşırı toleranslı, buzdolabı sıcaklığında, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığı sürdürebilen bir organizmadır. Kırktan fazla

hayvan türünde ve insanlarda birkaç ciddi enfeksiyondan sorumlu, Gram pozitif, çomakçık şeklinde, endospor ve kapsül içermeyen, hareketli (18-26^{o}C'de), zorunlu hücre içi parazit bir bakteridir.[17-22]

L. monocytogenes ile kontamine olmuş gıda ürünlerin yenmesi insan ve hayvanlarda listeriosis'e neden olmaktadır.[8, 23] Özellikle bu bakterinin, gıda işleme ortamlarında bulunma ihtimalinin yüksek olması ve düşük ortam sıcaklığında büyüyebilmesi, gıda endüstrisi ve gıda güvenliği açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir.[24] Bu sebeplerden dolayı gıda kökenli bir patojen olarak *L.monocytogenes*'in ekonomi ve halk sağlığı üzerine önemli etkileri bulunmaktadır.[25, 26]

Listeriosis; hamile kadınlarda, yeni doğanlarda, yaşlılarda ve bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda (örn., şeker hastaları, alkol bağımlıları, AIDS hastaları, böbrek hastaları, steroid kullanımı) daha sık görülmektedir.[8, 22] Tipik olarak septisemi, meningitis, meningo encephalitis ve yavru atımı gibi çeşitli formlarda ortaya çıkmaktadır. İnsanda listeriosiz enfeksiyonun erken evresi genelde spesifik olmayan grip ve gastroenteritis benzeri septomlar (örn., titreme, yorgunluk, baş ağrısı, kas ve eklem ağrısı) sergilemektedir.[22, 24] Hayvanlarda da ciddi enfeksiyonlara neden olan etmen özellikle, büyük baş hayvanlarda yavru atımı ve encephalitise sebep olmaktadır.[27]

Son yıllarda, bu hastalığın görülme oranındaki artış, gerek Avrupa'da gerekse Türkiye'de gıda mevzuatı açısından bazı değişikliklerin yapılmasına sebep olmuştur. Türk Gıda Kodeksi-Mikrobiyolojik Kriter Tebliği'nde, 2009 yılında yapılan değişiklikle birçok gıda grubunda *L. monocytogenes* aranması artık zorunlu hale getirilmiştir.[28]

Gıda kökenli bakteriyal patojenler, gıda güvenliği açısından oldukça önemli olup, bu patojenlerin doğru tanımlanması, hem gıda kalitesi hem de temini sırasında ortaya çıkabilecek kontaminasyon etmeninin takibi açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla bilim insanları tarafından patojenik mikrorganizmaların identifikasyonu

amacıyla; hem konvensiyonel hem de moleküler yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.[19] Özellikle *L.monocytogenes*'in diğer *Listeria* türlerine morfolojik ve biyokimyasal açıdan benzerlik göstermesi, çevrede yaygın olarak bulunması, stres durumlarında bile toksin üretebilmesi, spesifik olmayan klinik belirtiler vermesi, hastalığın etkin kontrolü, ekonomik kayıpların engellenmesi ve gıda kalite güvenliği dikkate alındığında, bu etmenin hızlı, spesifik ve duyarlı yöntemlerle tanısı halk sağlığı bakımından büyük önem arz etmektedir.[22]

Serotiplendirme, faj tiplendirme, antibiyotik direnç (R-tip), biyo tiplendirme, antibiyogram gibi klasik metotlar ve bakteriosin tanımlama, gıda kökenli patojen tespiti için bilinen en yaygın metotlar olup, bunlar zahmetli, duyarsız, yavaş ve genellikle güvenilmezdir. Bundan dolayı daha tanımlayıcı moleküler metotlara ihtiyaç duyulmakta olup, bu teknikler tür ve alt tür ayrımına olanak sağlamaktadır. En yaygın olarak kullanılan moleküler tekniklerin bir kaçı; gen amplifikasyonu ve genomik parmak izi analiz yöntemleri (Randomly Amplified Polimorphic Detection: RAPD, Restriction Fragment Lenght Polymorphism: RFLP, Amplified Fragment Lenght Polymorphism: AFLP, Repetitive Extragenic Palindromic: REP-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus: ERIC-PCR, BOX-PCR, GTG_5-PCR, Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Ribosomal DNA: rDNA-PCR, Spesific PCR vb.), genel PCR teknikleri, yağ asit metil ester (FAMEs) analizi (Microbial Identification System: MIS), metabolik parmakizi teknikleri (VITEK, BIOLOG, API vb.), serolojik teknikler (Agglutination, Immunofluorescence, Dot Immunobinding Assay, Immuno Blot, Radioimmunoassay and Enzim-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ve nicelikli DNA hibridizasyonudur. Birbirlerine genetik olarak yakın olan mikroorganizmaların ayırımı ve strainler arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koyma noktasında sahip olduğu

büyük avantajdan dolayı, bu yöntemler ekosistem çeşitliliğini tanılamada daha güvenilirdir.[29-39]

Bu çalışma ile; Erzurum ilinde tüketime sunulan tavuk eti örneklerinden halk sağlığı yönünden önemli bir patojen olan *L. monocytogenes* izole edilerek; konvensiyonel testler, VITEK, Spesifik-PCR, REP-, ERIC-, $(GTG)_5$-, BOX-PCR ve 16S rRNA sekans analiz yöntemleri kullanılarak fenotipik ve genotopik karakterizasyonu amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Gıda kaynaklı enfeksiyon ve zehirlenmelerde dünya genelinde önemli bir artış gözlemlenmekte olup, bunda temel rol oynayan organizmalardan biri de *Listeria monocytogenes*'dir. *L. monocytogenes*'in sebep olduğu listeriosisin spesifik belirtiler göstermemesi, ölüm oranının yüksek olması, patojenin diğer *Listeria* türlerine morfolojik ve biyokimyasal olarak benzerlik göstermesinden dolayı, etmenin hızlı ve doğru olarak tespitini sağlayan yöntemlerin ortaya konulması ve insidansın belirlenmesi noktasında bilim insanlarını yeni arayışlara yönlendirmiştir.[16, 24, 40] Bu amaçla yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Topcu[8] Ankara il merkezinde çeşitli lokanta ve büfelerde tüketime sunulan döner kebap çeşitlerinin mikrobiyolojik kalitesini araştırmak amacıyla 25 çiğ ve 25 pişmiş olmak üzere toplam da 50 adet et ve tavuk döner örneğini incelemiştir. Çiğ et döner örneklerinin 4 tanesinde (%16), pişmiş et döner örneklerinin 1 tanesinde (%4), çiğ tavuk döner örneklerinin 3 tanesinde (%12) ve pişmiş tavuk döner örneklerinin ise 1 tanesinde (%4) *L. monocytogenes*'in varlığını ortaya koymuştur.

Yeşilyurt[41] Aydın ili çevresinde bulunan 3 farklı mezbahadan, kesim araç gereçlerinden ve kasaplardan almış olduğu 348 adet svap örneğinden toplam 16 adet *Escherichia coli* O157:H7 ve 12 adet *L. monocytogenes* straini izole ve identifiye etmiştir. Mezbahaların hayvan kabul yerleri, kesimhaneleri, kasap çalışanlarının elleri incelendiğinde bu noktaların *L. monocytogenes* kontaminasyonunda temel rezervuar olduğunu belirlemişlerdir.

Barüşük[18] İstanbul ilinin farklı yerlerinde satılan, farklı markalara ait 10 sucuk, 10 salam ve 10 sosis örneği olmak üzere toplam 30 adet numunede *L. monocytogenes* varlığı spesifik PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle tespit edilmeye çalışılmış, analiz neticesinde hiçbir numunede etmenin varlığına rastlanmamıştır.

Ayaz[16] Ankara'da taze olarak tüketime sunulan paketlenmiş 180 hindi kıyma örneğinden, IMS (immuno manyetik separasyon) temelli kültür tekniğiyle 32 *L. monocytogenes* izole etmiş ve bu izolatları doğrulamak amacıyla, *hlyA* genine özgü primerler kullanarak PCR analizi yapmıştır. Sonuç olarak IMS temelli kültür tekniğiyle izole ettiği bütün suşların *hlyA* genine sahip olduğunu bulmuştur

Tuğrulelçi[40] Kayseri ilindeki farklı satış noktalarından 25 ezme, 25 çiğ köfte, 25 beyin salatası ve 25 Rus salatasında konvansiyonel yöntemlerle *L. monocytogenes* varlığını araştırmış ve tüketime hazır gıda örneklerinden 3'ünün [2 çiğ köfte (%8; 2/25), 1 Rus salatası (%4; 1/25)] *L. innocua* ile kontamine olduğunu, hiçbir örnekte *L. monocytogenes*'e rastlanılmadığını ifade etmiştir.

Şahiner'in[28] *L. monocytogenes* izolasyonunda kullanılan ISO 11290-1 metodunu alternatif metot olan PCR ve ELFA (Enzyme Linked Fluorescence Assay) metoduyla karşılaştırmak amacıyla bir çalışma yapmış ve 3 metodun birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiğini fakat PCR ve ELFA metodunun daha avantajlı ve daha hızlı olduğunu belirtmiştir

Dinçer[42] *L. monocytogenes*'in hızlı tayinine yönelik immüno analiz tabanlı ve DNA tabanlı elektrokimyasal biyo sensör sistemleri geliştirmiş ve DNA tabanlı sensör sisteminin, etmenin teşhisinde immüno analiz tabanlı sensör sisteminden daha başarılı olduğunu gözlemlemiştir.

Öksüztepe ve ark.[43] Aydın ilinde yaptıkları insidans çalışmasında, 100 sucuk örneğinin 4 tanesinde *L. monocytogenes*, 7 tanesinde *L. innocua*, 3 tanesinde *L. welshimerii* varlığına rastlamışlar. Sonuç olarak, sucuk örneklerinin tamamının incelenen mikroorganizma grupları yönünden Türk Gıda Kodeksi Standartlarına uymadıklarını ve halk sağlığı açısından ciddi tehlikelere neden olabileceğini ifade etmişlerdir.

Cloak ve ark.[44] doğal bir şekilde kontamine olmuş perakende örneklerinde SAIF (Surface Adhesion Immunofluorescent) ve geleneksel kültür metotları ile, eş zamanlı zenginleştirme adımı kullanılarak *L. monocytogenes* ve *Salmonella enteritidis'*in varlığını test etmişler ve istatiksel analizde hem geleneksel kültür metodu ile elde edilen sonuçlar hem de SAIF ile elde edilen sonuçlar arasında mükemmel bir korelasyonun var olduğunu göstermişlerdir.

Van Kessel ve ark.[27] otomatikleştirilmiş rep-PCR'ın serotip 1/2a ve 4b strainleri arasında ayrım yapamadığını fakat 1/2a ve diğer serotipler arasında ayrım için kullanışlı olabileceğini göstermişlerdir.

Ballesteros ve ark.[45] multiplex PCR yönteminin tür tanısında kesin ve hızlı bir metot olduğunu, REP-PCR'ın gıda işleme tesislerinin takibi ve epidemiyolojik çalışmalar için yararlı bilgiler sunduğunu, *L. monocytogenes*'in alt tiplendirmesinde güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Wojciech ve ark.[21] ERIC-PCR ve PFGE yöntemlerinden elde ettikleri verilerle; gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes* strainlerin enfekte olmuş hayvanlardan izole edilen *L. monocytogenes* strainlerinden çok daha farklı genotip sergilediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca ERIC-PCR metodunun epidemiyolojik çalışmalarda *L. monocytogenes*'in teşhisinde oldukça yüksek bir ayrım gücüne sahip olduğunu göstermişlerdir.

Jersek ve ark.[38] gıdalardan, insanlardan ve hayvanlardan izole ettikleri *L. monocytogenes* strainlerini rep-PCR yöntemiyle karakterize etmişler. Sonuçta hem REP- hem de ERIC-PCR'ın *L. monocytogenes* izolatlarının tiplendirilmesinde önemli olanaklar sunduğunu ve her iki PCR çeşidininde benzer ayrım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Vollenhofer Schrumpf ve ark.[46] memran hibridizasyonu ve multiplex PCR üzerine temellendirilmiş ticari bir ürün olan the GeneGen MFP Detection Kit kullanmışlar ve bu kitin gıdadan elde edilen 4 patojen mikroorganizmanın (*Salmonella* spp., *E. coli* O157, *L. monocytogenes* ve *Campylobacter* spp.) belirlenmesinde yeterli olduğunu ve kısa zamanda sonuç verdiğini, yeni yöntemlerin ortaya konulmasının etkenin erken tespiti açısından önemini vurgulamışlardır.

Soultos ve ark.[47] multiplex PCR ile yaptıkları çalışmada, paketlenmiş 80 taze tavuk örneğinin 38'inde *Listeria* spp bulunduğunu ve bunların 14'ünde ise *L. monocytogenes* olduğunu tespit etmişler ve bu yöntemin gıda örneklerinde ki *Listeria* kontaminasyonunun belirlenmesinde oldukça başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

Özmen ve ark.[48] Gemlik Garnizonundaki askeri birliklerde tüketime sunulan tavuk etleri ile kesimhanelerde kesilen tavuklardan alınan 100'er adet tavuk karkası ve bağırsak içeriğinde, *Listeria* spp. varlığını araştırmış ve karkas örneklerinin 76 (%76) tanesinde *Listeria* spp'ye rastlamışlardır. İdentifiye edilen *Listeria*'ların 24'ünün (%31,6) *L. monocytogenes*, 43'ünün (%56,6) *L. innocua*, 4'ünün (%5,3) *L. murrayi*, 3'ünün (%3,9) *L. grayi* ve 2'sinin (%2,6) *L. welshimeri* olduğunu belirlemişlerdir. Bağırsak içeriğinden ise 12 (%12) adet *Listeria spp*. izole etmişler. Bunlardan 5'nin (%41,6) *L. monocytogenes*, 2'sinin (%16,7) *L. murrayi*, 2'sinin (%16,7) *L. welshimeri*, 2'sinin (%16,7) *L. seeligeri* ve 1'nin (%8,3) *L. innocua* olduğu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak gerek et ürünlerinin hazırlanması ve gereksede tüketime sunulması basamaklarında genel hijyen kurallarına yeterince uyulmadığını belirtmişlerdir.

Ueda ve ark.[49] Japonya'da tüketime sunulan tavuk ve domuz örneklerinden izole edilen 14 *L. monocytogenes* strainininin ayrımı için, RFLP ve *iap* geninin tekrarlayan sekans dizi analizini kullanmışlardır. Sonuçta patojen tespiti ve ayrımında genetik analiz yöntemlerinin oldukça başarılı olduğunu belirlemişlerdir.

Van Nierop ve ark. [50] Güney Afrika'nın Gauteng şehrindeki çeşitli perakendecilerden topladıkları 99 taze ve dondurulmuş tavuk karkaslarında *Salmonella* spp*., L. monocytogenes* ve *Campylobacter* spp. gibi gıda kökenli patojenlerin varlığını araştırmışlar. PCR tekniğin kültürel yöntemlere göre daha duyarlı ve daha doğru sonuç veya sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir.

Berktaş ve ark.[17] Van ilinden topladıkları 100 adet kıyma, 50 adet parça et, 25 adet sucuk, 25 adet salam, 25 adet sosis ve 25 adet pastırma örneğinden *L. monocytogenes* straininin bulunma oranını tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmalarının sonucunda; kıyma örneklerinin %73'ünde, parça et örneklerinin %74'ünde, sucuk örneklerinin %76'sında, salam örneklerinin %16'sında, sosis örneklerinin %44'ünde ve pastırma örneklerinin %32'sinde *Listeria* izolatlarının varlığına rastlamışlar. İzole ettikleri *Listeria* suşlarından ise; kıyma, sosis ve parça ette *L. innocua*, sucuk ve pastırmada *L. monocytogenes*, salamda ise *L. welshimeri*'nin en fazla bulunan kontaminantlar olduğunu belirlemişlerdir. Et ve et ürünlerinin çiğ olarak ya da yeteri kadar ısıl işlem uygulanmadan tüketilmesi halinde sağlık açısından önemli bir sorun oluşturabilecegini ifade etmişlerdir.

Suo ve ark.[51] çalışmalarında et ürünlerinde ki *Salmonella* spp., *E. coli* O157 ve *L. monocytogenes'*i etkili bir şekilde tespit etmek için çoklu patojen zenginleştirme tekniği ile birleştirilmiş multiplex real-time PCR'ı geliştirmişlerdir. Elde ettikleri veriler doğrultusunda bu metodun, çeşitli et ürünlerinde tek veya kompleks halde bulunan patojenlerin varlığını tespit etmede oldukça hızlı ve güvenilir olduğunu belirlemişlerdir.

Kobayashi ve ark.[52] 6 gıda patojenin (*Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* ve *L. monocytogenes*) aynı anda tespiti için tekli zenginleştirme broth (SEB) ortamında ön zenginleştirme yapmışlardır. Daha sonra multiplex real-time PCR metodunu hedef bakterilerin

taranması için uygulayarak, bu yöntemin PCR için gerekli olan malzeme miktarını (6 bakterinin bulunması için sadece 2 tüpe ihtiyaç duyuldu) azalttığını, iş yükünü hafiflettiğini ve patojenlerin taranması için gerekli olan zamanı azalttığını tespit etmişlerdir. Sonuçta moleküler yöntemlerin etmen veya etmenlerin tespitinde oldukça etkin olduğunu belirtmişlerdir.

Lawrence ve ark.[53] 6 aylık süreç boyunca gerek kesimhanede, gereksede çiğ ve pişirilmiş kanatlı ürünlerinde *Listeria* spp. ve *L. monocytogenesin*'in görünme sıklığına bakmışlardır. Çiğ ve pişirilmiş kanatlıların işleme ortamlarından ki numunelerin sırasıyla %26 ve %15 oranında *L. monocytogenes* içerdiğini belirlemişlerdi. Pişirilmiş tavuk eti ürünlerinin %8'i, çiğ tavuk eti ürünlerinin ise %91'inin *Listeria* spp ile kontamine olduğunu, bunların ise sırasıyla %0 ve %59'unda *L. monocytogenes* bulunduğunu tespit etmişlerdir. Multiplex PCR'ın *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes*'in belirlenmesinde hızlı bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir.

Cabrita ve ark.[54] tütsülenmiş et ve tavuk karkaslarından izole ettikleri toplam 39 *L. monocytogenes* strainleri ile 1/2a, 4a, 1/2b, 3b ve 4b serovarlarını içeren referans suşları, RAPD, *iap* ve *inlAB* virülans genlerinin polimorfizm analize tabi tutmuşlardır. Sonuçta izolatlar genotipik olarak karşılaştırıldığında virülans göstergesi ve gıda orijini arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığını belirlemişlerdir.

Çankaya[55] bazı doğal antimikrobiyal bileşiklerin *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* üzerine etkisini taze tavuk eti üzerinde gözlemlemiş ve Nisin'in et ortamında da *L. monocytogenes* üzerinde önemli inhibitör etki (+4 ºC) gösterdiğini, kullanılan iki düzeyin (73 ve 250 ppm) etkisinin istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olduğunu, Nisin'in 250 ppm düzeyinde ve MAP'la (Modifiye Atmosfer Paketleme) birlikte kullanıldığında 6. gün sonunda aerobik-kontrole göre 2,5 $\log_{10}$ fazla inhibisyona neden olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgulara göre, Nisin'in MAP ile

kombinasyonu soğuk depolamada ette, *L. monocytogenes* kontrolünde faydalı olacağını dile getirmiştir.

Güven ve ark.[56] çalışmalarında Elazığ ilindeki çeşitli satış yerlerinden temin ettikleri 100 kıyma, 80 sucuk, 80 tavuk eti ve 70 parça et örneğinde *Listeria* varlığını araştırmışlar. Sonuçta örneklerde *L. innocua* hemde *L. monocytogenes*'in varlığını gözlemlemişlerdir. Özellikle *L. monocytogenes*'in fazla miktarda bulunuşunun halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Harvey ve ark.[57] gıda kökenli *L. monocytogenes* izolatlarının moleküler tiplendirilmesinde rep-PCR yöntemi ile MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) ve PFGE metotlarını karşılaştırmışlardır. Sonuçta rep-PCR'ın ayrım gücünün MEE ve PFGE yöntemlerine göre daha düşük olduğunu, ama bu metodun diğer ikisine göre tekrarlanabilme potansiyelinin yüksek olduğunu ve rep-PCR tekniğinin PFGE ile birlikte *L. monocytogenes* tiplendirilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğin ifade etmişlerdir.

Ingianni ve ark.[58] *L. monocytogenes*'in gıdalarda hızlı bir şekilde tespiti için PCR ve DNA prob kombinasyonunu kullanmışlardır. Her iki yöntemde de *Listeria*'nın patojenitesinden sorumlu olan gen bölgesi hedef alınmıştır. Sonuçta *L. monocytogenes*'in tespitinde moleküler yöntemlerin hızlı ve spesifitesinin yüksek olduğunu, uyguladıkları bu yöntemin uzman olmayan kişiler tarafından dahi kolayca uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

Şireli ve ark.[59] Ankara'daki marketlerde taze olarak tüketime sunulan 40 kıyma, 30 köfte ve 30 burgerden oluşan toplam 100 tavuk eti ürününde *Listeria* varlığını araştırmışlar ve tavuk kıyma örneklerinin %85'inde, köfte örneklerinin %83,3'de ve burger örneklerinin %40'ında değişik *Listeria* türlerinin varlığına rastlamışlardır. Örneklerde *L. innocua*'nın predominat tür olarak bulunduğunu, bunu *L. monocytogenes*

ve *L. grayi*'nin takip ettiğini gözlemlemişlerdir. Bu tür gıdaların az pişmiş olarak tüketilmesi halinde *Listeria* infeksiyonları yönünden potansiyel bir risk oluşturabileceğini belirtmişlerdir.

Ürküt[60] *L. monocytogenes* tayini için, indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemine dayalı elektrokimyasal genosensör tasarımı ve optimizasyonu araştırmış ve tasarlanan genosensörün *L. monocytogenes* amplikonlarını seçici olarak tespit edebildiğini, rutin analizlerde kullanılan PCR ve konvensiyonel yöntemlerle benzer sonuçlar ortaya koyduğunu tespit etmişlerdir.

Ye ve ark.[61] dondurulmuş domuz eti örneklerinde *L. monocytogenes*'in tespitinde RNA temelli real time RT-PCR'ın (Reverse-Transcriptase) duyarlı ve hızlı bir yöntem olduğunu gözlemlemişlerdir. Ancak bu metodun *L. monocytogenes*'i tam olarak tespiti için önerilemeyeceğini, sadece canlı hücrelerin varlığını ve onun yaklaşık kontaminasyon seviyesini belirleyebileceğini ifade etmişlerdir.

Kawasaki ve ark.[62] *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. ve *E. coli* O157:H7'nin tespitinde geleneksel kültür metotları ile multiplex PCR'ı kıyaslamışlar ve PCR temelli bu yöntemin her 3 etmeninde hızlı ve güvenilir tanılanmasında konvensiyonel metotlara göre daha başarılı olduğunu belirlemişlerdir.

Laciar ve ark.[63] yaptıkları çalışmalar sonucunda; ERIC-PCR tekniğinin bir tür içindeki strainlerin ayırt edilmesi ve *Listeria* türlerinin tanımlanması ve listeriosisin epidemiyolojisini açıklanmasında pratik, alternatif bir metot olduğunu belirtmişlerdir.

2.1. *Listeria monocytogenes*

2.1.1. Tarihçesi

Mikroorganizmaya ilk olarak 1891 yılında Fransa'da, 1893 yılında Almanya'da insan dokularında, 1911 yılında İsveç'te tavşanların nekrozlu karaciğerlerinde, 1917 ve 1920 yıllarında menenjitli bir hastanın omurilik sıvısında rastlanmıştır.[28, 40, 64]

Mikroorganizmanın sebep olduğu hastalık 1917'de Pirie tarafından Güney Afrika bozkırlarında ki kemiricilerde Tiger River adıyla tanımlanmıştır.[20] 1926'da Murray ve arkadaşları tavşanlardan ve Guinea domuzlarından etmeni izole etmiş ve Gram pozitif çomakçık şeklindeki bu bakteriyi, mononükleer lökositoza sebep olmasından dolayı ilk olarak *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırmıştır.[16, 40] Pirie 1927'de Güney Afrika'da yaşayan kemirgenlerden (gerbiller) bu bakteriyi izole etmiş ve cerrah Lord Lister'e atfen mikroorganizmanın ismini *Listerella hepatolytica,* 1929 yılında ise Nyfeldt *Bacterium monocytogenes hominis* olarak isimlendirmiştir.[16, 65] Murray ve Pirie aynı türden bakteriyle ilgilendiklerini fark edince verdikleri isimleri birleştirmişler ve *Listerella monocytogenes* ismini oluşturmuşlar.[28] 1937 yılında Gill *Listerella ovis* olarak adlandırmış fakat *Listerella* cins ismi protozoon isimlendirilmesinde kullanılmasından dolayı 1940'ta Pierre tarafından önerilen ve bakterinin bugünkü ismi olan *L. monocytogenes* verilmiştir.[64]

2.1.2. Taksonomisi

Listeria monocytogenes'in bilimsel sınıflandırması

Kingdom: *Bacteria*

Division: *Firmicutes*

Class: *Bacilli*

Order: *Bacillales*

Family: *Listeriaceae*

Genus: *Listeria*

Listeria cinsi ilk olarak Pirie tarafından (1940) tanımlanmış olup şu zamana kadar *Listeria* cinsine ait 15 tür bulunmuştur; *L. monocytogenes* (Pirie,1940), *L. grayi* (Errebo Larsen ve Seeliger, 1966), *L. innocua* (Seeliger, 1981), *L. welshimeri* (Rocourt ve Grimont, 1983), *L. seeligeri* (Rocourt ve Grimont, 1983), *L. ivanovii* (Seeliger ve

ark., 1984), *L. marthii* (Graves ve ark., 2010), *L. rocourtiae* (Leclerg ver ark., 2010), *L. fleischmanni* (Bertsch ve ark., 2013), *L. weihenstephanensis* (Lang Halter ve ark., 2013), *L. aquatica, L. floridensis, L. cornellensis, L. grandensis* ve *L. riparia*.[66]

L. monocytogenes Gram pozitif, sporsuz, kapsülsüz, aerobik ve fakültatif anaerobik, polar kamçı sayesinde 30 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda takla atarak ve ekseni etrafında dönerek hareket eden, birkaç hücreden oluşan kısa (0,5 μm çapında ve 1-2 μm uzunluğunda) zincirli kokobasil formda bir bakteridir.[67, 68] Psikrotrof bir bakteri olup optimum gelişme sıcaklığı 30-37 °C'dir Optimum a_w değeri 0,97 minimum a_w değeri 0,92'dir. pH: 7,0-7,3 arasında gelişebilmesine rağmen pH: 4,4- 9,6 arasında da canlılığını sürdürebilmektedir.[69] Halotolerant bir bakteri olduğundan yüksek konsantrasyonlardaki NaCl (%10-12) varlığında bile çoğalabilirler.[70]

Biyokimyasal olarak katalaz pozitif, oksidaz negatif, D-glukoz ve diğer şekerler den asit oluştururlar. Üre ve jelatini parçalayamazlar. *Listeria* türlerinden; *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. ivanovii* alyuvarları parçalayan bir hemolisin üretirler ve β-hemolitiktirler.[69, 71]

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın materyalini, Erzurum merkezinden toplanan 200 tavuk eti örneğinden izole edilen *L. monocytogenes* izolatları oluşturmaktadır.

3.1.1. Yararlanılan Cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır;

Buzdolabı: Vestel FT 280

Derin dondurucu: New Brunswick Scientific

Jel görüntüleme: Quantum Vilber Lourmart

Elektroforez cihazı: Sigma Aldrich

Hassas terazi: Denver Instrument

İnkübatör: Binder Redline RE 53

Magnetik karıştırıcı: Wisd Wisestir MSH-20A

Vorteks: Wisd Wisemix VM-10

Otoklav: HMC Hirayama

Otomatik pipetler: Eppendorf

PCR: Bio Rad C1000 thermal Cycler

pH metre: Mettler Toledo

Saf su: mp Minipure

Çeker ocak: Space Serries Fume Cupboard

Steril kabin: Class 2 Type Biosafety Cabinetis, WCS

Su banyosu: Memmert

Stomacher: Bag mixer

Stomacher torbası: Bag page

Çalkalayıcı: FL 3025

Mikrodalga: Beko MD1500

Santrifüj: Mikro 220 R Hettich Zentrifugen

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

Frasher broth: 49,5 g frasher broth (Merck, 1103980), 900 ml dH_2O içinde çözülmüş ve 225 ml olacak şekilde cam kavanozlara bölünüp, 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavlanarak, oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Bu süreçte, Frasher Broth Amonyum Demir (III) sitrat katkı (Merck, 10009200) ve Frasher *Listeria* Selective Suplement (Merck, 10009300) şişelerinin her birine 900 µl sdH_2O ilave edilerek çözülmüş ve her birinden 225 µl alınarak, soğutulmuş besiyerlerine ilave edilmiştir.

CHROMagar™ *Listeria* : 30,9 g CHROM-agar™ *Listeria* (LM852, RTA, Kocaeli), 576 ml dH_2O içinde çözülüp, 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavlanmıştır. Daha sonra 6 g CHROM-agar™ (LM851, RTA, Kocaeli) suplementi, 24 ml sdH_2O içinde çözülerek, 45-50 °C'ye kadar soğutulmuş katı besiyerine ilave edilmiş ve steril petrilere dökülmüştür.

Nutrient agar (NA): 28 g nutrient agar (Merck, 1054500500), 1 L dH2O içinde çözülüp, 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavlanmıştır. Besiyeri 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, steril petrilere dökülerek donmaya bırakılmıştır.

Nutrient broth+agar (yarı katı nutrient agar): 13 g nutrient broth (Merck 1.05443) ve 6 g agar (Difco 214883) 1 L dH_2O içinde çözülüp, 121°C'de 15 dk süreyle otoklavlanmıştır. Steril edilen besi yeri 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril deney tüplerine alınarak katılaşmaya bırakılmıştır.[72]

Kanlı agar: Hazır besiyerinden (Oxoid CM 331) 39 g tartılarak, 1 L dH_2O içinde çözündürülmüş, pH değeri 7,3 ±0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dk süreyle otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra üzerine

70 ml defibrine koyun kanı (%7) eklenmiştir Besiyeri steril petrilere dökülerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.[16]

Stok besiyeri: 0,65 g nutrient broth (Merck, 1054430500) karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra, son hacim dH_2O ile100 ml'ye tamamlanmıştır. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edilmiştir. Aseptik olarak, steril 2 ml'lik ependorf tüplerine 1,2 ml olacak şekilde bölünerek hazırlanmıştır[29]

Kristal violet: 2 g kristal violet, 20 ml %95'lik etil alkolde çözülmüş ve son hacim sdH_2O ile 100 ml'ye tamamlanarak, amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.[72]

%3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH, 100 ml sdH_2O içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.[72]

Lugol solüsyonu: 1 g iyot ve 2 g KCI tartılmış ve toplam hacim, sdH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.[29]

Safranin: 1 g safranin, 10 ml %95'lik etil alkolde çözülmüş ve son hacim sdH_2O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.[72]

%5'lik H_2O_2 çözeltisi: 17 ml %30'luk H_2O_2'in hacmi, sdH_2O ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.[72]

%10 CTAB-0,7 NaCl çözeltisi: 80 ml dH_2O içerisinde önce 4,09 g NaCl çözülmüş, NaCl tamamen eridikten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek homojenize olması sağlanmıştır. Toplam hacim 100 ml ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.[30]

%70'lik Etil Alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi, sdH_2O ile 100 ml'ye tamamlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) Çözeltisi: 1,21 g Tris, 1,75 g NaCl ve 3,72 g EDTA 200 ml dH_2O içerisinde çözülmüş, 1 N HCl ile pH

8'e olana kadar titre edilmiştir. Toplam hacim 200 ml' ye tamamlanarak, otoklavda steril edilip oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.[30]

5 M NaCl Çözeltisi: 29,22 g NaCl, 100 ml dH_2O içerisinde çözülerek otoklavda steril edilip, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.[30]

%10'luk SDS Çözeltisi: 10 g SDS, 100 ml sdH_2O içerisinde çözülerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.[30]

1XTE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8): 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA, 150 ml dH_2O içerisinde çözülmüş ve pH 8'e ayarlanmıştır. Son hacim 200 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.[30]

Fenol: kloroform: izoamilalkol çözeltisi (25:24:1): 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml fenol ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

Proteinaz K: 0,02 g proteinaz K, içerisinde 1 ml sdH_2O bulunan 1,5 ml'lik steril ependorf içerisinde iyice çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

Ethidium Bromür Çözeltisi: 100 ml dH_2O içerisinde 1 g Ethidium bromür (10 mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanarak iyice çözülmüş, ağzı kapaklı amber şişe içinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.[30]

5XTBE (Tris-Brote-EDTA)Tamponu (pH: 8): 54 g Tris, 27,5 g borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA 500 ml sdH_2O içerisinde çözüldükten sonra, karışımın pH'sı 8'e ayarlanmıştır. Ardından toplam hacim sdH_2O ile 1 L'ye tamamlanmıştır.[30]

5XTAE (Tris-Asetat-EDTA)Tamponu (pH: 8): 24,2 g Tris, 5,71 ml glasial asetik asit, 10 ml 0,5 M EDTA, 500 ml sdH_2O içerisinde homojenize edildikten sonra karışımın pH'sı 8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim sdH_2Oile 1 L'ye tamamlanmıştır.[30]

1XTBE Tamponu: 200 ml 5xTBE'nin hacmi sdH_2O ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.[30]

1XTAE Tamponu: 200 ml 5xTAE'nin hacmi sdH_2O ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.[30]

Bovine serum albumin (Sigma, B-4287): 1 ml sdH_2O içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanmış ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

Dimetil sülfoksit (DMSO): %100'lük DMSO (Sigma, D3418), 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

Gitschier tamponu: 200 ml için; 1 M $(NH_4)SO_4$'den 16,6 ml, 1 M Tris-HCl (pH 8,8) den 67 ml, 1 M $MgCl_2$'den 6,7 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,8)'nın 1:100 lük dilüsyonundan 1,3 ml ve 14,4 M β-mercapto-ethanol'un ticari solüsyonundan 2,08 ml alınarak hazırlamış olduğumuz solüsyonun hacmi yaklaşık 106,32 ml sdH_2O ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. 1,5 ml'lik ependorf tüplere paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

6Xyükleme tamponu: 100 ml için %100'lük gliserolden 40 ml alınıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırılmış ve hacmi 1XTBE ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.[30]

3.2. Metot

3.2.1. Tavuk Eti Örneklerinin Toplanması

Çalışmanın materyalini oluşturan 200 tavuk eti numunesi, Erzurum ilindeki kasap ve perakende marketlerden aseptik şartlarda temin edilip soğuk zincir altında laboratuvar ortamına getirilmiştir.

3.2.2. İzolasyon

Ön zenginleştirme amacıyla 25 g tavuk eti örneği, 225 ml Frasher broth ile stomacher torbasına aktarılıp, stomacher cihazında 2 dk süreyle homojenize edilmiş ve 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında numunelerden 100 µl alınarak, CHROM-agar^{TM} *Listeria* besiyerine aktarılmış ve yayma ekim yöntemiyle ekilerek 37 °C de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan beyaz zonlu mavi koloniler saflaştırmak amacıyla CHROM-agar^{TM} *Listeria* besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37 ^{o}C'de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan koloniler, özeyle 2 lop olacak şekilde toplanmış ve stok besiyerine aktarılarak -86 ^{o}C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Konvensiyonel Testler

Yapılan kültür ekimi sonrası beyaz zonlu mavi koloniler *L.monocytogenes* olarak değerlendirilmiş ve bu sonuç çeşitli konvensiyonel testlerle de desteklenmiştir.

Hücre morfolojisi: Saflaştırılan bakteriler 3 faz çizgi ekimle NA besiyerine ekildikten sonra 37 ^{o} C'de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlanarak, kristal violet ile basit boyama yapılmış, 1 dk beklemeden sonra preparat yıkanarak kurutulmuştur. Daha sonra mikroskopta immersiyon objektifi ile incelenmiştir.[30]

Gram boyama: Bu test, bakteri hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi gerçekleştirilmektedir

Yöntemde; temiz bir lam üzerinde, genç bakteri kültüründen hazırlanan preparat, kristal violet ile 1 dk süreyle boyanmıştır. Bu boya hücreye nüfus etmesiyle hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler mor renkli boyanır. 1 dk sürenin sonunda fazla boya hafif su akımı ile uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine lügol eklenip 1 dk süreyle

beklenmiştir. Lügol bu aşamada mordan olarak kullanılır. Lügol uygulanan preparat %96'lık etil alkol ile dikkatlice yıkanmıştır. Alkol ile yıkanma sonrası Gram (+) bakteriler peptidoglikan tabakalarının kalın olması nedeniyle kristal violet-lügol kompleksini bırakmaz ve mor renkli kalırken, Gram (-) bakterilerin dış membranları bozulur ve ince peptidoglikan tabakaları boyayı tutamadığı için renksizleşir. Yıkama işlemi sonrası preparat dH_2O'dan geçirilmiş ve safranin ile 20 s süreyle boyanmıştır. Boyama süresi sonunda hafif su akımı ile preparat yıkanarak kurutulmuş ve immersiyon objektifinde inceleme yapılmıştır. Mor renk Gram (+), pembe-kırmızı renk Gram (-) olarak değerlendirilir.[72]

Oksidaz testi: Elektron transferinde bakterilerin sitokrom c proteinine sahip olup olmadıklarını tespit etmek amacıyla bu test uygulanır. Solunum işleminde sitokrom c proteini görev almakta ve elektron transfer sisteminde maddeleri birinden diğerine indirgiyerek hücresel enerji (ATP) oluşumuna neden olmaktadır. Test için %1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren diskler kullanılmaktadır. Bu diskler 1 damla dH_2O ile doyurulmuş ve üzerine NA besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu eklenmiştir. Bakteride sitokrom c proteini varsa bu diskte kodlu olan substratıyla reaksiyona girerek mavimsi mor bir renk oluşumuna neden olur. Bu durum pozitif olarak değerlendirilmiştir. Renk değişiminin görülmemesi ise negatif olarak not edilmiştir.[29]

β-Hemoliz testi: CHROM-agar™ *Listeria* besiyerinden öze ile alınan şüpheli *Listeria* kolonileri, defibrine koyun kanı ile hazırlanan % 7'lik kanlı agarlara ekilerek 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda etrafında açık renkli berrak zon oluşan koloniler β-hemoliz pozitif olarak değerlendirilmiştir.[16]

Katalaz testi: Elde edilen izolatlarının, katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu test ile belirlenmiştir. Bu enzim, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan

hidrojen peroksit'i (H_2O_2) parçalayıp, H_2O ve O_2 gazına dönüştürür ve O_2 gazının oluşumu, kabarcıklar şeklinde gözlenebilir. Aerobik solunum yapan veya fakültatif olan mikroorganizmalarda bu enzim vardır. Bundan dolayı NA'da geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültüründen, bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerine bir damla %5'lik H_2O_2 damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir.[29]

Hareketlilik Testi: İzolatlar NB+ %0,6 agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla ekilerek bir gün inkübe edilmiştir. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim gözlemlenerek hareketlilik durumu incelenmiştir.[72]

3.2.4. VITEK 2 Kompakt ile Tanılama

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak *L.monocytogenes* ATCC 7644 kullanılmıştır. Öncelikle bakteri inokulumu hazırlamak için, saf bakteri izolatları nutrient agara ekilip 37 ^{o}C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan kültürler, üreticinin (bioMerieux) talimatlarına göre Gram pozitif kartları doldurma için kullanılan 0,45-0,6 McFarland standardına eşdeğer %0,45 tuz solüsyonu içine süspanse edilmiş, daha sonra kartlar daha fazla inkübasyon ve okuma için cihazın içine otomatik olarak yüklenmiş, kapatılmış ve saklanmıştır.

3.2.5. Genomik DNA İzolasyonu ve Çalışma Konsantrasyonun Belirlenmesi

Bakteri Hücresinden Genomik DNA'ların İzolasyonu

Adıgüzel 2008 tarafından modifiye edilen yönteme göre yapılmıştır.

1. DNA'sı izole edilecek olan bakteriler NA besiyerine ekilip 37 °C'de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

2. Steril edilmiş, ağzı kapaklı 1,5 ml'lik ependorflara 800 µl STE (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) tamponu konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri ilave edilmiştir.

3. Tüpler 2500 rpm'de vortekslenerek homojenize olmaları sağlanmıştır.

4. Vortekslenen tüpler 10.000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz (süpernatant) döküldü ve çökeleğin üzerine tekrar 800 µl STE eklenerek, 5 dk 10,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrarlanmıştır.

5. Santrifüj sonrası, süpernatant atılıp çökelek üzerine 400 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle dikkatlice alıp vermek suretiyle tamponun çökelek ile iyice karışması sağlanmıştır.

6. Tüpler 75 ^{o}C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmiştir.

7. Su banyosundan çıkartılan tüplere total hacmin 0,1 katı (40µl) %10'luk SDS (proteinler arasındaki disülfit bağları parçalar) ve 8 µl proteinaz K (proteinleri parçalar) ilave edilmiş ve 40 ^{o}C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.

8. İnkübasyon sonrası su banyosundan çıkarılan tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0,75-0,8 M olacak şekilde 5 M NaCl (total hacmin 1/5 kadar) ve oluşan toplam hacmin 0,1 katı kadar %10 CTAB/0,7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklenmiştir.

9. Tüpler 65 ^{o}C'ye ayarlı su banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir.

10. Eşit hacimde 25:24:1 fenol: kloroform: izoamilalkol (genellikle, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaştırılmasında kullanılır. Kloroform proteinleri denatüre ederek, sıvı ve organik fazlarına ayrışmasını sağlar. İzoamilalkol ise ekstraksiyon esnasında meydana gelebilecek köpürmeyi engeller) ilave edilen tüpler 15 dk oda sıcaklığında alt üst edilerek karıştırılmıştır.

11. Tüpler 16.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 0,1 hacim %10 CTAB/0,7 M NaCl (ortamda bulunabilecek polisakkarit kalıntılarını elemine etmede kullanılır), ilave edilmiştir.

12. 65 ^{o}C'ye ayarlı su banyosunda tüpler 15 dk bekletilmiştir.

13. Tüplere eşit hacimde 24:1 kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve tüpler 15 dk oda sıcaklığında, alt üst edilerek karıştırılmıştır.

14. Tüpler 16.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz yeni steril bir ependorfa alınmıştır.

15. Üzerine 0,6 hacim izopropanol (Sigma, I9516-4) eklenmiştir. Bu madde, DNA'yı bağlayarak, iplikçikler halinde çökmesini sağlar.

16. Tüpler -20 ^{o}C'de 1 gece süreyle bekletilmiştir.

17. Buzdolabından çıkarılan tüpler 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.

18. Üzerine -20 ^{o}C'de bekletilen %70'lik etanolden (DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılır) 500-600 µl eklenmiş ve 15.000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz yavaşça dökülmüştür.

19. Çökeleğin üzerine yeniden %70'lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş, üst faz dikkatlice dökülmüş ve tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.

20. Tamamen kuruduktan sonra, DNA'lar 40 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek, iyice çözünmesi sağlanmış ve üzerine 2-3 µl RNaz (Sigma, R4875) ilave edilmiştir.

21. Kullanılıncaya kadar -86 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

DNA Konsantrasyon Tespiti ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

DNA miktarı, 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans (A) ölçümü yapılarak belirlenirken, elde edilen genetiksel ürününün protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de ölçüm yapılarak tespit edilmiştir. Kuvartz küvet içerisine 747 µl TE çözeltisi konulmuştur. 260 nm' ye ayarlı spektrofotometrede A ölçülerek elde

edilen değer kör olarak kaydedilmiştir. Ardından küvete 3 µl DNA ilave edilmiştir. Karışımın homojen olması sağlandıktan sonra, 260 nm'de A ölçülmüştür. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın A değeri bulunmuştur. Yukarıda yapılan işlemlerin aynısı, 280 nm için de tekrarlanmıştır. A_{260} ve A_{280} değerine bakılarak A_{260}/A_{280}= 1-1,7 olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır.

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)= A_{260}x250 (Seyrelme Faktörü)x50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.[30]

DNA Çalışma Konsantrasyonunun Tespiti ve Solüsyonun Hazırlanışı (ng/µl)

İstenen konsantrasyon (75ng/µl)x İstenen Hacim (100µl)/Stok DNA Konsantrasyonu (µg/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Bulunan değer, stok DNA çözeltisinden alınması gereken miktarı vermiştir. Elde edilen değer 100 µl den çıkartılarak, hazırlanacak çalışma solüsyonu için alınması gereken TE çözeltisi miktarı bulunmuştur. Hazırlanan DNA çalışma solüsyonları kullanılıncaya kadar -86 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.[30]

Primer Çalışma Konsantrasyonu (µM/ml):

Primer konsantrasyonu (nmol)/0,1 (100µM/ml) formülü kullanılarak liyofilize halde bulunan primerleri çözmek amacıyla gerekli olan 1XTE buffer miktarı belirlenerek, 100 µM/ml'lik stok hazırlanmıştır. Bundan da C1xV1=C2xV2 formülü kullanılarak, 5µM/ml'lik primer çalışma solüsyonu hazırlanarak ve PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. [30]

3.2.6. Spesifik PCR

Her bir izolat için *hly*-1F ve *hly*-2R primerleri kullanılarak spesifik-PCR yöntemi ile gen profili belirlenmiştir. Kullanılan primerler ve PCR programı Tablo 3.1'de verilmiştir. 30µl reaksiyon karışım için; 1 µl genomic DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3),

50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, herbir dNTP'den 200 µM, primerlerden 0,4 µM, ve 2,5 U Taq DNA polymerase eklenmiş ve PCR gerçekleştirilmiştir.[73]

Spesifik PCR Elektroforezi: 1,25 g (%1'lik) agaroz üzerine, 125 ml 1XTBE tamponu ilave edilerek elde edilen karışım, mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50 ^oC'ye kadar soğutulan agaroz jele, 1-2 µl ethidium bromür ilave edilerek hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırılıp, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. 15-20 dk beklenerek jelin donması sağlanmıştır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılıp, içerisinde 1XTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma, D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 3 µl 6X yükleme tamponu, 17 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir (geri kalan 13 µl'lik PCR ürünleri kullanılıncaya kadar +4^oC'ye kaldırılmıştır). Elektroforez jel düzeneği 110 volta ayarlanarak örnekler 1,5 saat yürütülmüştür. Daha sonra oluşan DNA bantları jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.[30]

3.2.7. rep-PCR Yöntemiyle Bakterilerin Genomik Parmakizi Belirlenmesi

a) REP ve ERIC-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi: Uygun forward, reverse primerler kullanılarak REP ve ERIC-PCR ile bakterilerin gen profilleri belirlenmiştir. Kullanılan primerler ve PCR programı Tablo 3.1'de verilmiştir. 200 ml Gitschier buffer hazırlamak için; 1 M $(NH_4)_2SO_4$'den 16,6 ml, 1 M Tris-HCl (Ph 8,8)'den 67 ml, 1M $MgCl_2$'den 6,7 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,8)'nın 1:100'lük dilüsyonundan 1,3 ml ve 14,4 ml β-mercapto-ethanol'un ticari solüsyonundan 2,08 ml alınarak hazırlanmış solüsyonun hacmi yaklaşık 106 ml sdH_2O ile 200 ml'ye

tamamlanarak 1,5 ml lik ependorf tüplere paylaştırılarak kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

PCR'ı yapılacak her bir örnek için; 5 µl 5x Gitschier Buffer, 2,5 µl DMSO, 0,2 µl BSA, 1,25 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP-10mM), 2'şer µl primer (forward ve revers), 0,4 µl 5 unit/µl Tag DNA polimeraz ve 14,65 µl sdH_2O ile 28 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışıma son olarak 2 µl kalıp DNA (50 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Master mix ve kalıp DNA'yı içeren ependorf tüplere buharlaşmayı önlemek amacıyla 15 µl mineral yağ ilave edilmiştir.[37, 74, 75]

Her bir çalışma üç defa tekrarlanmıştır.

b) $(GTG)_5$ ve BOX-PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi: Uygun primerler kullanılarak $(GTG)_5$ ve BOX-PCR ile bakterilerin gen profilleri belirlenmiştir. Kullanılan primerler ve PCR programı Tablo 3.1'de verilmiştir. PCR'ı yapılacak her bir örnek için; 5 µl 5x Gitschier Buffer, 2,5 µl DMSO, 0,2 µl BSA, 1,25 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP-10mM), 2 µl primer, 0,4 µl 5 unit/µl Tag DNA polimeraz ve 16,65 µl sdH_2O ile 28 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışıma son olarak 2 µl kalıp DNA (50 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Master mix ve kalıp DNA'yı içeren ependorf tüplere buharlaşmayı önlemek amacıyla 15 µl mineral yağ ilave edilmiştir.[37, 74, 75]

Her bir çalışma üç defa tekrarlanmıştır.

rep-PCR Ürünlerinin Elektroforezi: 1,25 g (%1'lik) agaroz üzerine 125 ml 1XTAE tamponu ilave edilerek elde edilen karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50 ^{o}C'ye kadar soğutulan agaroz jele, 1-2 µl ethidium bromür ilave edilerek hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırılıp, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. 15-20 dk

beklenerek jelin donması sağlanmıştır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılıp, içerisinde 1XTAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 3 µl 6X yükleme tamponu, 17 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir (geri kalan 13 µl'lik PCR ürünleri kullanılıncaya kadar +4^{o}C'ye kaldırılmıştır). Elektroforez jel düzeneği, 60 volta ayarlanarak örnekler 3 saat yürütülmüştür. Daha sonra oluşan DNA bantları jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.[30]

3.2.8. Bakteri İzolatlarının 16S rRNA Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu

Test izolatlarından saflaştırılmış olan genomik DNA'lardan bakteri sistematiği açısından önemli olan 16S rRNA bölgesi evrensel primerler (forward ve revers) kullanılarak in vitro koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır. Kullanılan primerler ve PCR programı Tablo 3.1'de verilmiştir.

PCR'ı yapılacak her bir örnek için 3 µl 10x PCR tampon (100 mM Tris- HCl, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, %0,01 jelatin pH: 8,3), 0,6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP-10mM), 3 µl primerler, 1,2 µl DMSO, 0,6 µl $MgCl_2$ (50 µM), 0,3 µM/ml Tag DNA polimeraz ve 15,3 µl sdH_2O ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmış ve karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Master mix ve DNA içeren ependorf tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek amacıyla 15 µl mineral yağ ilave edilmiştir.[31, 76]

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 1,25 g (%1'lik) agaroz üzerine, 125 ml 1XTBE tamponu ilave edilerek elde edilen karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50 ^{o}C'ye kadar soğutulan agaroz jele, 1-2 µl

ethidium bromür ilave edilerek hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırılıp, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. 15-20 dk beklenerek jelin donması sağlanmıştır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılıp, içerisinde 1XTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma, D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 3 µl 6X yükleme tamponu, 17 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir (geri kalan 13 µl'lik PCR ürünleri kullanılıncaya kadar +4^{o}C'ye kaldırılmıştır). Elektroforez jel düzeneği 110 volta ayarlanarak örnekler 1,5 saat yürütülmüştür. Daha sonra oluşan DNA bantları jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.[30]

3.2.9. 16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması, Sekans Analizi ve Gen Bankasındaki Verilerle Karşılaştırması

16S rRNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın önerdiği uygun konsantrasyonlar ve şartlarda klonlanmıştır. Daha sonra klonlama sonucunda pozitif sonuç veren kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu plazmitlerden istenilen parçayı taşıyanlar belirlenerek klonların baz dizi analizi, Hollanda'da bulunan Macrogen firmasına gönderilerek yaptırılmıştır. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiş ve gen bankası kabul numaraları alınmıştır.[37]

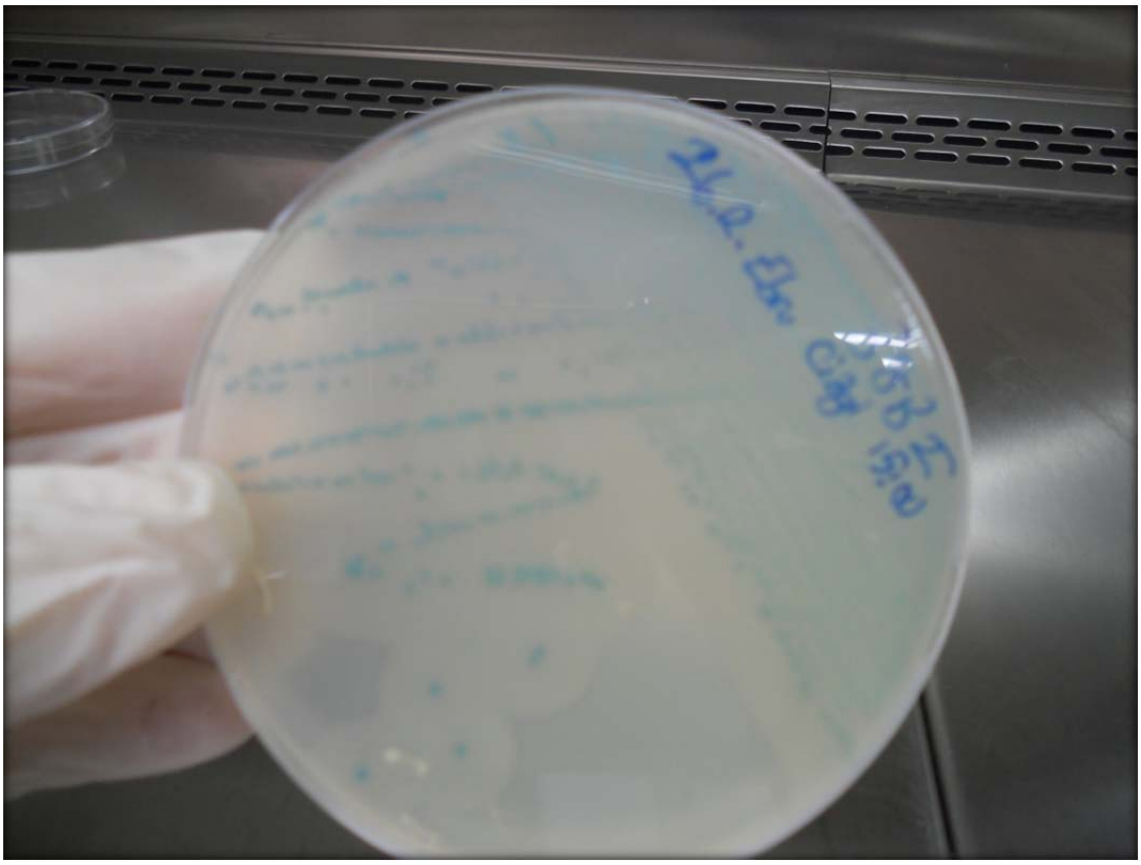
Tablo 3.1. Primerler ve PCR programı

	Primer çiftlerinin baz dizilimleri	**PCR döngüsü**
Spesifik-PCR ***L. monocytogenes***	hly-1F: AGC ACA ACA AAC TGA AGC AAA GGA hly-2R: ATT GTG ATT CAC TGT AAG CCA TTT CGT CAT	95 °C'de 5 dk, 35 döngü (94 °C'de 30sn, 58 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn), 72 °C'de 7 dk.
REP PCR	REP 1R: IIICGI CGI CAT CIG GGC REP 2: ICG ICT TAT CIG GCC TAC	95 °C'de 7 dk, 35 döngü (94 °C'de 1 dk, 40 °C'de 1 dk, 65 °C'de 8 dk), 65 °C'de 15 dk.
ERIC PCR	ERIC 1R: CAC TTA GGG GTC CTC GAA TGT A ERIC 2: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	95 °C'de 7 dk, 35 döngü (94 °C'de 1 dk, 52 °C'de 1 dk, 65 °C'de 8 dk), 65 °C'de 15 dk.
BOX PCR	BOX A1R: CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	95 °C'de 7 dk, 35 döngü (94 °C'de 1 dk, 53 °C'de 1 dk, 65 °C'de 8 dk), 65 °C'de 15 dk.
$(GTG)_5$ PCR	GTG GTG GTG GTG GTG	94 °C'de 7 dk, 30 döngü (94 °C'de 30 sn, 45 °C'de 1 dk, 65 °C'de 8 dk), 65 °C'de 15 dk.
16S rRNA	UNI16S-L (5'-ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA) UNI16S-R (5'-ATG GTA CCG TGT GAC GGG GGG TGT GTA)	95 °C'de 2 dk, 36 döngü (94 °C'de 1 dk, 54°C'de 1 dk, 72°C'de 2 dk), 72 °C'de 5dk.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Sonuçları

Bu çalışmada, Erzurum merkezde bulunan kasap ve perakende marketlerden 200 adet tavuk eti örneği alınarak, steril koşullar altında laboratuvara getirilmiştir Ön zenginleştirme işlemi yapıldıktan sonra, CHROMagar™ *Listeria* besiyerine yayma ekim yöntemi kullanılarak ekilmiş ve 37 °C'de 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra beyaz hale oluşturan mavi koloniler seçilerek *Listeria monocytogenes* (Şekil: 4.1) şüphesiyle kültüre edilerek kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir. Bir adet zon oluşturmayan ve *L. innocua* olduğu düşünülen bakteri ise negatif kontrol olarak kullanılmak üzere stoğa alınmıştır. Bu çalışma sonucunda toplam 11 örnekten *L. monocytogenes* izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Saflaştırılmış *Listeria monocytogenes* kültürü

4.2. Konvensiyonel Test Sonuçları

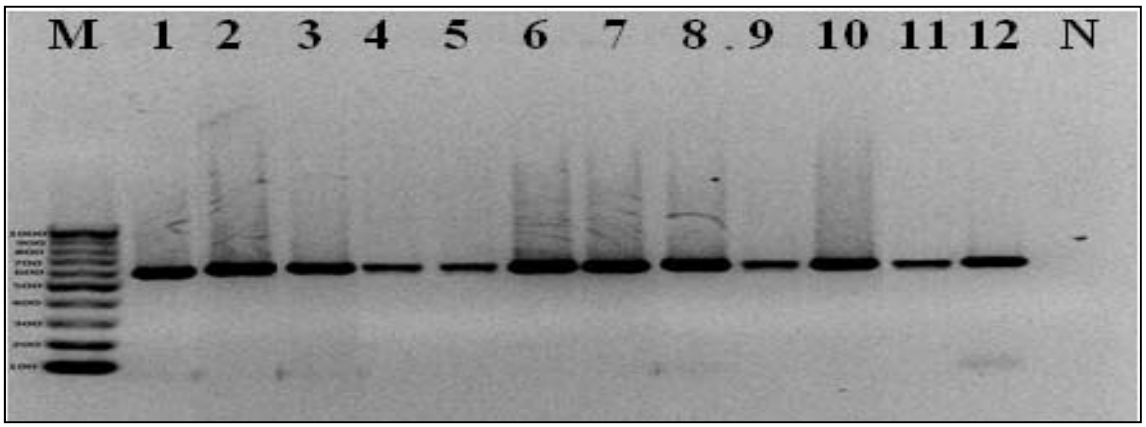
CHROMagar™ *Listeria* besiyerinden izole ettiğimiz *L. monocytogenes* izolatlarının konvansiyonel test sonuçlarına göre; 11 izolatın tamamının, kısa çubuk (kokobasil) şeklinde hücre ve mavi menekşe renkli koloni morfolojisine sahip, Gram pozitif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, β-hemolitik ve hareketli oldukları tespit edilmiştir.

4.3. VITEK 2 Kompakt Sonuçları

Konvensiyonel test sonuçlarını desteklemek için bir karbonhidrat profilleme yöntemi olan VITEK metodu kullanılmıştır. VITEK 2 kompakt sistemi kullanılarak yapılan bu analiz sonucunda pozitif kontrol (*L. monocytogenes* ATCC 7644) dahil olmak üzere tüm strainlerin %99 oranında *L. monocytogenes*'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir

4.4. Spesifik PCR Sonuçları

Test edilen *L. monocytogenes* izolatlarının ve pozitif kontrolün (*L. monocytogenes* ATCC 7644) spesifik PCR sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre tüm izolatların 596 bç'lik tek bant verdiği tespit edilmiştir



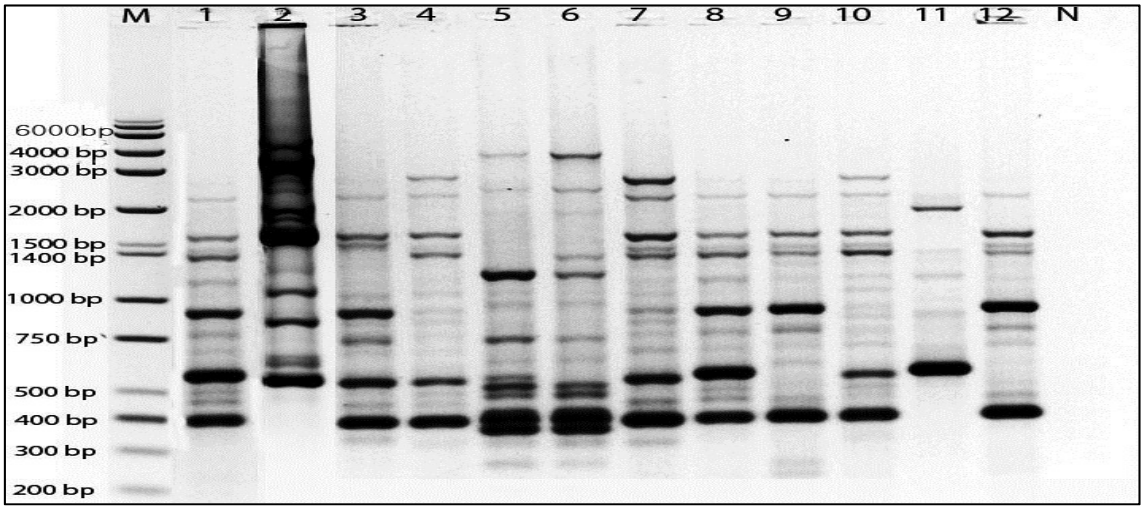
Şekil 4.2. Spesifik-PCR profil *hly* 1F ve *hly* 2R primerleri ile oluşturuldu. 1) L1; 2) L2; 3) L3; 4) L4; 5) L5; 6) L6; 7) L7; 8) L8; 9) L9; 10) L10; 11) L11; 12) *L. monocytogenes* ATCC 7644; 13) N; Negatif kontrol; M) Moleküler Marker (1kb).

4.5. rep-PCR Sonuçları

4.5.1. ERIC-PCR

Test edilen *L. monocytogenes* izolatlarının ve pozitif kontrolün (*L. monocytogenes* ATCC 7644) ERIC PCR sonucu Şekil 4.3'de verilmiştir. L1; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 3 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 3 bant, 400-500 bç arasında 2 bant vermiştir. L2; 1500 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L3; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1400-2000 bç arasında 2 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 500-750 bç arasında 3 bant, 300-500 bç arasında 3 bant vermiştir. L4 ve L10; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1400-2000 bç arasında 2 bant, 500-1400 bç arasında 6 bant, 500 bç'de 1 bant, 400-500 bç arasında 3 bant vermiştir. L5; 4000 bç'de 1 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 3 bant, 500 bç'de 1 bant, 200-500 bç arasında 4 bant vermiştir. L6; 4000 bç'de 1 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1000-1500 bç arasında 3 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant, 500 bç'de 1 bant, 300-500 bç arasında 4 bant vermiştir. L7; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1500 bç'de 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 3 bant, 750-1000 bç arasında 3 bant, 500-750 bç arasında 2 bant, 400-500 bç arasında 1 bant, 400 bç'de 1 bant, 300-400 bç arasında 1 bant vermiştir. L8; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1500 bç'de 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 2 bant, 500 bç'de 1 bant, 400-500 bç arasında 1 bant, 400 bç'de 1 bant vermiştir. L9; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1500 bç'de 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç

arasında 2 bant, 500 bç'de 1 bant, 400-500 bç arasında 1 bant, 400 bç'de 1 bant, 200-300 bç arasında 2 bant vermiştir. L11; 1500-3000 bç arasında 2bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arsında 1 bant, 750-1000 bç arsında 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L12; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1500 bç'de 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 500 bç'de 1bant, 400-500 bç arasında 1 bant vermiştir.

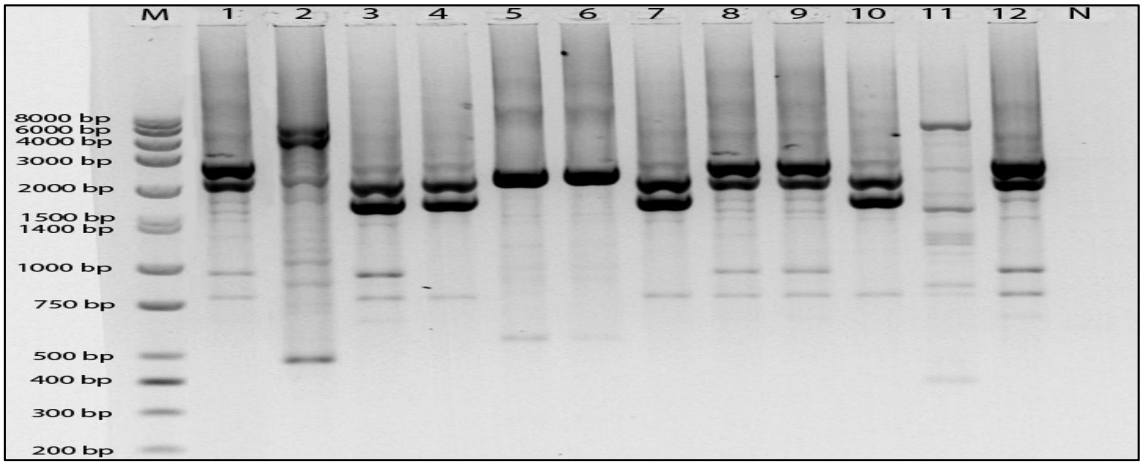


Şekil 4.3. ERIC-PCR profil ERIC 1R ve ERIC 2 primerleri ile oluşturuldu. 1) L1; 2) L2; 3) L3; 4) L4; 5) L5; 6) L6; 7) L7; 8) L8; 9) L9; 10) L10; 11) L11; 12) *L. monocytogenes* ATCC 7644; 13) N; Negatif kontrol; M) Moleküler Marker (10kb).

4.5.2. REP-PCR

Test edilen *L. monocytogenes* izolatlarının ve pozitif kontrolün (*L. monocytogenes* ATCC 7644) REP-PCR sonucu Şekil 4.4'de verilmiştir. L1 ve L8; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 3 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant vermiştir. L2; 4000-6000 bç arasında 2 bant, 1500-3000 bç arasında 2 bant, 1000-1500 bç arasında 5 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 750-500 bç arasında 3 bant, 400-500 bç arasında 1 bant vermiştir. L3; 2000 bç'de 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1400-1500 bç arasında 1 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir. L4; 2000 bç'de 1

bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1400-1500 bç arasında 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant vermiştir. L5 ve L6; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir. L7 ve L10; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant vermiştir. L9; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 3 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant vermiştir. L11; 6000-8000 bç arasında 1 bant, 3000-4000 bç arasında 1 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 3 bant, 1000-1400 bç arasında 5 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 400-500 bç arasında 1 bant vermiştir. L12; 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir.

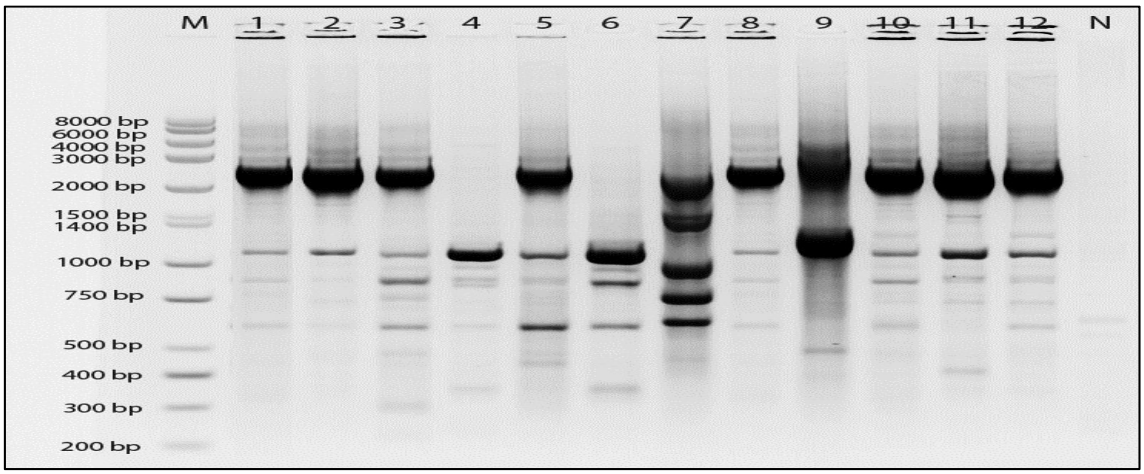


Şekil 4.4. REP-PCR profili REP1R ve REP 2 primerleri ile oluşturuldu. 1) L1; 2) L2; 3) L3; 4) L4; 5) L5; 6) L6; 7) L7; 8) L8; 9) L9; 10) L10; 11) L11; 12) *L. monocytogenes* ATCC 7644; 13) N; Negatif kontrol; M) Moleküler Marker (10kb).

4.5.3. BOX-PCR

Test edilen *L. monocytogenes* izolatlarının ve pozitif kontrolün (*L. monocytogenes* ATCC 7644) BOX-PCR sonucu Şekil 4.5'de verilmiştir. L1 ve L2; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir. L3; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 1000 bç'de

1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 400-500 bç arasında 1 bant, 300 bç'de 1 bant vermiştir. L4; 1000-1400 bç arasında 1 bant, 750-1000 bç arasında 3 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 300-400 bç arasında 1 bant vermiştir. L5; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 750-1000 bç arasıda 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 400-500 bç arasında 2 bant vermiştir. L6; 1000-1400 bç arasında 1 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 300-400 bç arasında 1 bant vermiştir. L7; 2000 bç'de 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir. L8; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir. L9; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 400-500 bç arasında 1 bant vermiştir. L10; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 3 bant, 1400-1000 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L11; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant 750-1000 bç arasında 3 bant, 400-500 bç arasında 1 bant vermiştir. L12; 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir.

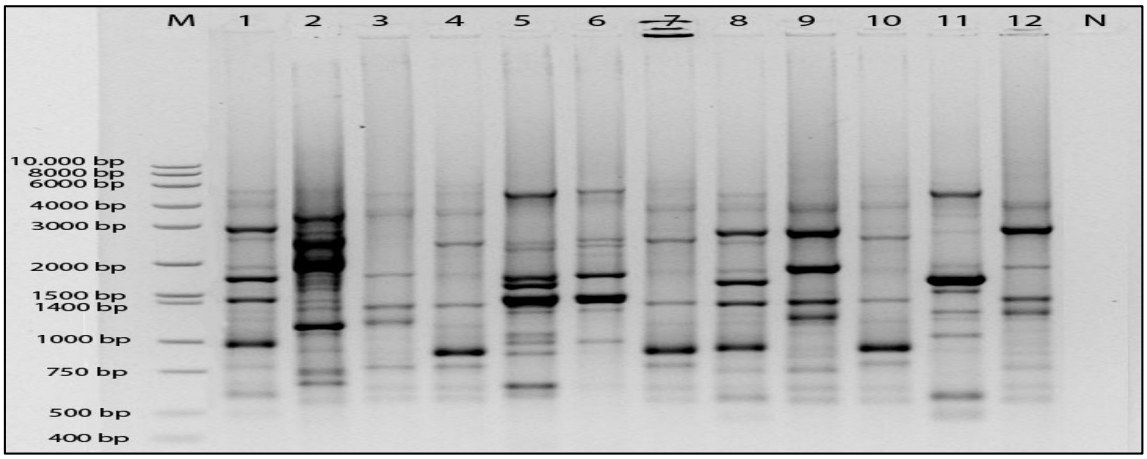


Şekil 4.5. BOX-PCR profili BOX A1R primeri ile oluşturuldu. 1) L1; 2) L2; 3) L3; 4) L4; 5) L5; 6) L6; 7) L7; 8) L8; 9) L9; 10) L10; 11) L11; 12) *L. monocytogenes* ATCC 7644; 13) N; Negatif kontrol; M) Moleküler Marker (10kb).

4.5.4. $(GTG)_5$-PCR

Test edilen *L. monocytogenes* izolatlarının ve pozitif kontrolün (*L. monocytogenes* ATCC 7644) $(GTG)_5$-PCR sonucu Şekil 4.6'de verilmiştir. L1; 4000-6000 bç arasında 1 bant, 4000 bç'de 1 bant, 3000 bç'de 1 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 2 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç'de 2 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant, 500 bç'de 1 bant vermiştir. L2; 4000-6000 bç arasında 2 bant, 3000-4000 bç arasında 1 bant, 3000 bç'de 1 bant, 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 5 bant, 1000-1400 bç arasında 4 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L3; 4000-6000 bç arasında 1 bant, 3000-4000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 1bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L4, L7 ve L10; 6000 bç'de 1 bant, 4000-6000 bç arasında 1 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 750-1000 bç arasında 2 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L5; 4000-6000 bç arasında 1 bant, 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 2 bant, 1400-1500 bç arasında 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 1 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L6; 4000-6000 bç arasında 2 bant, 2000-3000 bç arasında 3 bant, 1500-2000 bç arasında 1bant, 1400-1500 bç arasında 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant vermiştir. L8; 4000-6000 bç arasında 1 bant, 4000 bç'de 1 bant, 3000-4000 bç arasında 1 bant, 2000-3000 bç arasında 2 bant, 1500-2000 bç arasında 2 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 500 bç'de 1 bant vermiştir. L9 ve L12; 3000-4000 bç arasında 2 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 1 bant, 1400 bç'de 1 bant, 1000-1400 bç arasında 2 bant, 1000 bç'de 1 bant, 750-1000 bç

arasında 1 bant, 750 bç'de 1 bant, 500-750 bç arasında 2 bant vermiştir. L11; 4000-6000 bç arasında 2 bant, 4000 bç'de 1 bant, 3000-4000 bç arasında 1 bant, 2000-3000 bç arasında 1 bant, 1500-2000 bç arasında 3 bant, 1000-1400 bç arasında 3 bant, 750-1000 bç arasında 1 bant, 500-750 bç arasında 1 bant, 500 bç'de 1 bant, 400-500 bç arasında 1 bant vermiştir.

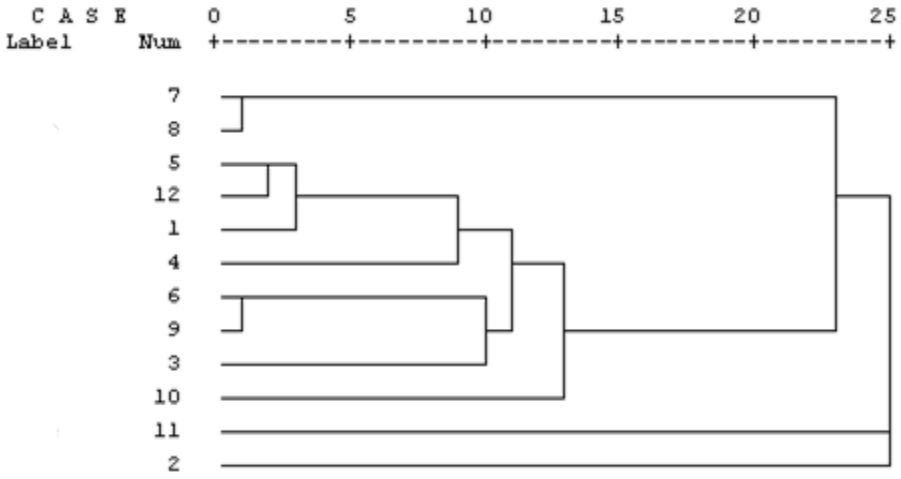


Şekil 4.6. $(GTG)_5$ PCR profil $(GTG)_5$ primeri ile oluşturuldu. 1) L1; 2) L2; 3) L3; 4) L4; 5) L5; 6) L6; 7) L7; 8) L8; 9) L9; 10) L10; 11) L11; 12) *L. monocytogenes* ATCC 7644; 13) N; Negatif kontrol; M) Moleküler Marker (10kb).

Özetleyecek olursak yapılan ERIC-PCR genomik parmakizi analiz sonucunda, tüm izolatlarında yaklaşık olarak 750 ve 2100 bç büyüklüğünde 2, $(GTG)_5$-, REP- ve BOX-PCR'ın ise sırasıyla 3000 bç, 2000 bç ve 1100 bç büyüklüğünde 1 ortak bandın bulunduğu gözlemlenmiştir.

4.6. ERIC-PCR Sonucuna Göre Cluster Analizi

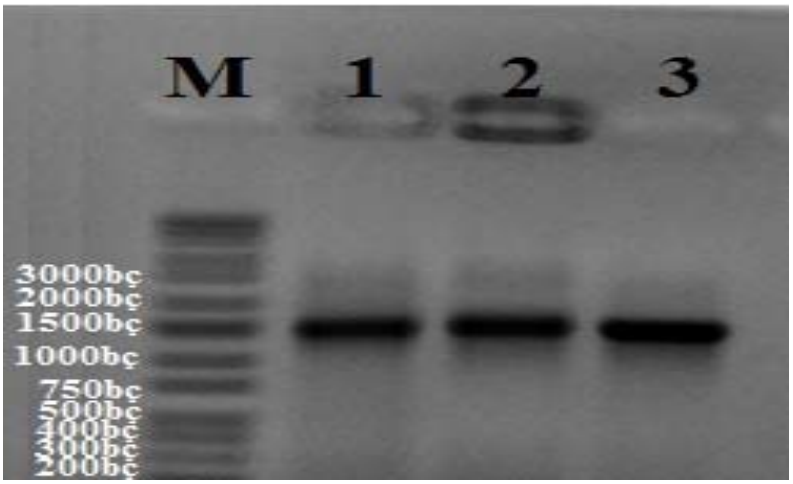
rep-PCR analiz sonucunda en fazla polimorfik bant görülen ERIC-PCR verileri dikkate alınarak yapılan cluster analizi (SPSS 16,0) sonucunda 12 bakteriyal strainin 3 ana cluster'a ayrıldığı, birinci clusterda, L1, L3-L10 ile *L. monocytogenes* ATCC 7644 standart strainin bulunduğu tespit edilmiştir. 2. Ana clusterda; L11 ve 3. clusterda ise L2 strainlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. ERIC-PCR Cluster Analizi. 1) L1; 2) L2; 3) L3; 4) L4; 5) L5; 6) L6; 7) L7; 8) L8; 9) L9; 10) L10; 11) L11; 12) *L. monocytogenes* ATCC 7644

4.7. 16S rRNA PCR Sonucu

Test edilen L2, L5 ve L11 strainlerinin 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiş ve izolatların yaklaşık olarak 1450 bç uzunluğunda tek bant verdiği Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 16S rRNA PCR sonuçları: 1) L2, 2) L5, 3) L11, M: Moleküler Marker (1 kb)

4.8. İzolatların 16S rRNA Sekans Analiz Sonuçları

ERIC-PCR cluster analiz verileri dikkate alınarak seçilen 3 adet bakterinin (L2, L5 ve L11) 1114-1430 nükleotit içerdiği ve bu dizilerin Gen Bankasındaki mevcut

verilerle karşılaştırıldığında ise %99 oranında *L. monocytogenes*'e benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. L2, L5 ve L11 strainlerine ait Genbank'tan alınan kabul numaraları sırasıyla KF956741, KF956740 ve KF956739 olup, bu izolatlara ait 16S rRNA gen bölgelerinin baz dizileri Ek 2-4'de verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Et ve et ürünleri insan vücudu için gerekli vitamin, mineral, aminoasit, yağ ve karbonhidratları içerdiğinden insan beslenmesi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda kaynak materyali olarak kullandığımız tavuk etinin, gerek protein, mineral ve vitamin açısından zengin, gerekse de kırmızı ete göre daha az yağ içermesi, daha ekonomik olmasından dolayı tüm dünya da giderek tüketimi artmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyolojik kontaminasyona açık olan bu et ile beslenen toplumlarda, ciddi sağlık problemleri gözlemlenebilmektedir.[10, 14]

Çalışmamızda test edilen 200 adet tavuk örneğinin %5.5'de *Listeria monocytogenes* varlığına rastlanmıştır. Güven ve Patır[77] yaptıkları benzer bir çalışmada tavuk etindeki *L. monocytogenes* kontaminasyonunu %38.8 civarında olduğunu belirlemişlerdir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında; elde ettiğimiz verilere bakarak o günden günümüze kadar geçen süreçte ülkemizde genel hijyen standartlarında önemli bir iyileşmenin olduğu gözlemlenmektedir.

Bu tezde tavuk eti örneklerinde *L. monocytogenes* varlığı konvensiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Awaisheh ve ark.[78] yaptıkları bir çalışmada, Ürdün ve çevresindeki hazır gıda ürünlerinde *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* kontaminasyon seviyesini belirlemeye çalışmışlar. Bu amaçla kromojenik besiyeri ve *hlyA* gen bölgesini hedef alan spesifik PCR yöntemini kullanmışlardır. Sonuçta petri sisteminde *L. monocytogenes* olarak tanılanan izolatların tamamının, PCR çalışmasında da aynı sonucu verdiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da petri denemeleriyle spesifik PCR analiz verileri arasında %100'lük bir uyum bulunmuş ve literatür verisiyle paralellik tespit edilmiştir.

Konvensiyonel testleri takiben yapılan VITEK analizi sonucunda pozitif kontrolde dahil olmak üzere tüm test bakterilerinin %98 gibi yüksek bir oranda *L.*

monocytogenes'e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Odumero ve ark.[79] ve Jin ve ark.[80] yaptıkları çalışma sonucunda, *Listeria* spp. izolatlarının identifikasyonunda VITEK 2 kompakt sisteminin oldukça yüksek bir hassasiyete sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç yapılan çalışmadaki verilerle uyuşmaktadır.

Zhang ve ark.[73] yaptıkları bir çalışmada, önemli bir gıda patojeni olan *L. monocytogenes*'in tanılanmasında, özel olarak dizayn edilmiş olan *hly*-1F ve *hly*-2R primer setlerinin hemolysin (*hly*) gen bölgesinin tespitinde oldukça başarılı olduğu ve tüm test strainlerinde 596 bç büyüklüğünde tek bir bantın gözlemlendiğini ifade etmiştir. Bu sonuç yapılan çalışmadaki verilerle uyuşmaktadır.

Tavuk örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes* strainlerinin tanılanmasında gelişmiş bir identifikasyon metodu olan rep-PCR genomik parmak izi analiz yöntemi kullanılmıştır Bu denemeler sonucunda, ERIC-PCR tekniğinin test izolatlarının moleküler karakterizasyonunda en uygun metot olduğu saptanmıştır. Farklı bilim insanları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda *L. monocytogenes* izolatlarının ayrımında ERIC-PCR genomik parmakizi analiz protokolünün bizim verilerimizle benzer bir şekilde oldukça yüksek bir hassasiyete sahip olduğu gözlemlenmiştir.[21, 57, 81] Genetiksel olarak birbirleriyle çok yakın olan mikroorganizmaların ayrımında rep-PCR tekniğinin oldukça başarılı olduğunu gösterir çok sayıda çalışma bulunmaktadır.[19, 32, 38, 45, 57, 63, 82, 83] Genom içerisinde tekrarlı bu elementlerin analizi tür, alt tür hatta strain seviyesine kadar bakterilerin identifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.[30]

Wojciech ve ark.[21] Polonya'da ki çiflik hayvanlarından ve gıdalardan izole ettikleri 26 *L. monocytogenes* straininin genotipik karakterizasyonunda, ITS-, REP-, ERIC-PCR ve PFGE metotlarını kullanmışlardır. Yaptıkları bu analizler sonucunda test izolatları arasındaki genetiksel polimorfizmin ortaya konulmasında ERIC-PCR yönteminin REP-PCR'a göre daha etkili olduğunu bulmuşlardır.

Harvey ve ark.[57] gıda örneklerinden izole ettikleri *L. monocytogenes* starinlerinin tiplendirilmesinde MEE (multilokus enzim elektroforezi), PFGE ve REP-PCR metotlarını kullanmışlardır. Bu analizler sonucunda; rep-PCR tekniğinin PFGE ile birlikte *L. monocytogenes* tiplendirilmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini belirlemişlerdir. Nucera ve ark.[81] tarafından yapılan başka bir çalışmada; *L. monocytogenes* izolatlarının tiplendirilmesinde, rep-PCR'ın oldukça etkili ve hızlı olduğunu ifade etmişlerdir. Laciar ve ark.[63] yaptıkları bir çalışmada ise; insan, hayvan ve gıda kökenli örneklerden izole ettikleri *Listeria* spp. izolatlarının identifikasyonunda ERIC-PCR yönteminin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Adıgüzel ve ark.[19] rep-PCR metodunun *Salmonella typhimurium* strainler arasındaki farklılıkları ortaya koymada mükemmel bir genotipik araç olduğunu tespit etmişlerdir.

16S rRNA dizi analiz yönteminin, bakterilerin tür seviyesinde tanılanmasında oldukça yaygın bir şekilde kullanıldığı ve kabul gördüğü bilinmektedir. Bu gen bölgesi yüksek oranda korunmuş, çoklu kopyalar halinde bulunan zorunlu genlerden oluşmaktadır. Universal primerler kullanılarak 500-1500 bç büyüklüğünde olan bu bölge çoğaltılmakta ve nükleotit dizisi belirlenmektedir.[84] Farklı bilim insanları tarafından bakterilerin identifikasyonunda, mutasyonlara kapalı olan 16S rRNA bölgesi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.[37, 82, 84-86]

Çalışmamızdaki ERIC-PCR verilerine göre şekillendirilen ağaçta, farklı clusterda yer alan 3 örnek rastgele olarak seçilmiş ve ileri bir tanı yöntemi olan 16S rRNA dizi analizne tabi tutulmuştur. Sonuçta 3 izolatın tamamının %99 ve daha yüksek bir oranda *L. monocytogenes'*e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Chen ve ark.[87, 88] bizim verilerimize paralel bir şekilde, *L. monocytogenes* strainlerinin 16S rRNA dizi analiz benzerlik oranlarının %98 den daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan literatür taraması sonucunda, *L. monocytogenes* strainlerinin genotipik karakterizasyonunda tüm rep-PCR (REP-,ERIC-, BOX- ve $(GTG)_5$ -PCR) çeşitlerinin bir arada kullanıldığı hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan bu çalışma bir ilktir. Yapılan analizler sonucunda önemli bir gıda patojeni olan *L. monocytogens* strainlerinin genotipik karakterizasyonunda ERIC-PCR yönteminin, kullanılan diğer rep-PCR çeşitlerine göre oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar, ERIC-PCR genotipik parmak izi analiz metodunun, organizmaları tür seviyesinde karakterize etmede oldukça hızlı, kolay ve tekararlanabilir olduğunu göstermiştir. Bu veriler literatür verileriyle benzerlik göstermektedir.[21, 63, 87]

Kontamine olmamış tavuk eti üretimi için, özellikle kesim de, veteriner hekim kontrolünden geçmiş kanatlıların kullanılması, kesim esnasında genel hijyen koşullarına sahip ve makine techizat açısından yeterli olan mezbahalarda tüm işlemlerin gerçekleştirilmesi, paketleme, dağıtım ve pazarlama sürecin de soğuk zincir kullanılması, bu işlemlerde görev yapan personelin eğitilmesi ve gerekli tüm denetlemelerin Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından eksiksiz bir şekilde yapılması büyük önem arz etmektedir.

KAYNAKÇA

1. Songur C. Gıda Güvenliği Yönetim Sisteminin Kalite Maliyetlerine Olan Etkisi. Sosyal Bilimler Enstitüsü, İşletme Anabilim Dalı. Yüsek Lisans tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, 2009.
2. Doksanüçoglu Ç. Ankara'da Şatışa Sunulan Tavuk Eti Örneklerinden Arcobacter Türlerinin İzolasyonu ve Bu İzolatların Degişik Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2006.
3. Güven E. Yalova İlinde Yaşayan Farklı Eğitim ve Gelir Düzeyine Sahip Fertlerin Beslenme Alışkanlıkları ve Gıda Güvenliği Bilgisinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Tekirdağ: Namık Kemal Üniversitesi, 2010.
4. Bıyıklı AE. Hastane Mutfaklarında Çalışan Aşçıların Gıda Güvenliği Bilgi ve Uygulamalarının Belirlenmesi: Konya İl Merkezi Örneği. Sosyal Bilimler Enstitüsü, Çocuk Gelişimi ve Ev Yönetimi Eğitimi Anabilim Dalı, Beslenme Eğitimi Bilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2011.
5. Özdemir Z. Kadınların Gıda Güvenliği Konusundaki Bilgi, Tutum ve Davranışları. Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Aile Ekonomisi Beslenme Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2009.
6. Kılıç D. Tüketicilerin Gıda Güvenliği ile İlgili Bilgi-Tutum ve Davranışları. Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Aile Ekonomisi ve Beslenme Eğitimi Bilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2008.
7. Genç S. Taze Tüketime Sunulan Bazı Balık Türlerinde Listeria monocytogenes, Vibrio parahymoliticus, Toplam Mezofil Bakteri ve Fekal Koliform Bakteri Sayılarının Belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi

Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2006.

8. Topcu S. Ankara'da Satışa Sunulan Döner Kebap Çeşitlerinden Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Aeromonas hydrophila İzolasyonu ve Çeşitli Antibiyotiklere Dirençlilikleri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2006.
9. Karakaş G. Et ve Et Ürünleri Tüketiminde Tüketici Kararlarını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, 2010.
10. Başbayraktar V. Soğutma ve Radurizasyonun Tavuk Eti Kalitesine Etkisinin DNA Comet Assay Yöntemi ile Belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.Doktora tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2009.
11. Telli R. Afyon'da Tüketime Sunulan Tavuk Karkas ve Tavuk Eti Örneklerinde Salmonella spp. Varlığının Klasik Kültür Tekniği ile Saptanması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2006.
12. Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G. A nested PCR method to detect Listeria monocytogenes in artificially contaminated blood specimens. *Research In Microbiology*, 1997, 148: 485-90.
13. Ertaş N, Doğruer Y. Prevalance of Arcobacter species in ground meat from cattle and sheep using multiplex PCR techniques. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2007, 23: 95-100.
14. Taşkın A. Gaziantep İli Nizip İlçesinde Tüketicilerin Tavuk Eti ve Yumurta Tüketim Düzeyleri ile Tüketim Alışkanlıklarının İncelenmesi Üzerine Bir

Araştırma. Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, 2003.

15. Çolak F, Dığrak M, Aksoy Z. Pathogeny of Listeria species in retail chicken meat consumed in Kahramanmaraş city. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2008, 11: 8-12.
16. Ayaz ND. Hindi Kıymalarından Listeria monocytogenes'in İmmüno Manyetik Separasyon ve PCR ile Tanısı ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2008.
17. Berktaş M, Bozkurt EN, Bozkurt H, Alişarlı M, Güdücüoğlu H. Et ve et ürünlerinden Listeria monocytogenes'in izolasyonu. *Van Tıp Dergisi*, 2006, 13: 36-41.
18. Barüşük F. Et Ürünlerinde Listeria monocytogenes Varlığının Aranması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Tekirdağ: Namık Kemal Üniversitesi, 2010.
19. Adiguzel G, Bozoglu C, Yanmis D, Gormez A, Gulluce M, Adiguzel A. Phenotyping and genotyping characterization of Salmonella strains isolated from retail beef in Erzurum, Turkey. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2012, 6: 1581-1589.
20. Koçan D. Listeria monocytogenes'in Belirlenmesinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2007.
21. Wojciech L, Kowalczyk K, Staroniewicz Z, Kosek K, Molenda J, Ugorski M. Genotypic characterization of Listeria monocytogenes isolated from foodstuffs and

farm animals in Poland. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*, 2004, 48: 427-435.

22. Liu DY. Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55: 645-659.
23. Rijpens N, Vlaemynck G, Rossau R, Herman L, Jannes G. Unidentified Listeria-like bacteria isolated from cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 27: 198-202.
24. Blatter S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Phenotypic and molecular typing of Listeria monocytogenes isolated from the processing environment and products of a sandwich-producing plant. *Food Control*, 2010, 21: 1519-1523.
25. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 2007, 9: 1236-43.
26. Doganay M. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 35: 173-5.
27. Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, Perdue ML. Subtyping Listeria monocytogenes from bulk tank milk using automated repetitive element-based PCR. *Journal of Food Protection*, 2005, 68: 2707-2712.
28. Şahiner A. Listeria monocytogenes'in Gıdalardan İzolasyonunda Klasik, Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılmasi ile Stres Adaptasyonunun Gıda Güvenliği Açısından İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi, 2011.
29. Adıgüzel A. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2006.

30. Adıgüzel G. Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2008.
31. Adiguzel G, Atasever M. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Romanian Biotechnological Letters*, 2009, 14: 4130-4138.
32. Adiguzel G, Gulluce M, Bozoglu C, Yanmis D, Gormez A, Atasever M, Adiguzel A. Molecular characterization of Escherichia coli O157:H7 from retail beef in Erzurum, Turkey. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2012, 6: 1033-1041.
33. Atil E, Ertas HB, Ozbey G. Isolation and molecular characterization of Listeria spp. from animals, food and environmental samples. *Veterinarni Medicina*, 2011, 56: 386-394.
34. Guerra MM, Bernardo F, McLauchlin J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of Listeria monocytogenes. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25: 456-61.
35. Kerouanton A, Brisabois A, Denoyer E, Dilasser F, Grout J, Salvat G, Picard B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of Listeria monocytogenes. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 43: 61-71.
36. Swaminathan B, Hunter SB, Desmarchelier PM, Gerner-Smidt P, Graves LM, Harlander S, Hubner R, Jacquet C, Pedersen B, Reineccius K, Ridley A, Saunders NA, Webster JA. WHO-sponsored international collaborative study to evaluate methods for subtyping Listeria monocytogenes: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and southern hybridization with

two probes derived from L. monocytogenes chromosome. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 32: 263-278.

37. Adiguzel A, Ozkan H, Baris O, Inan K, Gulluce M, Sahin F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 79: 321-328.
38. Jeršek B, Gilot P, Gubina M, Klun N, Mehle J, Tcherneva E, Rijpens N, Herman L. Typing of Listeria monocytogenes strains by repetitive element sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 103-109.
39. Khiyami MA, Serour EA, Shehata MM, Bahklia AH. Thermo-aerobic bacteria from geothermal springs in Saudi Arabia *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11: 4053-4062.
40. Tuğrulelçi N. Kayseri'de Satışa Sunulan Tüketime Hazır Gıda Örneklerinde Listeria monocytogenes Varlığının Konvansiyonel Yöntemler ile Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tez, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2011.
41. Yeşilyurt C. Aydin İli Mezbahalarında E. coli O157:H7 ve Listeria monocytogenes Varlığının Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2010.
42. Dinçer E. Listeria monocytogenes'in Elektrokimyasal Sensör Sistemleri ile Belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, 2013.
43. Öksüztepe G, Güran HŞ, İncili GK, Gül SB. Elazığ'da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2011, 25: 107-114.

44. Cloak OM, Duffy G, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. Isolation and detection of Listeria spp, Salmonella spp and Yersinia spp using a simultaneous enrichment step followed by a surface adhesion immunofluorescent technique. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 39: 33-43.

45. Ballesteros L, Moreno Y, Cuesta G, Rodrigo A, Tomás D, Hernández M, Ferrús MA, Henández JG. Persistence of Listeria monocytogenes strains in a frozen vegetables processing plant determined by serotyping and REP-PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46: 1109-1112.

46. Vollenhofer-Schrumpf S, Buresch R, Unger G, Stahl N, Franzl G, Schinkinger M. Detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes and Campylobacter spp. in chicken samples by multiplex polymerase chain reaction and hybridization using the genegen major food pathogens detection kit. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2005, 13: 148-176.

47. Soultos N, Koidis P, Madden RH. Presence of Listeria and Salmonella spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 37: 421-423.

48. Özmen G, Kılıç H. Isolation of Listeria spp. from chicken meat consumed in Gemlik garrison. *Journal of Health Sciences,* 2006, 15: 194-197.

49. Ueda F, Anahara R, Yamada F, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R. Discrimination of Listeria monocytogenes contaminated commercial Japanese meats. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105: 455-462.

50. van Nierop W, Duse AG, Marais E, Aithma N, Thothobolo N, Kassel M, Stewart R, Potgieter A, Fernandes B, Galpin JS, Bloomfield SF. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by Salmonella, Listeria monocytogenes and Campylobacter. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99: 1-6.

51. Suo B, He YP, Tu SI, Shi XM. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157, and Listeria monocytogenes in meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7: 619-628.

52. Kobayashi H, Kubota J, Fujihara K, Honjoh K, Ito M, Fujiki N, Nakabe M, Oda S, Satoyama T, Takasu K, Nakanishi H, Miyamoto T. Simultaneous enrichment of Salmonella spp, Escherichia coli O157:H7, Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Listeria monocytogenes by single broth and screening of the pathogens by multiplex real-time PCR. *Food Science and Technology Research*, 2009, 15: 427-438.

53. Lawrence LM, Gilmour A. Incidence of Listeria spp and Listeria monocytogenes in a poultry-processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 4600-4604.

54. Cabrita P, Correia S, Ferreira-Dias S, Brito L. Genetic characterization of Listeria monocytogenes food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27: 454-461.

55. Çankaya H. Bazı Doğal Antimikrobiyal Bileşiklerin Salmonella enteritidis, Escherichia coli O157:H7 ve Listeria monocytogenes Üzerine Etkinliğinin Taze Tavuk Eti Sisteminde İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora tezi, İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, 2009.

56. Güven A, Patır B. Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde Listeria türlerinin araştırılması. *Turkish Journal of. Veterinary and Animal Sciences*, 1998, 22: 205-212.

57. Harvey J, Norwood DE, Gilmour A. Comparison of repetitive element sequence-based PCR with multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field gel electrophoresis for typing Listeria monocytogenes food isolates. *Food Microbiology*, 2004, 21: 305-312.

58. Ingianni A, Floris M, Palomba P, Madeddu A, Quartuccio M, Pompei R. Rapid detection of Listeria monocytogenes in foods, by a combination of PCR and DNA probe. *Molecular and Cellular Probes*, 2001, 15: 275-280.

59. Şireli UT, Erol İ, Şahin S, Terzi G, Gürbüz OA. Prevalence and contamination levels of Listeria spp. in poultry minced, poultry meatballs and poultry burgers. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2002, 26: 1271-1276.

60. Ürküt CZ. Listeria monocytogenes Tayinine Yönelik DNA Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı ve Optimizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora tezi, Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi, 2011.

61. Ye KP, Zhang QQ, Jiang Y, Xu XL, Cao JX, Zhou GH. Rapid detection of viable Listeria monocytogenes in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR. *Food Control*, 2012, 25: 117-124.

62. Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Escherichia coli O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6: 81-89.

63. Laciar A, Vaca L, Lopresti R, Vega A, Mattana C, De Centorbi O. DNA fingerprinting by ERIC-PCR for comparing Listeria spp. strains isolated from

different sources in San Luis, Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, 2006, 38: 55-60.

64. Telli N. Listeria monocytogenes'in Salamura Beyaz Peynir Üretim Hattında Kontaminasyon Kaynaklarının Belirlenmesi ve PFGE Metodu ile Genotiplendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2012.
65. Gray ML, Killinger AH. Listeria monocytogenes and listeric infections. *Bacteriology Reviews*, 1966, 30: 309-82.
66. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, Stasiewicz MJ, Burrell A, Roof S, Strawn L, Fortes ED, Nightingale KK, Kephart D, Wiedmann M. Five new species of Listeria from agricultural and natural environments in the United States. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 1882-1889.
67. Cengiz C. Ankara Çevresinde Yetiştirilen Yeşil Yapraklı Sebzelerin Listeria monocytogenes İçeriklerinin Moleküler Teknikler Kullanılarak Belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2008.
68. Kum E. Kayseri'de Satışa Sunulan Peynir Örneklerinde Listeria monocytogenes Varlığının Kültür Yöntemleri ile Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2009.
69. Hamparsun H. Fermente Sucuklarda Nisin Kullanımının Listeria monocytogenes Üzerine Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2006.

70. Ütkün S. Portakal Suyunda Escherichia coli O157:H7 ve Listeria monocytogenes İnaktivasyonunda Ultrasound ve Bazı Uçucu Yağların Kombine Kullanımı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi, 2011.

71. Yıldırım R. Nisin Üreticisi Lactococcus lactis subsp. lactis LL27 Suşunun Beyaz Peynirde Listeria monocytogenes'in Gelişiminin Engellenmesi Üzerine Etkisi. Biyoteknoloji Enstitüsü. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2010.

72. Bal T. Aşkale (Erzurum) Manyezit Ocaklarından Cevher Zenginleştirme Potansiyeli Bulunan Bakterilerin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.

73. Zhang D, Zhang H, Yang L, Guo J, Li X, Feng Y. Simultaneous detection of Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7 in food samples using multiplex PCR method. *Journal of Food Safety*, 2009, 29: 348-363.

74. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205: 31-6.

75. Versolavic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Moleculer and Cellular Biology*, 1994, 5: 40.

76. Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL, Aragno M. Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1723-7.

77. Guven A, Patir B. Studies of the Listeria species in some meat and meat products consumed in Elazig city. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 1998, 22: 205-212.

78. Awaisheh SS. Incidence and contamination level of Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in ready-to-eat meat products in Jordan. *Journal of Food Protection*, 2010, 73: 535-40.

79. Odumeru JA, Steele M, Fruhner L, Larkin C, Jiang JD, Mann E, McNab WB. Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37: 944-949.

80. Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, Park G, Kim MJ, Kook JK, Kim DM, Moon DS, Park YJ. Evaluation of VITEK 2, microscan, and phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 70: 442-7.

81. Nucera DM, Lomonaco S, Costa A, Morra P, Grassi MA. Diagnostic performance of rep-PCR as a rapid subtyping method for Listeria monocytogenes. *Food Analytical Methods*, 2013, 6: 868-871.

82. Adiguzel A, Inan K, Sahin F, Arasoglu T, Gulluce M, Belduz AO, Baris O. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 2011, 35: 267-274.

83. Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate Escherichia coli isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 2572-2577.

84. Hellberg RS, Martin KG, Keys AL, Haney CJ, Shen Y, Smiley RD. 16S rRNA partial gene sequencing for the differentiation and molecular subtyping of Listeria species. *Food Microbiology*, 2013, 36: 231-40.

85. Guan ZP, Jiang Y, Gao F, Zhang L, Zhou GH, Guan ZJ. Rapid and simultaneous analysis of five foodborne pathogenic bacteria using multiplex PCR. *European Food Research and Technology*, 2013, 237: 627-637.

86. Weiler C, Ifland A, Naumann A, Kleta S, Noll M. Incorporation of Listeria monocytogenes strains in raw milk biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 161: 61-8.

87. Chen JS, Chen QM, Jiang JJ, Hu HX, Ye JB, Fang WH. Serovar 4b complex predominates among Listeria monocytogenes isolates from imported aquatic products in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7: 31-41.

88. Chen JS, Jiang LL, Chen XY, Luo XK, Chen Y, Yu Y, Tian GM, Liuz DY, Fang WH. Listeria monocytogenes serovar 4a is a possible evolutionary intermediate between L. monocytogenes serovars 1/2a and 4b and L. innocua. *Journal Of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19: 238-249.

EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ebru YÜREKLİ
Doğum tarihi	07.10.1987
Doğum yeri	İstanbul
Medeni hali	Bekar
Uyruğu	T.C.
Adres	Cumhuriyet mah. Hanımeli sok. no:18 K.Çekmece/İST
Tel	05439796172
Fax	
E-mail	latelebru87@gmail.com
Eğitim	
Lise	Küçükçekmece Anadolu Lisesi (2004)
Lisans	Atatürk Ünv. Fen Fak. Biyoloji (2005-2009)
Yüksek Lisans	Atatürk ünv., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı (2010-)
Yabancı Dil Bilgisi	
	İngilizce
İlgi Alanları ve Hobiler	
Yüzmek, Kitap okumak, Yürümek	

EK 2. L2 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

Baz sayısı: 1430

Baz içeriği: 328 C, 440 G, 362 A, 300 T

Genbankası no: KF956741

```
   1 attctccctt tagaggatgg ctcaggacga acgctggcgg cgtgcctaat acatgcaagt
  61 cgaacgaacg gaggaagagc ttgctcttcc aaagttagtg gcggacgggt gagtaacacg
 121 tgggcaacct gcctgtaagt tggggataac tccgggaaac cggggctaat accgaatgat
 181 agaatgtggc gcatgccacg cttttgaaag atggtttcgg ctatcgctta cagatgggcc
 241 cgcggtgcat tagctagttg gtagggtaat ggcctaccaa ggcaacgatg catagccgac
 301 ctgagagggt gatcggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag
 361 cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag caacgccgcg tgtatgaaga
 421 aggttttcgg atcgtaaagt actgttgtta gagaagaaca aggataagag taactgcttg
 481 tcccttgacg gtatctaacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat
 541 acgtaggtgg caagcgttgt ccggatttat tgggcgtaaa gcgcgcgcag gcggtctttt
 601 aagtctgatg tggaagcccc cggcttaacc ggggagggtc attggaaact ggaagactgg
 661 agtgcagaag aggagagtgg aattccacgt gtagcggtga aatgcgtaga tatgtggagg
 721 aacaccagtg gcgaaggcga ctctctggac tgtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg
 781 gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag tgctaagtgt
 841 taaggggttt cccgcgcctt agtgctgcag ctaacggcat taagcactcc cgcctggggc
 901 agtacgaccg ccagggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag
 961 catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cctttgacca
1021 ctctggagac agagctttcc cttcggggac aaagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca
1081 gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg attttagttg
1141 ccagcattta gttgggcact ctaaagtgac tgccggtgca agccggagga aggtggggat
1201 gacgtcaaat catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggatagtac
1261 aaagggtcgc gaagccgcga ggtggagcta atcccataaa actattctca gttcggattg
1321 taggctgcaa ctcgcctaca tgaagccgga atcgctagta atcgtggatc agcatgccac
1381 ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac ataatagcat
```

EK 3. L5 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

Baz sayısı:1114

Baz içeriği: 244 C, 353 G, 282 A, 235 T

Genbankası no: KF956740

```
   1 gaacgaacgg aggaagagct tgctcttcca aagttagtgg cggacgggtg agtaacacgt
  61 gggcaacctg cctgtaagtt ggggataact ccgggaaacc ggggctaata ccgaatgata
 121 gaatgtggcg catgccacgc ttttgaaaga tggtttcggc tatcgcttac agatgggccc
 181 gcggtgcatt agctagttgg tagggtaatg gcctaccaag gcaacgatgc atagccgacc
 241 tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc
 301 agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gtatgaagaa
 361 ggttttcgga tcgtaaagta ctgttgttag agaagaacaa ggataagagt aactgcttgt
 421 cccttgacgg tatctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata
 481 cgtaggtggc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgcgcgcagg cggtctttta
 541 agtctgatgt gaaagccccc ggcttaaccg gggagggtca ttggaaactg gaagactgga
 601 gtgcagaaga ggagagtgga attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagat atgtggagga
 661 acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg
 721 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta
 781 gggggtttcc gccccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtacg
 841 accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg
 901 tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catcctttga ccactctgga
 961 gacagagctt tcccttcggg gacaaagtga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg
1021 tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttgattttag ttgccagcat
1081 ttagttgggc actctaaagt gactgccggt gcaa
```

EK 4. L11 kodlu izolatın 16S rRNA geninin baz sırası

Baz sayısı: 1423

Baz içeriği: 324 C, 435 G, 363 A, 301 T

Genbankası no: KF956739

```
   1 attctagagt ttgatcatgg ctcaggacca taagggcggc gtgcctaata catgcaagtc
  61 gaacgaacgg aggaagagct tgctcttcca aagttagtgg cggacgggtg agtaacacgt
 121 gggcaacctg cctgtaagtt ggggataact ccgggaaacc ggggctaata ccgaatgata
 181 aagtgtggcg catgccacgc ttttgaaaga tggtttcggc tatcgcttac agatgggccc
 241 gcggtgcatt agctagttgg tagggtaatg gcctaccaag gcaacgatgc atagccgacc
 301 tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc
 361 agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gtatgaagaa
 421 ggttttcgga tcgtaaagta ctgttgttag agaagaacaa ggataagagt aactgcttgt
 481 cccttgacgg tatctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata
 541 cgtaggtggc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgcgcgcagg cggtctttta
 601 agtctgatgt gaaagccccc ggcttaaccg gggagggtca ttggaaactg gaagactgga
 661 gtgcagaaga ggagagtgga attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagat atgtggagga
 721 acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg
 781 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta
 841 gagggtttcc gcccccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtacg
 901 accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg
 961 tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catcctttga ccactctgga
1021 gacagagctt tcccttcggg gacaaagtga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg
1081 tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttgattttag ttgccagcat
1141 ttagttgggc actctaaagt gactgccggt gcaagccgga ggaaggtggg gatgacgtca
1201 aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggatag tacaaagggt
1261 cgcgaagccg cgaggtggag ctaatcccat aaaactattc tcagttcgga ttgtaggctg
1321 caactcgcct acatgaagcc ggaatcgcta gtaatcgtgg atcagcatgc cacggtgaat
1381 acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacacggtac cat
```

EK 5. ETİK KURUL ONAY FORMU

"2012. 4.1/ 10 "SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 28.09.2012

4.1/10-Enstitümüz Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ebru YÜREKLİ'nin **"Erzurum Piyasasından Toplanan Tavuk Eti Örneklerinden İzole Edilen Listeria Monocytdgenes Türünün Moleküller Tanımlanması "** tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Doç. Dr. Ayşe OKANLI	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Samih DİYARBAKIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof.Dr.Yavuz Selim SAĞLAM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Ahmet YILDIZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr.Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd.Doç.Dr.Engin SAYGIN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	**Katılmadı**
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi ve Raportör	**Katılmadı**