



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**İSTANBUL İLİNDE SATILAN KIYMA ÖRNEKLERİNDE *Listeria*
monocytogenes VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

ARDA ALARA ULUDAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayten KİMİRAN**

Temmuz, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, 23.07.2020 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Unvan (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Unvan

Unvan



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2018-31547 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tezimin kararlaştırılmasından sonuçlandırılmasına kadar olan süreçte bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, hiçbir zaman sabrını eksik etmeyen, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Tezimin uygulanması kısmında laboratuvar çalışmalarında yardım ve katkılarını eksik etmeyen, her zaman yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya,

Tez çalışmamda kullanmış olduğum *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* suşlarını göndererek yardımcı olan sayın Prof. Dr. Seza ARSLAN ve Arş. Gör. Dr. Fatma ÖZDEMİR'e,

Lisans eğitimim sırasında tanıştığım ve Yüksek lisans eğitimimiz boyunca da her anımda yanımda olan, manevi desteğini eksik etmeyen Çise KEBABÇI'ya,

Eğitim hayatım süresince maddi ve manevi olarak bana her zaman destek olan ve benim için her türlü özveriyi gösteren, annem Hülyam ULUDAĞ, babam Gökhan ULUDAĞ ve biricik kardeşim Bartu ULUDAĞ olmak üzere tüm aileme,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2020

Arda Alara ULUDAĞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. TEHLİKE ANALİZİ VE KRİTİK KONTROL NOKTALARI (HACCP)	5
2.2. KIYMA HAKKINDA GENEL BİLGİLER	6
2.3. KIYMALARDAKİ MİKROORGANİZMALAR	6
2.4. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLER.....	8
2.5. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	10
2.6. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN EPİDEMİYOLOJİSİ.....	12
2.7. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	17
2.7.1. Geleneksel Kültür Yöntemleri.....	19
2.7.2. Hızlı Tanı Yöntemleri.....	21
2.7.3. Genotipik Yöntemler	24
2.8. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 'İN PATOGENEZİ	29
2.8.1. Konakçıya Alınması	29
2.8.2. Listeriosis Tanısı	31
2.8.3. Listeriosis Tedavisi	33
2.8.4. Kontrol ve Önleme	34
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	36
3.1. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER.....	36
3.2. KIYMA ÖRNEKLERİNDEN <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 'İN KÜLTÜR YÖNTEMİYLE İZOLASYONU	36
3.3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI	39

3.3.1.	Gram Boyama.....	39
3.3.2.	Katalaz Testi	39
3.3.3.	Oksidaz Testi	40
3.3.4.	Metil Kırmızısı Testi	40
3.3.5.	Voges Proskauer Testi	40
3.3.6.	Nitrat Redüksiyon Testi.....	40
3.3.7.	Hareket Testi.....	41
3.3.8.	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	41
3.3.9.	Hemoliz testi.....	41
3.3.10.	Christie, Atkins and Munch-Peterseon (CAMP) Testi.....	41
3.4.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ.....	42
3.4.1.	Kullanılan Antibiyotikler.....	42
3.4.2.	Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması	42
3.4.3.	Antibiyotik Duyarlılık Deneyi.....	43
3.5.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BAKTERİLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ	43
3.5.1.	DNA İzolasyonu	43
3.5.2.	DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	44
3.5.3.	<i>Listeria monocytogenes</i> Bakterilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Doğrulanması.....	44
3.5.3.1.	<i>Kullanılan Primerler</i>	44
3.5.3.2.	<i>PZR Yöntemi</i>	45
3.5.4.	<i>Listeria monocytogenes</i> Bakterilerinin Filogenetik Analizi.....	46
3.5.4.1.	<i>Kullanılan primerler</i>	46
3.5.4.2.	<i>PZR Yöntemi</i>	47
3.6.	ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....	48
3.6.1.	<i>Listeria</i> UVM Broth Base (Biolife, İtalya).....	48
3.6.2.	<i>Listeria</i> Fraser Broth Base (Biolife, İtalya)	48
3.6.2.1.	<i>Listeria Fraser Supplement (Biolife, İtalya)</i>	49
3.6.3.	<i>Listeria</i> Oxford Agar Base (Biolife, İtalya).....	50
3.6.3.1.	<i>Listeria Oxford Antimicrobic Supplement (Biolife-İtalya)</i>	51
3.6.4.	<i>Listeria</i> Chromogenic Agar Base according to Ottaviani and Agosti (ALOA) ISO (Conda, İspanya).....	51
3.6.4.1.	<i>Listeria Lipase C Supplement (Conda, İspanya)</i>	52

3.6.4.2.	<i>Listeria Chromogenic Selective Supplement (Conda, İspanya)</i>	52
3.6.5.	Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSA-YE) (Conda, İspanya)	53
3.6.6.	Oksidaz Testi Ayırıcı	54
3.6.7.	Katalaz Testi Ayırıcı	54
3.6.8.	Gram Boyama.....	54
3.6.9.	%0.85' lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS).....	55
3.6.10.	Clark-Lubs Besiyeri.....	55
3.6.11.	Nitrat Besiyeri	56
3.6.12.	Sulfate Indole Motility (SIM) Besiyeri (Merck, Almanya).....	56
3.6.13.	Muller Hinton Agar (MHA) (Sigma-Aldrich, Almanya)	57
3.6.14.	Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri.....	57
3.6.15.	Brom krezol moru.....	58
3.6.16.	%5'lik Ramnoz, Ksiloz, Mannitol, Riboz, α -Metil-D-mannosit Çözeltileri	58
3.6.17.	Metil Kırmızısı Ayırıcı	59
3.6.18.	Voges Proskauer Ayırıcı	59
3.6.19.	Nitrat Testi Ayırıcı.....	59
3.6.20.	%5' lik Koyun Kanlı Agar	60
3.6.21.	10 M NaOH	60
3.6.22.	1 M HCl.....	60
3.6.23.	0.5 M EDTA.....	60
3.6.24.	10x TBE.....	61
3.6.25.	1x TBE.....	61
3.6.26.	%0.8' lik Agaroz Jel	61
3.6.27.	Primer Konsantrasyonu Hazırlanması	61
4.	BULGULAR	62
4.1.	KIYMA ÖRNEKLERİNDEN <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 'İN KÜLTÜR YÖNTEMİYLE İZOLASYONU	62
4.2.	BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI	65
4.3.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ SAPTANMASI	72
4.4.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ	79
4.4.1.	<i>Listeria monocytogenes</i> Bakterilerinin PZR Uygulaması ile Doğrulanması.....	79
4.4.1.1.	DNA Eldesi.....	79

4.4.1.2. <i>PZR Yöntemi Sonuçları</i>	79
4.4.2. <i>Listeria</i> Cinsi Bakterilerin Filogenetik Analizi	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	85
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	121



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Gıda ve çevre örneklerinde <i>Listeria</i> ve <i>L. monocytogenes</i> için izolasyon, tanımlama ve tiplendirme yöntemlerine genel bakış (Gasnov ve diğ., 2005).	18
Şekil 2.2: <i>L. monocytogenes</i> için standartlaştırılmış bazı zenginleştirme ve izolasyon protokolleri (Liu, 2008).	19
Şekil 2.3: Polimeraz zincir reaksiyonuna şematik bakış (Liu, 2008).	24
Şekil 2.4: <i>Listeria</i> fizyopatolojisinin şematik gösterimi (Vazquez-Boland ve diğ., 2001).	30
Şekil 3.1: <i>L. monocytogenes</i> bakterisinin kültür yöntemi ile izolasyonu.	38
Şekil 4.1: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli kolonilerin (1, 2, 3) MOX besiyerinde görünümü.	63
Şekil 4.2: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli kolonilerin (1) ALOA besiyerinde görünümü.	63
Şekil 4.3: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli bakterilerin Gram boyama sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.	64
Şekil 4.4: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatların MR testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: 1-8 (KA 75/1, KA 76/3, KA 77/1, KA 77/2, KA 78/2, KA 79/1, KA 80/1, KA 80/3), + kontrol: <i>E. coli</i> , - kontrol: <i>Klebsiella</i> spp.	66
Şekil 4.5: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatların VP testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: 1-7 (KA 11/1, KA 11/2, KA 1/2, KA 1/3, KA 1/5, KA 3/2, KA 7/3), Negatif reaksiyon: 8 (KA 9/1), + kontrol: <i>E. coli</i> , - kontrol: <i>Klebsiella</i> spp.	66
Şekil 4.6: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatların nitrat redüksiyon testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: 1,2 (KA 30/4, KA 36/1), + kontrol: <i>P. aeruginosa</i> , - kontrol: <i>L. monocytogenes</i> RSKK 475.	67
Şekil 4.7: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatın SIM besiyerinde şemsiye şeklindeki hareketi (KA 12/2).	67
Şekil 4.8: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatların karbonhidrat fermentasyon testi sonuçları. A) Pozitif reaksiyon: (KA 1/2), B) Negatif reaksiyon: (KA 49/1).	68
Şekil 4.9: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatların CAMP testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: KA 26/2, KA 30/2, KA 30/3, KA 89/2; + kontrol: <i>L. monocytogenes</i> RSKK 475.	69

- Şekil 4.10:** *L. monocytogenes* şüpheli izolatların hemoliz testi sonuçları. β hemoliz pozitif reaksiyon: KA 11/2, α hemoliz pozitif reaksiyon: KA 1/5, KA 6/1, KA 10/1, KA11/1.....69
- Şekil 4.11:** *L. monocytogenes* bakterisinin antibiyotik duyarlılık testi sonuçları (KA 69/2).....72
- Şekil 4.12:** Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile elde edilen *L. monocytogenes* bakterilerine ait genomik DNA'ların jeldeki görüntüsü. A) M: 1 Kb DNA marker. 1-18: *L. monocytogenes* şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol. B) M: 1 Kb DNA marker. 19-21: *L. monocytogenes* bakterileri. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol. 79
- Şekil 4.13:** Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin *iap* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüleri. A) M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 1: KA 26/2. 2: KA 11/1. 3: KA 45/1. 4: KA 11/2. 5: KA 12/1. 6: KA 14/1. 7: KA 17/2. 8: KA 19/2. 9: KA 21/2. 10: KA 23/2. 11: KA 26/1. 12: KA 26/4. 13: KA 30/2. 14: KA 30/3. 15: KA 55/2. 16: KA 69/2. 17: KA 72/1. 18: KA 79/2. -: Negatif kontrol. B) M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 19: KA 89/2. 20: KA 90/1. 21: KA 95/1. -: Negatif kontrol.....81
- Şekil 4.14:** Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin *hlyA* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 1: KA 11/1. 2: KA 11/2. 3: KA 12/1. 4: KA 17/2. 5: KA 19/2. 6: KA 21/2. 7: KA 23/2. 8: KA 26/1. 9: KA 26/2. 10: KA 26/4. 11: KA 30/2. 12: KA 30/3. 13: KA 45/1. 14: KA 55/2. 15: KA89/2. 16: KA 95/1. -: Negatif kontrol. 81
- Şekil 4.15:** *hlyA* gen bölgesinin tespiti ile *L. monocytogenes* olduğu belirlenen bakterilerin *16S rRNA* genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 1: KA 11/1. 2: KA 11/2. 3: KA 12/1. 4: KA 17/2. 5: KA 19/2. 6: KA 21/2. 7: KA 23/2. 8: KA 26/1. 9: KA 26/2. 10: KA 26/4. 11: KA 30/2. 12: KA 30/3. 13: KA 45/1. 14: KA 55/2. 15: KA89/2. 16: KA 95/1. -: Negatif kontrol. 83

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Türk Gıda Kodeksine göre hazırlanmış taze etler, hazırlanmış dondurulmuş etler için mikrobiyolojik değerler (Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2001/7).....	7
Tablo 2.2: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri (Seeliger ve Jones, 1986).....	10
Tablo 2.3: <i>Listeria</i> cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri (Liu, 2008).	12
Tablo 3.1: İncelenen örneklerin ilçelere göre dağılımı.....	36
Tablo 3.2: Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotikler.....	42
Tablo 3.3: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin doğrulanması için kullanılan primerler.....	45
Tablo 3.4: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin <i>iap</i> ve <i>hlyA</i> genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.....	46
Tablo 3.5: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	46
Tablo 3.6: 16S rRNA genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.....	47
Tablo 4.1: Besiyeerlerine göre <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolat sayısı.....	64
Tablo 4.2: <i>L. monocytogenes</i> şüpheli izolatların biyokimyasal test sonuçları.....	70
Tablo 4.3: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin antibiyotik zon çapları.....	73
Tablo 4.4: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları.....	76
Tablo 4.5: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları.....	77
Tablo 4.6: <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri.....	78
Tablo 4.7: Kıyma örneklerinden elde edilen <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin besiyeerlerine göre dağılımı.....	82
Tablo 4.8: Kıyma örneklerinden elde edilen <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin erişim numaraları.....	84

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
aw	: Su aktivitesi
atm	: Atmosfer basıncı
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
Fe⁺³	: Ferrik polimaltoz
HCl	: Hidroklorik asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂S	: Hidrojen sülfat
kb	: Kilo baz
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
ml	: Mililitre
M	: Molar
N	: Normal
nm	: Nano metre
pH	: Hidrojen gücü
sn	: Saniye
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
%	: Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama**

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
ALOA	: Agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti
ActA	: Actin assembly-inducing protein
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BHI	: Brain Heart Infusion Agar
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BLEB	: Buffered <i>Listeria</i> Enrichment Broth
BCM	: Biosynth Chromogenic Medium
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
c DNA	: Tamamlayıcı DNA
CAMP	: Christie, Atkins and Munch-Peterseon
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
FB	: Fraser Broth
FISH	: Floresan Yerde Hibridizasyon
FSIS	: Gıda Güvenliği ve Denetimi Hizmeti
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GHP	: İyi Hijyen Uygulamaları
GMP	: İyi Üretim Uygulamaları
HL	: Horse blood agar
hly	: Hemolizin
HACCP	: Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
INF	: İnterferon
IMS	: İmmünomanyetik Ayırma
ISO	: Uluslararası Standartlar Teşkilatı
inlA	: İnternalin A
iap	: Invasion associated protein
KKN	: Kritik Kontrol Noktaları

KOB	: Koloni Oluşturan Birim
LPM	: Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam
MHA	: Mueller-Hinton Agar
M Hücreleri	: Membranöz Epitel Hücreleri
MLD	: Mezenterik Lenf Düğümleri
MOX	: Modified Oxford Agar
MR	: Metil Kırmızısı
m RNA	: Mesajcı RNA
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NCCLS	: Ulusal Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
OXA	: Oxford Agar
PALCAM	: Polymyxin-Acriflavin-Lityum klorür-Seftazidim-Eskulin-Mannitol
PFGE	: Darbeli Alan Jel Elektroforezi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
r DNA	: Rekombinant DNA
r RNA	: Ribozomal RNA
RNA	: Ribonükleik asit
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RSKK	: Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon-PZR
SIM	: Sulfate Indole Motility
SSOP	: Standart Sanitasyon Operasyon Prosedürleri
TBE	: Tris borate EDTA
TSA	: Triptik Soy Agar
TSA-YE	: Triptik Soy Agar with Yeast Extract
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
UVM	: University Of Vermont agar
VP	: Voges-Proskauer

ÖZET

İSTANBUL İLİNDE SATILAN KIYMA ÖRNEKLERİNDE *Listeria monocytogenes* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arda Alara ULUDAĞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Listeria cinsi bakteriler Gram pozitif, sporsuz ve fakültatif anaerop olan, toprak, dışkı, su, atık su, bitkiler, besin maddeleri, insan, hayvan ve hayvan yemleri gibi çok çeşitli ortamlarda bulunabilen mikroorganizmalardır. *Listeria* cinsinin 21 farklı türü içinde insanlarda en sık rastlanan ve listeriozis etkeni olan tür *Listeria monocytogenes*'tir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlarda et ve et ürünlerinin oldukça önemli bir rolü vardır. *L. monocytogenes* tüm gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında yüksek ölüm oranına sahiptir ve bu ölüm oranı *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter* ve *Vibrio* türleri gibi diğer yaygın gıda kaynaklı patojenlerin ölüm oranlarından daha yüksektir.

Bu bağlamda, tez çalışmamızda halk sağlığı açısından tehlikeli olan *L. monocytogenes* bakterisinin İstanbul ilinde satılan kıyma örneklerindeki varlığının saptanması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, Aralık 2018-Kasım 2019 tarihleri arasında İstanbul' un 11 ilçesindeki farklı kasaplardan alınan 100 kıyma örneği *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir.

Çalışmamızda kıyma örneklerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) kültür metodu kullanılmıştır. Geleneksel kültür yöntemi ile izole edilen ve biyokimyasal testler ile *L. monocytogenes* olarak tanımlaması yapılan bakterilerin antibiyotik direnç profilleri 13 farklı

antibiyotik kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Biyokimyasal testler ile *L. monocytogenes* olarak tanımlanan bakterilerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin varlığı açısından incelenerek moleküler olarak da doğrulanması yapılmıştır.

Klasik kültür yöntemleri ile elde edilen 186 şüpheli izolatın biyokimyasal testler sonucunda 21' inin *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 21 suşun antibiyotik duyarlılık testleri değerlendirildiğinde, izolatların amoksisilin/klavulanik asit (%14.28), penisilin (%9.52), sefaklor (%9.52), vankomisin (%9.52), siprofloksasin (%9.52) ve trimetoprim-sulfametoksazol (%9.52)' a karşı dirençli, ampisilin (% 100) ve tetrasiklin (% 100)' e karşı ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Klasik kültür yöntemi ile izole edilen ve biyokimyasal testler sonucunda *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 21 izolat, *iap* ve *hlyA* gen bölgeleri açısından incelendiğinde sadece 16' sının *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* olarak doğrulanan 16 suşun, sekans analizi sonucunda elde edilen 16S rRNA dizileri NCBI BLAST programı ile GenBank veritabanına dayalı olarak tanımlanmıştır.

Elde edilen verilere göre, sadece geleneksel kültür yöntemi ve biyokimyasal test sonuçlarına göre *L. monocytogenes* tanısının tek başına yetersiz olduğu ve moleküler yöntemlerle de desteklenmesi gerektiği tespit edilmiştir.

İstanbul ilinde satışa sunulan kıymalar ile yapmış olduğumuz çalışmamızda, *L. monocytogenes* izolasyon oranının (%17) ve izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik direnç insidansının düşük olmasına rağmen, gıdalarda *L. monocytogenes* bakterisinin bulunmasına izin verilmediğinden, kıymaların halk sağlığı açısından bir risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Özellikle ısıtılma işlemi görmeden tüketilebilen veya mutfak ortamında çapraz kontaminasyona sebep olabilecek kıyma gibi örneklerin sık sık bu bakteri açısından incelenmesi, kesimhaneler ve kasaplarda hijyen ve sanitasyon uygulamalarına dikkat edilmesi önerilmektedir.

Temmuz 2020, 139 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Listeria monocytogenes*, *hlyA*, antibiyotik duyarlılık, PZR, kıyma

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *Listeria monocytogenes* IN MINCED MEAT SAMPLES SOLD IN ISTANBUL PROVINCE

M.Sc. THESIS

Arda Alara Uludağ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Genus *Listeria* are Gram positive, non-spore-forming and facultative anaerob microorganisms which can be found in a wide variety of environments such as soil, feces, water, waste water, plants, nutrients, human, animal and animal feed. Among the 21 different species of the *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* is the most common and listeriosis agent in humans. Meat and meat products have a very important role in foodborne infections. *L. monocytogenes* has a high mortality rate among all foodborne infections, and this mortality rate is higher than the mortality rates of other common foodborne pathogens such as *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter* and *Vibrio* species.

In this context, in our thesis, it is aimed to determine the presence of *L. monocytogenes* bacteria, which are dangerous for public health, in minced meat samples sold in Istanbul province. In this study, 100 minced meat samples purchased from different butchers in 11 districts of Istanbul between December 2018 and November 2019 were examined for the presence of *L. monocytogenes*.

In our study, the culture method of the United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) was used for the isolation of *L. monocytogenes*, from the minced meat samples. Antibiotic resistance profiles of bacteria isolated by traditional culture method and identified as *L. monocytogenes* through biochemical tests were determined by disc diffusion method using 13 different antibiotics. The bacteria identified as *L. monocytogenes* through biochemical tests were also molecularly verified according to the presence of *iap* and *hlyA* gene regions by the polymerase chain reaction (PCR) method

As a result of biochemical tests, it was determined that 21 of 186 suspect isolates obtained by classical culture methods were *L. monocytogenes*. When antibiotic susceptibility tests of 21 strains identified as *L. monocytogenes* are evaluated, it was found to be resistant to Amoxicillin/Clavulanic acid (14.28%), penicillin (9.52%), cefaclor (9.52%), vancomycin (9.52%), ciprofloxacin (9.52%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (9.52%) and susceptible to ampicillin (100%) and to tetracycline (100%).

When 21 isolates, isolated by classical culture method and identified as *L. monocytogenes* as a result of biochemical tests, were examined in terms of *iap* and *hlyA* gene regions, only 16 were found to be *L. monocytogenes*. The 16S rRNA sequences obtained from the sequence analysis of 16 strains confirmed as *L. monocytogenes* were identified based on the GenBank database with the NCBI BLAST program.

According to the data obtained, it was insufficient to make the diagnosis of *L. monocytogenes* by using only the traditional culture method and biochemical test, it should be also supported by molecular methods.

In our study with minced meat offered for sale in Istanbul, although, the *L. monocytogenes* isolation rate (17%) and the incidence of antibiotic resistance of the isolated *L. monocytogenes* bacteria are low, it was concluded that minced meat may pose a public health risk, since *L. monocytogenes* bacteria are not allowed in foods. It is recommended to frequently examine the samples such as minced meat that can be consumed without heat treatment or that may cause cross-contamination in the kitchen environment, for this bacteria and to pay attention to hygiene and sanitation practices in slaughterhouses and butchers.

July 2020, 139 pages.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *hlyA*, antibiotic susceptibility, PCR, minced meat

1. GİRİŞ

Listeria cinsi bakteriler Gram pozitif, sporsuz ve fakültatif anaerop mikroorganizmalardır. Doğada yaygın olarak bulunan *Listeria* cinsi bakteriler toprak, dışkı, su, atık su, bitki, besin maddeleri, insan, hayvan ve hayvan yemleri gibi ortamlarda bulunabilirler. *Listeria* cinsinin *Listeria monocytogenes*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria booriae*, *Listeria thailandensis*, *Listeria costaricensis*, *Listeria goaensis* ve *Listeria kieliensis* olarak bilinen 21 farklı türü vardır (Pirie, 1940; Errebo Larsen ve Seeliger, 1966; Seeliger, 1981; Rocourt ve Grimont, 1983; Seeliger ve diğ., 1984; Graves ve diğ., 2009; Leclercq ve diğ., 2010; Bertsch ve diğ., 2013; Halter ve diğ., 2013; Weller ve diğ., 2015; Doijad ve diğ., 2018; Nunez-Montero ve diğ., 2018; Schardt, 2018; Leclercq ve diğ., 2019). Bu türler arasında insan patojeni olarak en sık rastlanılan türün *L. monocytogenes* olduğu ancak *L. ivanovii* ve *L. seeligeri*'nin de nadiren hastalık etkeni olduğu bilinmektedir (Rocourt ve diğ., 1987; Cummins ve diğ., 1994; Gasanov ve diğ., 2005).

Listeriozis etkeni olan *L. monocytogenes* zorunlu hücre içi patojenidir. Bu bakteri insanlarda deri ve mukoza lokalizasyonları, konjunktivit, menenjit, kan tablosunda monositoz, hamilelerde düşük ve ölü doğuma neden olmaktadır (Siegman-Igra ve diğ., 2002). *L. monocytogenes* ile kontamine gıda alımından sonra, ateş, grip benzeri belirtiler, karın veya sırt ağrısı, kusma, ishal, baş, kas, ve boğaz ağrısı, boyun tutulması, kasılma ve denge kaybı şeklinde bazı semptomlar görülmektedir (Mylonakis ve diğ., 2002). Yaşlı insanlar, hamile kadınlar, yeni doğanlar, çocuklar ve bebekler, hastalık nedeniyle bağışıklık sistemi bozuk olan kişilerin risk grubu içerisinde olduğu bilinmektedir (Goulet ve diğ., 2006).

Tüm gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında yüksek ölüm oranına (%30) sahip gıda patojeni olan *L. monocytogenes* aynı zamanda yüksek hastaneye yatırılma oranına da (%95.7) sahiptir (CDC, 2017). Bu ölüm oranı *Salmonella* Enteritidis (% 0.38), *Campylobacter* (%0.02-0.1) ve *Vibrio* (%0.005-0.01) türleri gibi diğer yaygın gıda kaynaklı patojenlerin ölüm oranlarından daha yüksektir (Mead ve diğ., 1999; Mead ve diğ., 2005). Yüksek patojenite göstermesi, bu

kadar yüksek ölüm oranına sahip olması ve çevresel faktörlere dirençli olması gıda güvenliği açısından sorun teşkil ettiğinden Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği 2009/68' e göre, 25 g gıda örneğinde hiçbir şekilde *L. monocytogenes*'in bulunmasına izin verilmemektedir (Türk Gıda Kodeksi, 2009).

L. monocytogenes'in bulunabildiği başlıca gıdalar arasında et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, sebzeler ve tüketime hazır diğer gıdaların olduğu bilinmektedir (Niederhauser ve diğ.,1992; Berktaş ve diğ., 2006; EFSA, 2016). *L. monocytogenes* -0.4 - 45° C sıcaklık, 3.0-9.5 pH aralığında yaşayabilen ve %10' a kadar olan tuz konsantrasyonlarında üreyebilme yeteneğine sahip, donmaya ve kuruluğa karşı direnç gösteren bakterilerdir (Lovett, 1989; Liu, 2008).

Et ve et ürünlerinin, yaşanan gıda kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir rolünün olduğu bilinmektedir. *L. monocytogenes*' in buzdolabı sıcaklığında üreyebilme yeteneğinden dolayı, bu bakteri ile kontamine kıymaların saklanma koşullarındaki uygulama hatalarına bağlı olarak, listeriosis enfeksiyonuna sebep olma ihtimalleri yüksektir.

Gıda ürünlerinden *L. monocytogenes*' in izolasyonu için yaygın olarak geleneksel kültür yöntemi kullanılmaktadır. Geleneksel kültür yönteminde, bakterilerin kültür ortamındaki özellikleri, mikroskopileri ve şüpheli bakterilerin biyokimyasal özellikleri üzerine yoğunlaşmaktadır. Geleneksel kültür yönteminde yapay besiyeri ortamında eskülini hidrolize edebilen, Gram pozitif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif reaksiyon veren kokobasiller *Listeria* bakterisi açısından şüpheli olarak kabul edilip, indol, üre, jelatin, nitrat indirgenmesi testlerine negatif, Metil red, Voges-proskaur, CAMP testlerine pozitif sonuç veren, β -hemoliz yapabilme özelliğine sahip bakteriler *L. monocytogenes* olarak değerlendirilmektedir (Fraser ve Sperber, 1988; Müller, 1988; Ryser ve Donnelly, 2001; Lee ve diğ., 2007).

Günümüzde ise geleneksel kültür yöntemlerini destekleyici olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Darbeli Alan Jel Elektrofrezisi (PFGE), Floresan Yerde Hibridizasyon (FISH) gibi moleküler teknikler kullanılmaktadır. Geleneksel kültür yöntemi ile *L. monocytogenes* olarak belirlenen suşların moleküler olarak doğrulanmasında PZR yöntemi ile *hlyA* ve *iap* genlerinin varlığı incelenmektedir.

Listeria türlerinde invaziflikle ilgili olan iap proteini için gen kodlaması ortaktır. 3' ve 5' sonlanmalarındaki gen kısımları tüm *Listeria* türlerinde korunmuştur fakat iç kısımlar türe özgüdür. Bu özellik, *Listeria* izolatlarının farklı türlere sınıflandırılmasını, tanımlanmasını ve PZR için elverişli bir araç olmasını sağlamaktadır. *L. monocytogenes*'e özgü listeriolysin O toksinini kodlayan gen *hlyA*'dır (Deneer ve Boychuk, 1991; Bubert ve diğ., 1999; Gilot ve Content, 2002).

L. monocytogenes somatik (O faktörü) ve flagella (H faktörü) antijenlerine göre farklı virülans potansiyelleri olan 13 farklı serotip içerir. Bunlar; 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e ve 7'dir. Gıda kaynaklı listeriozis vakalarından sorumlu olan serotiplerin çoğunun 1/2a, 1/2b, 4b olduğu, 4b serotipinin ise gıda kaynaklı listeriozis salgınlarının en yaygın nedeni olduğu bildirilmiştir (Churchill, 2006). Kanada ve ABD'de serotip 1/2a, 1/2b ve 4b'nin eşit bir dağılıma sahip olduğu bilinmektedir (Farber ve Peterkin, 1991).

Antibiyotikler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin gereğinden fazla veya yanlış kullanımı nedeniyle bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişmekte, hastalık ve salgınlarla mücadelede tedavi sürecini zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda, yaygınlaşan dünya genelindeki ticaret ve seyahatler de ülkeler ve kıtalar arası antimikrobiyal direncin yayılmasına sebep olmaktadır (Doyle ve diğ., 2013).

Listeriozis antibiyotik kullanılarak tedavi edilebilen bir hastalık olmasına rağmen, %30'a varan ölüm oranı nedeniyle tehlikeli bir hastalıktır (Farber ve Peterkin, 1991; Jones ve MacGowan, 1995). *Listeria* türleri arasında diğer bazı bakterilerde olduğu gibi antibiyotik direnç genlerinin transfer edilebildiği bilinmektedir (Walsh ve diğ., 2001). Elde edilen sonuçlar, gıda kaynaklı listeriozis vakalarında çoklu antibiyotik direnci ile karşılaşılabilmesinin göstergesidir. Tedavi zorluklarının öngörülebilmesi için izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci çalışılmalıdır. Bakterinin sahip olduğu direnç profilinin belirlenmesi, muhtemel enfeksiyonların tedavisinin ne denli mümkün olduğunun ve tehlike derecesinin belirlenmesi için önemlidir. Bu nedenle sadece hasta bireylerdeki bakterinin direnç özellikleri değil gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin de direnç profilleri belirlenmelidir. Bu sayede kontamine gıda kaynaklı muhtemel salgınlarda karşılaşılacak tedavi zorlukları öngörülebilir hale gelecektir.

Çalışmamızda, İstanbul ilinde satışa sunulan 100 farklı kıyma örneği, *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenerek potansiyel bir halk sağlığı riski oluşturup oluşturmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, USDA-FSIS standardı ile *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenen kıyma örneklerinden elde edilen izolatların biyokimyasal yöntemlerle tanımlaması yapıldıktan sonra *iap* ve *hlyA* genlerinin varlığı PZR yöntemi ile incelenerek moleküler doğrulaması yapılmıştır. Çalışmada ayrıca suşların antibiyotik direnç profilleri incelenmiş ve bulaşma meydana gelirse öngörülen tedavi alternatiflerinin ne denli yeterli olacağı ile ilgili güncel veriler elde edilmiştir.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. TEHLİKE ANALİZİ VE KRİTİK KONTROL NOKTALARI (HACCP)

Gıda güvenliğinin sağlanması ve devam ettirilmesi insan sağlığı için en önemli konulardan birisidir. Gıda güvenliği, kontaminasyona sebep olabilecek biyolojik, kimyasal ve fiziksel tehlike noktaları saptanarak risklerin azaltılması ve sistematik önleyici faaliyetler ile güvenli şekilde üretilmesi HACCP planı içerisinde sağlanabilir.

HACCP, tarımsal üretimin başından ürünün tüketimine kadar, gıda endüstrisinin tüm bölümlerinde kullanılmak üzere tasarlanmış bir süreç yönetim sistemidir. HACCP, gıdalardaki biyolojik tehlikeleri kontrol etmeyi yedi prensibe dayandırmaktadır:

1. Tehlike analizi yapmak
2. Kritik kontrol noktalarını (KKN) belirlemek
3. Kritik sınırları belirlemek
4. İzleme prosedürlerini oluşturmak
5. Düzeltici faaliyetler tesis etmek
6. Doğrulama prosedürlerini belirlemek
7. Kayıt tutma ve dokümantasyon prosedürlerinin oluşturulmasını sağlamak (FDA, 1997).

HACCP standardında en temel noktalardan birisi tehlike risk değerlendirmesinin yapılması, kritik kontrol noktalarının belirlenmesi ve bu tehlikelere karşı önlemler alınması şeklinde özetlenebilir.

İyi Üretim Uygulamaları (GMP), İyi Hijyen Uygulamaları (GHP) ve Standart Sanitasyon Operasyon Prosedürleri (SSOP) HACCP sisteminin ön şartları arasındadır. GMP'lerin ve diğer önkoşul programlarının güçlü bir temeli üzerine inşa edilerek iyi geliştirilmiş ve uygulanmış bir HACCP planı, gıda işleme tesislerinde ve pişmiş yemeye hazır gıdalarda *L. monocytogenes* insidansını azaltabilir.

2.2. KIYMA HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Yeterli ve dengeli beslenmede zengin bir protein kaynağı olan ve içerisinde bulunan kompleks B vitaminleri, farklı mineraller, eksojen aminoasitler ve kollajen gibi besin ögeleri sayesinde oldukça besleyici olan et, insanlık var olduğundan beri temel bir besin maddesi olma özelliğini her zaman taşımaktadır. Herhangi bir işleme tabi tutularak veya tutulmadan tüketilen et, diğer hayvansal ürünlere göre kimyasal yapı ve içerik bakımından daha karmaşık bir gıda maddesidir (Erol, 1999).

Taze et kimyasal ve fiziksel özellikleri sebebiyle mikrobiyolojik kontaminasyon ve bozulmalara karşı dirençli değildir (Soyutemiz, 2000). Türk gıda kodeksine göre kıyma; ‘kıyma makinesinden geçirilerek kıyılan veya başka bir yöntemle çok küçük parçalara ayrılan taze etten elde edilen ürün’ şeklinde tanımlanmaktadır (Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 200-5). Ülkemizde etin yaygın olarak kıyma şeklinde tercih edilmesinin yanı sıra temelinde kıyma olan et ürünlerinin tüketimi de artmaktadır.

Kıyma, yapısı gereğince mikroorganizmaların gelişimi ve çoğalması için oldukça elverişli bir ortam sağlamaktadır. Kontamine olmuş etin dış yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar, çekme ve karıştırma yapılarak hazırlanan kıymaların her yerine bulaşarak insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır (Dempster, 1973; Pivnick ve diğ., 1976). Kıymaların kontaminasyona uğramasında, üretim tesislerinde hijyenik kurallara uyulmaması, depolama şartları ve paketlenme şekli de rol oynamaktadır (Sancak ve diğ., 1993). Ülkemizde kıymaların mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılmış olan bazı çalışmalarda *Escherichia coli*, total koliform bakteriler, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, maya ve küflerin bulunduğu saptanmış, satışa sunulan kıymaların insan sağlığı açısından risk oluşturduğu tespit edilmiştir (Sancak ve diğ., 1993; Başkaya ve diğ., 2004; Öztürk, 2007; Aydemir Atasever ve Atasever, 2015).

2.3. KIYMALARDAKİ MİKROORGANİZMALAR

Bazı mikroorganizmalar insan sağlığını etkilemeden gıda ürünlerinde bozulmalar yaparken bazıları ise et ve et ürünlerinde bozulma yapmaksızın insanlarda enfeksiyon ve intoksikasyona sebep olurlar. Besin kaynaklı zehirlenmeler patojen bir mikroorganizma veya mikroorganizmanın toksinini içeren besinin tüketimi sonrası görülmektedir. Et ve et ürünleri

nedeniyle yaşanan gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlar besin zehirlenmelerindeki en büyük paydaya sahiptirler (Karapınar ve Gönül, 2003; Erol, 2007; Öztan, 2008).

Et ve et ürünlerinin potansiyel risk kaynağı olarak kabul edilmesinin başlıca nedenleri *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* türleri gibi patojen bakteriler ile kolayca kontamine olmalarıdır (Taşkanal, 1993). Aerobik mezofilik bakteri, *Enterobacteriaceae*, toplam koliform, fekal koliform ve *E. coli* sayıları ette patojen bakteri olma ihtimalini gösteren indikatör bakteri grupları olarak kabul edilmektedir. Kıymalarda toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı, kesim ve kesim sonrası uygulamalarda hijyen ve sanitasyonun göstergesi olup, genellikle kıymanın düşük kalitede olduğunu ya da raf ömrünün kısalmış olduğunu göstermektedir.

Tablo 2.1: Türk Gıda Kodeksine göre hazırlanmış taze etler, hazırlanmış dondurulmuş etler için mikrobiyolojik değerler (Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2001/7).

Mikroorganizma	n	c	m	M
<i>E. coli</i> (kob/g)	5	1	5×10^1	1×10^2
<i>E. coli</i> (kob/g)*	5	0	Bulunmamalı	
<i>E. coli</i> O157: H7 (kob/g)	5	0	Bulunmamalı	
<i>S. aureus</i> (kob/g)	5	1	5×10^2	5×10^3
<i>C. perfringens</i> (kob/g)	5	2	1×10^1	1×10^2
<i>Salmonella</i> (kob)	5	0	25 g' da bulunmamalı	
<i>L. monocytogenes</i> (kob)	5	0	25 g' da bulunmamalı	
Maya, küf (kob/g)	5	2	1×10^1	1×10^2

* : ısı uygulaması görmüş ürünlerde. n: deney numune sayısı. C: m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma ihtiva eden kabul edilebilir en fazla deney numune sayısı. m: (n-c) sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı. M: c sayıdaki deney numunesinin 1 gramında bulunabilecek kabul edilebilir en fazla organizma sayısı.

Fekal kaynaklı kontaminasyon düzeyinin belirlenmesinde *Enterobacteriaceae*, toplam koliform, fekal koliform bakteri ile *E. coli* bakterileri incelenmektedir. Ayrıca bu bakterilerden bazıları doğada da bulunduklarından, hayvanların derisinde ve tırnaklarında bulunmaları dış çevre kaynaklı kontaminasyonunun göstergesi olarak da kabul edilebilmektedir. Etin kıyma şekline getirilmesi aşamasında, yüzey alanı artarak kas

dokusunda bulunan doğal engeller kaybolmakta, bakterilerin ette mevcut olan tüm dokulara yayılması olası hale gelmektedir (Ünlütürk ve Turantas, 1999).

Pseudomonas, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alteromonas putrefaciens*, *Lactobacillus spp.* ve *Brochotrix thermopsphacta* taze etin kontaminasyonu sonucu en sık görülen bakterilerdir. Bunun yanı sıra, ette sindirim yoluyla alındığında halk sağlığı açısından potansiyel riske sebep olabilecek *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica* gibi bakteriler de bulunabilmektedir (Ray, 1997; Soyutemiz, 2000; Tunçel ve Tiryaki, 2001).

L. monocytogenes ve *Yersinia enterocolitica* soğuk kabul edilebilecek derecelerde (0-45°C) üreyebilme yeteneğine sahip psikrofil bakterilerdir (Ray, 1997). Bu bakteriler, gıda endüstrisinde soğuk zincir olarak depolanan besin maddelerinde büyük bir tehlikeye neden olabilmektedir. *L. monocytogenes*' in buzdolabı sıcaklığında üreyebilme yeteneğinden dolayı, bu bakteri ile kontamine kıymaların saklama koşullarındaki uygulama hatalarına bağlı olarak listeriosis enfeksiyonuna sebep olma ihtimalleri yüksektir.

Ülkemizde farklı illerde satılan kıymaların mikrobiyolojik kalitesinin araştırıldığı çalışmalarda, bu kıymaların insan sağlığı açısından çok büyük bir risk teşkil ettiği gösterilmiştir (Tekinsen ve diğ., 1980; Akıllı, 1982; Sancak ve diğ., 1993; Güven ve diğ., 1997; Gönülalan ve Köse 2003; Siriken, 2004). Türk Gıda Kodeksi tarafından taze etler, hazırlanmış dondurulmuş etler için geçerli olan mikrobiyolojik değerler Tablo 2.1' de gösterilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2001/7).

2.4. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLER

Murray ve diğ. (1926), İngiltere' de *L. monocytogenes*'i laboratuvarlarındaki tavşanların ani ölümlerine neden olan septisemik bir hastalığın etiyolojik ajanı olarak izole etmişler ve *Bacterium monocytogenes* olarak isimlendirmişlerdir. Daha sonra, antiseptikleri keşfeden ve antisepsi kavramının öncüsü olan İngiliz doktor Joseph Lister anısına ilk olarak *Listerella hepatolytica*, ardından *Listerella hominis*, son olarakta 1940 yılında bakteri Pirie tarafından *Listeria monocytogenes* olarak isimlendirilmiştir (Pirie, 1940).

Listeria, 1934 yılında Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 4. baskısında *Corynebacteriaceae* ailesi içine alınmış olup, ancak 1974 yılında, *Erysipelothrix* ve

Caryophanon ile birlikte *Lactobacillaceae* içinde yer almıştır. Son olarak, *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* ve *Caryophanon* ile bir arada ‘düzenli, spor oluşturmeyen, Gram pozitif çomaklar’ bölümünde *Listeriaceae* içerisine dahil edilmişlerdir (Bergey, 1934; Buchanan ve Gibbons, 1974; Sneath ve diğ., 1986).

Listeria cinsinin günümüzde 21 adet türü bulunmaktadır ve bu türler *L. monocytogenes* (Pirie, 1940), *L. ivanovii* (Seeliger ve diğ., 1984), *L. innocua* (Seeliger, 1981), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (Rocourt ve Grimont, 1983), *L. grayi* (Errebo Larsen ve Seeliger, 1966), *Listeria rocourtiae* (Leclercq ve diğ., 2010), *Listeria marthii* (Graves ve diğ., 2009), *Listeria weihenstephanensis* (Halter ve diğ., 2013), *Listeria fleischmannii* (Bertsch ve diğ., 2013), *Listeria floridensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* (Bakker, 2014), *Listeria newyorkensis*, *Listeria booriae* (Weller ve diğ., 2015), *Listeria thailandensis* (Leclercq ve diğ., 2019), *Listeria costaricensis* (Nunez-Montero ve diğ., 2018), *Listeria goaensis* (Doijad ve diğ., 2018) ve *Listeria kieliensis* (Schardt, 2018) olarak adlandırılmışlardır. Bu türler içinde insan patojeni olarak en sık rastlanılan türün *L. monocytogenes* olduğu bilinmekle beraber İngilterede *L. ivanovii* kaynaklı iki vaka (Cummins ve diğ., 1994; Lessing ve diğ., 1994) ve *L. seeligeri* kaynaklı bir vaka rapor edilmiştir (Rocourt ve diğ., 1987).

Yüzyıllardır insanlık tarihine damgasını vuran büyük salgınlardan sorumlu bazı patojenik ajanların aksine *L. monocytogenes* ve listeriozis’ in geçmişi, yakın zamanda, I. Dünya Savaşı’ nın sonunda başlar. İnsan listeriozis’ inin ilk tanısı menenjitte yakalanmış bir askerde yapılmıştır (Cotoni, 1942).

L. monocytogenes, somatik (O faktörü) ve flagella (H faktörü) antijenlerine göre farklı virülans potansiyellerine sahip olan 13 farklı serotip içerir. Bunlar; 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, ve 7’dir (McLauchlin, 1987; Graves ve diğ., 1999). İnsan listeriozis’inin *L. monocytogenes*’ in 13 serotipinden kaynaklandığı bilinmekle beraber, vakaların çoğuna serotip 1/2a, 1/2b ve 4b’nin neden olduğu ve en önemli patojenik serotipin ise 4b olduğu saptanmıştır (Liu, 2006). Serotiplerin dağılımı coğrafi bölge farklılıklarına göre değişmektedir. Avrupa’daki listeriozis vakalarının çoğunun serotip 4b kaynaklı, Kanada ve ABD’de ise serotip 1/2a, 1/2b ve 4b’nin eşit bir dağılıma sahip olduğu bilinmektedir (Farber ve Peterkin, 1991). Tablo 2.2’ de *Listeria* serotiplerindeki somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerin dağılımı verilmiştir.

Tablo 2.2: *L. monocytogenes* bakterilerinin somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri (Seeliger ve Jones, 1986).

Serotip	O Antijenleri	H Antijenleri
1/2a	I, II	A, B
1/2b	I, II	A, B, C
1/2c	I, II	B, D
3a	II, IV	A, B
3b	II, IV	A, B, C
3c	II, IV	B, D
4a	(V), VII, IX	A, B, C
4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C
4b	V, VI	A, B, C
4c	V, VII	A, B, C
4d	(V), VI, VIII	A, B, C
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C

2.5. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Listeria cinsi bakteriler sporsuz ve fakültatif anaerop, 1-2 µm uzunluğunda ve 0.5 µm genişliğinde yuvarlak uçlu Gram pozitif çomak şeklinde bakterilerdir. Bu bakteriler bazı kültürlerde iplik benzeri filamentöz formlar şeklinde de bulunabilir (Junttila, 1988; Walker ve Stringer, 1987).

Optimum üreme sıcaklığı 35-37° C olan bu bakteriler, -0.4° C ile 45° C gibi oldukça geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilme yeteneğindedir. Psikrotrof özelliğine sahip olduklarından buzdolabı sıcaklığında da varlıklarını sürdürebilmekte, bu bakterilerin soğutulmuş gıdalarda üreyebilmekte ve halk sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturmaktadır. *Listeria* cinsi bakteriler, 0.90 su aktivitesi seviyelerinde (aw), 4.0 ila 9.6 arasında bir pH aralığında (optimum 6.8) aerobik ve anaerobik koşullarda üreyebilmektedir (Junttila ve diğ., 1988; Walker ve diğ., 1990; Farber ve diğ., 1992; Nørrung, 2000).

37 °C’ de hareketsiz olan *Listeria cinsi bakteriler* 20°C-25°C’ de peritrik flagellaları sayesinde karakteristik özellikleri olan takla atma/yuvarlanma hareketini sergilerler (Gray ve Killinger, 1966; Seeliger ve Hühne, 1979; Peel ve diğ., 1988).

Bu bakterilerin üreme ortamında birincil karbon ve azot kaynağı olarak glikoz ve glutamin gereklidir. Bazı çalışmalarda, bu bakterilerin sistin, lösin, izolösin, arginin, metiyonin, valin, sistein, riboflavin, biyotin, tiamin ve tiyotik asit gibi üreme faktörlerine ihtiyaç duyduğu, üremenin Fe^{+3} ve fenilalanin ile uyarıldığı, virü lent suşlar’ ın demir varlığında avirulent suşlara göre daha hızlı üredikleri tespit edilmiştir (Welshimer, 1963; Ralovich ve diğ., 1977; Cowart ve Foster, 1985; Premaratne ve Johnson, 1991).

L. monocytogenes yapay besiyeri ortamında eskülini hidrolize edebilme yeteneğine sahip olan, Metil kırmızısı, Voges-Proskauer ve katalaz reaksiyonları pozitif; indol, üre, jelatin, nitrat indirgenmesi testleri negatif reaksiyon gösteren Gram pozitif kokobasil bakterilerdir (Fraser ve Spherber, 1988; Müller, 1988; Ryser ve Donnelly, 2001; Lee ve diğ., 2007). *L. monocytogenes* β -hemolitik bir bakteridir. Hemoliz testi, türleri belirleyebilmek için temel ve en zor testlerden birisidir. *L. monocytogenes* koyun, at, inek, domuz yavrusu ve insan kanları için hemolitik aktivite gösterir. *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* dar, hafif açık, *L. ivanovii* geniş, belirgin bir β -hemoliz zonu gösterirken, *L. innocua*, *L. welshimeri*, ve *L. grayi* hemolitik özellik göstermez (Skalka ve Smola, 1982; Skalka ve diğ., 1983; Pongratz ve Seeliger, 1984; Van Der Kelen ve Lindsay, 1990). Tablo 2.3’ te *Listeria* cinsi bakterilerin tür ayırımında kullanılan biyokimyasal özellikleri belirtilmektedir. Bu biyokimyasal özellikler arasından şeker fermentasyonu, β -hemoliz ve CAMP testleri tür tayininde önemli bir rol oynamaktadır (Rocourt, 1999).

Tablo 2.3: *Listeria* cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri (Liu, 2008).

Reaksiyon	Türler ^a					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Gram boyama	+	+	+	+	+	+
Katalaz testi	+	+	+	+	+	+
β -hemoliz	+	++ ^c	-	-	$\pm$	-
Lipaz üretilmesi	+	+	-	-	+	-
Amino asit peptidaz	-	+	+	+	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+	+	+	+	+
β -D glukozidaz	+	+	+	+	+	+
Asit üretimi						
D-mannitol	-	-	-	-	-	+
L-ramnoz	+	-	+	$\pm$	-	$\pm$
D-ksiloz	-	+	-	+	+	-
α -metil D-mannosit	+	-	+	+	$\pm$	$\pm$
CAMP testi^b						
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-

^a+, pozitif reaksiyon; -, negatif reaksiyon; $\pm$, değişken ya da zayıf reaksiyon. ^b Artmış hemoliz reaksiyonu. ^c++, güçlü hemolitik reaksiyon

2.6. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLERİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Çevrede benzer ekolojik nişler içerisinde bulunan *Listeria* cinsi bakteriler, önemli ölçüde morfolojik, biyokimyasal ve moleküler benzerlikler gösterirler. Geniş pH, sıcaklık ve tuz aralıkları gibi zorlu dış koşullara dayanma yetenekleri göz önüne alındığında *Listeria* cinsi bakterilerin çeşitli ortamlarda yayılması, toprak, su, atık sular, gıdalar, hayvanlar ve insanlardan da izole edilmesi şaşırtıcı değildir (Sleator ve diğ., 2003; Liu ve diğ., 2005).

Farklı *Listeria* türleri çeşitli çevresel, gıda ve klinik örneklerinde birlikte bulunduğundan, *L. monocytogenes*' in izolasyonu ve listeriozis tanısı zorlaşmaktadır. Son yıllarda *Listeria* cinsi bakterilerin taksonomik durumunu açıklığa kavuşturmak ve *L. monocytogenes*' i diğer *Listeria* türlerinden kesin bir şekilde ayırt etmek moleküler tekniklerin uygulanmasıyla mümkün kılınmıştır. Bu nedenle *L. monocytogenes* epidemiyolojisinde diğer *Listeria* türlerinden bahsetmemek bu durumun eksik olmasına neden olacaktır.

1920 yılından beri *Listeria* cinsi bakterilerin klinik vakalar ile ilişkisi bilinmekle beraber, birçok listeriozis salgınının meydana geldiği 1980' lerin başına kadar *Listeria* enfeksiyonlarına önem verilmemiştir. Günümüzde yemeye ve ısıtmaya hazır gıdaların artan tüketimi, *L. monocytogenes*' in insanlarda gıda kaynaklı önemli bir patojen olarak değerlendirilmesine neden olmuştur.

L. monocytogenes genellikle hamile kadınlar, yenidoğanlar, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde ciddi hastalıklara neden olabilmektedir. Hastalarda spesifik olmayan kas ve eklem ağrısı, titreme, yorgunluk, baş ağrısı gibi grip benzeri belirtiler görülmekle beraber gastroenterit ile sepsis, menenjit, ensefalit, düşük ve bazı durumlarda ölüm ile sonuçlanan vakalar da bildirilmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Lorber, 1997; Vazquez-Boland ve diğ., 2001). *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis (%0.38), *Campylobacter* (%0.02-0.1) ve *Vibrio* (%0.005- 0.01) türleri gibi yaygın gıda kaynaklı patojenlerden daha yüksek ölüm oranına (%30) sahiptir (Altekruse ve diğ., 1997; Mead ve diğ., 1999).

Listeria cinsi bakteriler genellikle nehir ve körfez suları, kanalizasyon, endüstriyel ve tarımsal atık sularında bulunur. Kirlenmemiş deniz suyu, yeraltı suyu ve kaynaklardan nadiren izole edilir. *Listeria* türleri besin açısından zengin kirli sular, kanalizasyon ve çamur üzerinde geliştikçe, gıda ve insan sağlığı açısından oldukça büyük bir risk oluşturmaya devam etmektedir (Huss ve diğ., 2000; Schaffter ve Parriaux, 2002; Hansen ve diğ., 2006). Atık su ve kanalizasyonun ön arıtımı ile sulardaki besin ve artık kalıntılarını ortadan kaldırmak çiftlikler ve işleme tesislerinde, *Listeria* cinsi bakterilerin daha yavaş üremesine ve riskin azalmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca, çeşitli çevresel örneklerde *Listeria*' nın varlığını izlemek için rutin tarama prosedürlerinin uygulanması, *Listeria* bakterileri kabul edilemez seviyelere ulaştığında derhal düzeltici eylemler sunacak böylece listeriozis' in hayvanlarda ve insanlarda yayılmasını önleyecektir.

Kuzey İtalya'da Luppi ve diğ. (1988) tarafından yapılan bir çalışmada, 50 nehir suyu örneğinden 11 *Listeria* (1 *L. monocytogenes*, 2 *L. seeligeri*, 1 *L. welshimeri* ve 7 *L. innocua*), 80 yüzey suyu örneğinden 12 *Listeria* (1 *L. monocytogenes*, 11 *L. innocua*), 98 yeraltı suyu örneğinden 1 *Listeria* (1 *L. innocua*) ve 33 kentsel kanalizasyon örneğinden ise 14 *Listeria* (8 *L. monocytogenes*, 5 *L. innocua* ve 1 *L. seeligeri*) izole edilmiştir. MacGowan ve diğ. (1994), 115 kanalizasyon örneğinden 108' inin *Listeria* spp. ile kontamine olduğunu ve bunlardan % 60' ının *L. monocytogenes* olduğunu bildirmiştir. Hansen ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada, tatlı su akıntısında *L. monocytogenes* tespit edemediklerini ancak, deniz suyu kullanılan balık çiftliklerinden alınan numunelerin %2' sinde, tatlı su balık çiftliklerinin %10' unda, balık kesimhanelerinin %16' sında ve tütsülenmiş balık restoranlarının %68' inde *L. monocytogenes*' i tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, kirli su ve kanalizasyonun kirlenmemiş suya kıyasla *Listeria* üremesi için uygun bir besin ortamı sağladığından, sudaki *Listeria* oranının hayvan ve insan aktivitesi ile arttığını göstermektedir. Ayrıca *Listeria*, kirlenmemiş sulardaki deniz ürünlerinde nadiren izole edilirken, genellikle yakınlardaki çiftliklerin ve insan yerleşimlerinin bulunduğu sulardan gelen çiğ balık malzemesinde bulunmaktadır.

Rodas-Suarez ve diğ. (2006), Meksika' da 12 aylık bir süre boyunca (Haziran 2001-Mayıs 2002), istiridye, balık ve nehir ağzı su örneklerini incelediği çalışma sonucunda, istiridye örneklerinde *L. monocytogenes*' e rastlamadıklarını, ancak balık örneklerinin 3' ünde (%4.5) ve su örneklerinin 12' sinde (%8.3) *L. monocytogenes* tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Deniz ürünlerini listeriosis salgınları ile ilişkilendiren birçok çalışma bulunmaktadır. İsveç' te *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş "Gravad" gökkuşağı alabalığının tüketimine bağlı olarak meydana gelen 6 listeriosis vakası tanımlanmış ve 2 ölüm meydana geldiği bildirilmiştir (Ericsson ve diğ., 1997). Benzer şekilde, Miettinen ve diğ. (1999), soğuk tütsülenmiş alabalık yiyen beş insanda ateşli gastroenterit vakası bildirmiştir.

Toprakta yetişen sebze ve meyveler, *Listeria*' nın üremesi ve gelişmesi için besin açısından zengin ve ideal bir ortam oluşturur. Weis ve Seeliger, 1970' lerin başında Almanya' da toprakta *Listeria* dağılımı konusunda kapsamlı bir araştırma yapmışlar ve yüzey toprak örneklerinin (mısır ve tahıl tarlaları, ekili ve ekilmemiş alanlar, çayır ve otlaklar, ormanlar ve vahşi yaşam besleme alanları) yaklaşık %20' sinden *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* bakterilerini izole etmişlerdir. Çalışma sonucunda, toprakta ekilmemiş alanlar ve vahşi yaşam

besleme alanlarında yaygın olan serotip 1/2a' ya ek olarak, tüm toprak örneklerinde en baskın serotipin 1/2b ve 4b olduğu bulunmuştur (Weis ve Seeliger, 1975). Yapılan başka bir çalışmada depolanmış sıvı gübre ve gübreli toprak örneklerinde *L. monocytogenes* tespit edilemediği, fakat taze domuz dışkısının %16' sının, taze sığır dışkısının %20' sinin ve yeraltı suyu örneklerinin %5' inin *L. monocytogenes* içerdiği bildirilmiştir (Renterghem ve diğ., 1991).

MacGowan ve diğ. (1994) İngiltere' de yapmış oldukları çalışmada, 130 toprak örneğinin 20' sinde (%14.7) *Listeria* bulunduğunu, fekal örneklerde *L. monocytogenes* ve *L. innocua*, toprak örneklerinde ise *L. ivanovii* ve *L. seeligeri*' nin baskın olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular, *Listeria* cinsi bakterilerin genellikle saprofit olarak yaşadığı toprakta yaklaşık %20' lik bir oranda bulunabileceğinin bir göstergesidir.

Çalışmalar, *Listeria* türlerinin kirlenmemiş deniz suyu, yeraltı suyu ve kaynaklarda nadir, toprak, bitki örtüsü ve kanalizasyonda yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. *Listeria* bulunma oranı genellikle hayvan ve insan aktivitesinin arttığı yerlerde yükselmektedir. *L. monocytogenes* ve *L. innocua*, çevreden daha sık izole edilir, bunu *L. seeligeri*, *L. ivanovii* ve *L. welshimeri* takip eder ancak *L. grayi*' nin çevre örneklerinden izolasyonu nadiren bildirilmektedir (Liu, 2008).

İlk belgelenmiş gıda kaynaklı listeriosis salgınının 1979 yılında Boston' da bir hastanede meydana geldiği, salgının kaynağının da yine aynı hastanede hazırlanan *L. monocytogenes* 4b serotipi ile kontamine sebzeler olduğu tespit edilmiştir (Ho ve diğ., 1986). 1981 yılında ise Kanada' da lahana salatası kaynaklı listeriosis salgını meydana gelmiştir (Schlech ve diğ., 1983). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, *Listeria*' nın bitki-toprak ortamlarında yaşamlarını sürdürme ve üreme kapasitesine sahip serbest yaşayan mikroorganizmalar olduğu fikrini güçlendirmektedir.

Çevrede yaygın olan *Listeria* cinsi bakteriler kirli su, toprak, bitki örtüsü ve gıdalarda gelişir. Bu durum hayvancılık için önemli bir sorun teşkil etmektedir. Hayvanlar genellikle kontamine yem, silaj, otlar ve su yoluyla *Listeria* ile enfekte olurlar. *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* türlerinin, yaban hayatı ve evcil hayvanlardan sıklıkla izole edildiği ve *Listeria* ile ilişkili düşük ve ölü doğum gibi hayvan hastalıklarından sorumlu oldukları gösterilmiştir (Low ve Donachie, 1997). Brezilya' da yapılan bir çalışmada, bir kümes hayvanı işleme

tesisinde bitki yüzeyleri, su ve kümes hayvanı ürünlerinden toplanan 645 örneğin 230' unda (%35.6) *L. monocytogenes* saptandığı, tavuk göğsü ve kanatlarının, tavuk butlarına göre *L. monocytogenes* ile daha yüksek oranda kontamine olduğunu tespit edilmiştir (Reiter ve diğ., 2005). Ayrıca, Capita ve diğ. (2001), marketlerden satın aldıkları taze tavuk karkaslarının *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* ve *L. ivanovii* ile kontamine olduğunu, kontaminasyon yüzdelerinin ise sırasıyla %95, %32, %66, %7,%4 ve %2 olduğunu tespit etmişlerdir.

Et ürünleri dünya çapında birçok önemli listeriozis salgını ile ilişkilendirilmiştir. İngiltere' de 1989 ve 1990 yıllarında pate tüketimi ile bağlantılı 300 insanı etkileyen listeriozis salgını meydana gelmiştir (McLauchlin ve diğ., 1991). 1998' de Amerika Birleşik Devletleri' nde *L. monocytogenes* ile kontamine soslu sandviç tüketimine bağlı yaklaşık 100 listeriozis vakası ortaya çıkmıştır (Evans ve diğ., 2004). Yine 1998 yılında kontamine et tüketimi nedeni ile toplam 108 vakayı içeren bir listeriozis salgını meydana gelmiş, 14'ü ölüm, 4'ü düşük veya ölü doğum ile sonuçlanmıştır (Mead ve diğ., 2005). Seattle, Washington' daki pazarlardan alınan 1750 kıyma örneğinden 18' inin (%3.5) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu saptanmıştır (Samadpour ve diğ., 2006). Dört farklı ülkeden alınan toplam 1186 sığır eti örneklerinin (ABD, 487 adet; Avustralya, 220 adet; Yeni Zelanda, 223 adet; Uruguay 256 adet) incelendiği başka bir çalışmada ise örneklerin 79' undan (ABD, 17; Avustralya, 4; Yeni Zelanda, 5; Uruguay, 53) *L. monocytogenes* izole edildiği tespit edilmiştir (Bosilevac ve diğ., 2007).

L. monocytogenes gıda işleme tezgahlarının, makinelerinin ve zeminlerinin yüzeylerine kolayca yapışmakta ve zamanla olumsuz koşullara karşı artan dirence sahip biyofilm tabakası oluşturmaktadır (Blackman ve diğ., 1996). Özellikle *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b ve 1/2c serotipleri et işleme tesislerinden daha sık izole edildikleri nedeniyle bu ortamlara daha iyi adapte oldukları tespit edilmiştir (Jay, 1996; Norwood ve Gilmour, 2000; Autio, 2002; Thevenot, 2005). Chae ve Schraft (2000) tarafından yapılan çalışmada, bazı *L. monocytogenes* suşlarının diğerlerine göre olgun bir biyofilm oluşturma kapasitesinin yüksek olduğunu ve başka bir çalışmada ise serotip 1/2e' nin diğer serotiplere göre paslanmaz çelik yüzeylere yapışmaya daha meyilli olduğu gösterilmiştir (Norwood ve Gilmour, 2000).

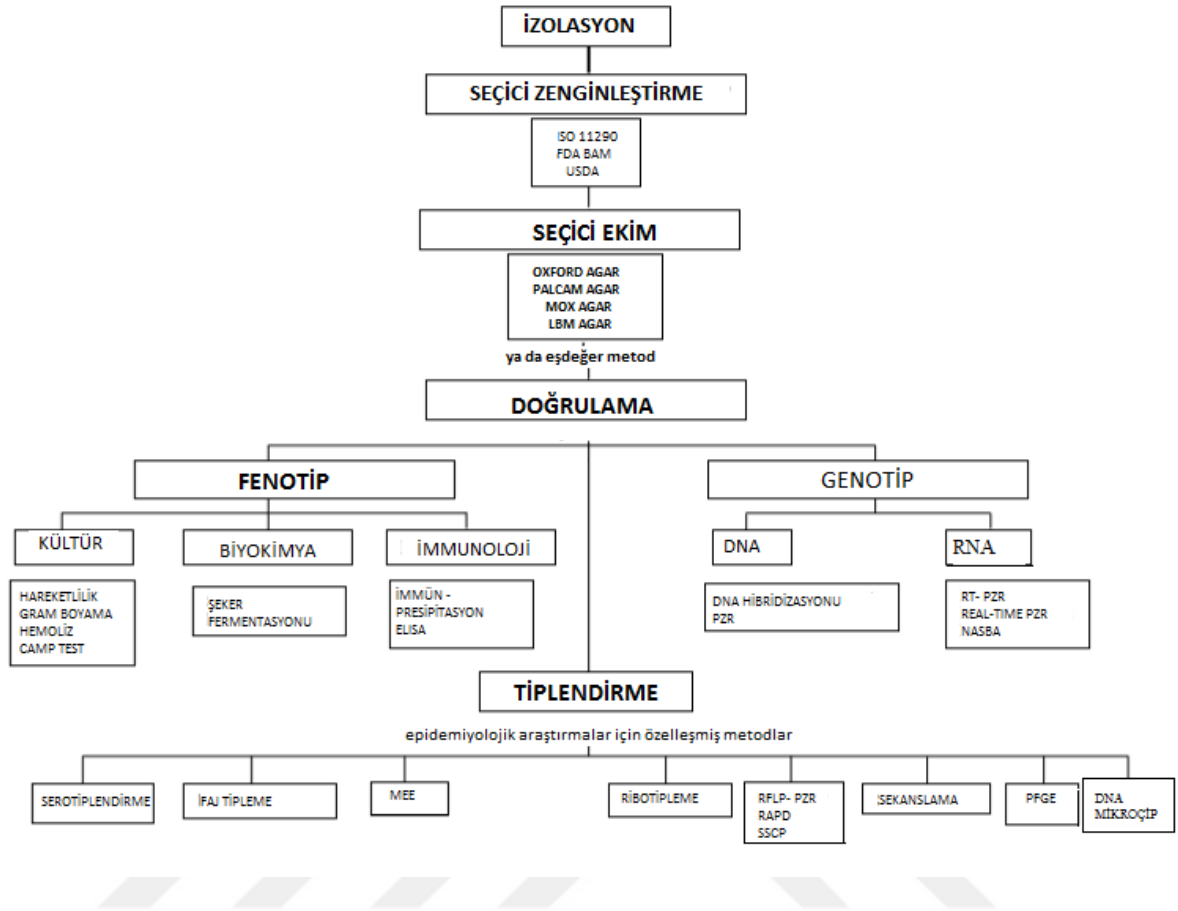
Listeriozis salgınları süt ürünlerinin tüketimine bağlı olarak da görülmektedir. 1983 yılında Boston' daki 49 listeriozis vakasından pastörize sütün sorumlu olduğu (Fleming ve diğ.,

1985), 1994 yılında 45 *Listeria* ile ilişkili gastroenterit vakasında ise kontaminasyon kaynağının çikolatalı süt olduğu bildirilmiştir (Dalton ve diğ., 1997). Ayrıca, Meksika tipi bir peynir tüketimi 1985 yılında Kaliforniya’ da 142 vakalı listeriosis salgınına yol açarken (Linnan ve diğ., 1988), ‘Vacherin Mont d'Or’ peyniri İsviçre’ de 122 listeriosis vakasına neden olmuştur (Bille ve diğ., 2006).

Yemeye hazır (Ready to eat, RTE) gıdalar daha fazla işlem yapılmadan tüketilebilecek önceden işlenmiş balık, et ve sebzeleri kapsar. Birçok RTE gıdası (örn. soğuk tütülenmiş balık) %2-5 NaCl içerir. RTE gıdaları genellikle düşük sıcaklıklarda (4 ve -20°C) tutulmasına rağmen, 4°C’ de depolama sırasında *L. monocytogenes*’ in hayatta kalması ve üremesi büyük ölçüde engellenmez. Bu nedenle RTE gıdaları *L. monocytogenes* üremesini destekleyici mükemmel bir ortam sunar. Van Coillie ve diğ. (2004), Belçika’ da 252 RTE gıda ürününü *L. monocytogenes* varlığı açısından incelemiş, kıyma ve trança balığının *L. monocytogenes* ile yüksek derecede kontamine olduğunu, kıymaların *L. monocytogenes*’ in yanı sıra *L. innocua* ve *L. welshimeri* ile de kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, yapılan PZR analizi sonucunda, izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının çoğunun serotip 1/2a (3a) grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Angelidis ve Koutsoumanis (2006), perakende pazarlarından alınan 209 RTE et ürününün 17’ sinden, Çinde yapılan bir çalışmada ise 844 RTE gıda örneğinin 21’ inden *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmiştir (Zhou ve Jiou, 2006).

2.7. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLERİN TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

L. monocytogenes, gıda kaynaklı önemli bir patojendir ve gıda, çevresel ve klinik örneklerde yaygın olarak test edilir. Şekil 2.1’ de *L. monocytogenes* bakterilerinin tespitinde kullanılan çeşitli yöntemler gösterilmiştir.



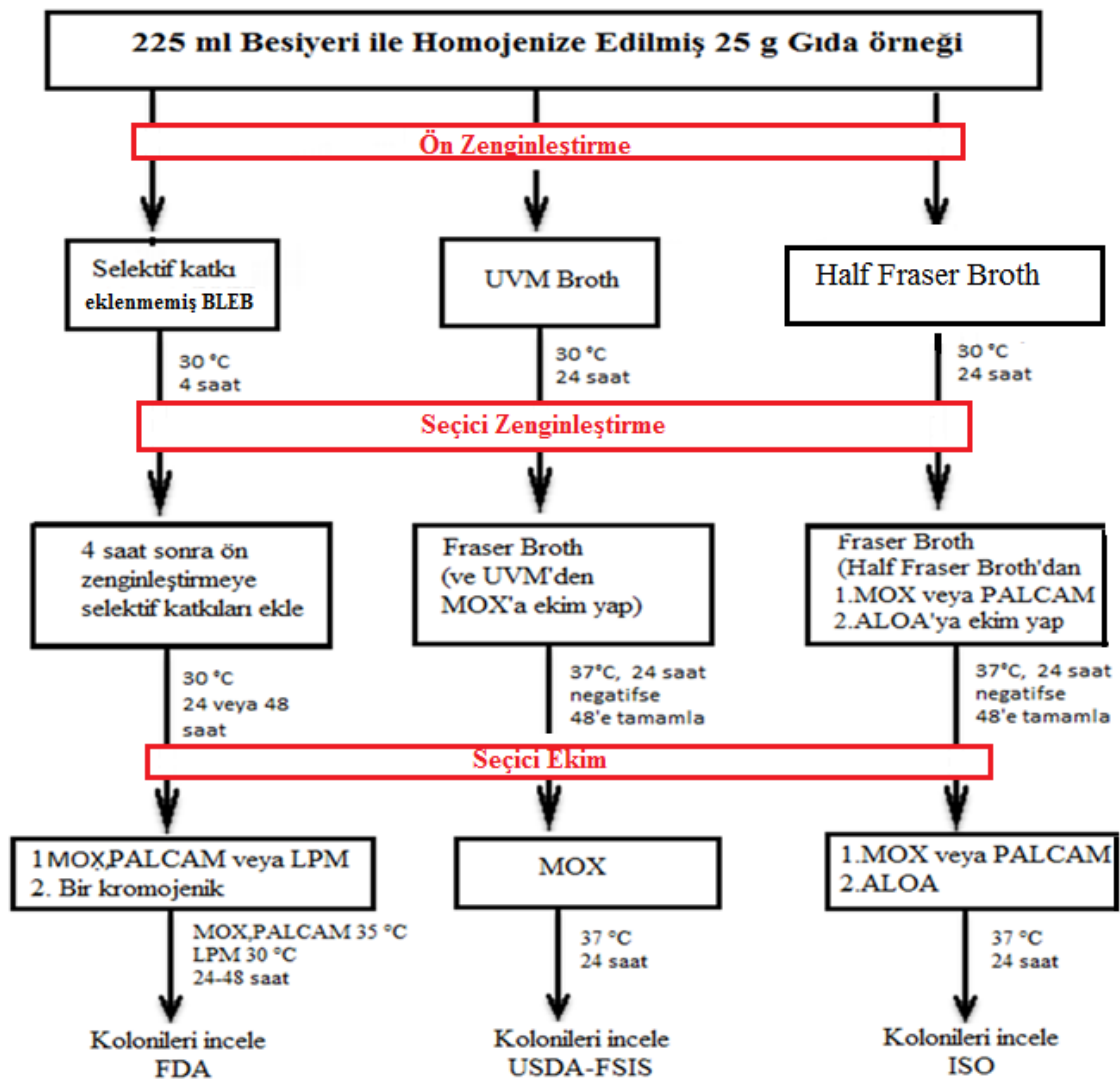
Şekil 2.1: Gıda ve çevre örneklerinde *Listeria* ve *L. monocytogenes* için izolasyon, tanımlama ve tiplendirme yöntemlerine genel bakış (Gasanov ve diğ., 2005).

L. monocytogenes cinsi bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu, genel olarak, ön zenginleştirme, seçici zenginleştirme ve seçici ekim aşamalarını içeren ve *Listeria* spp. karakterizasyonu için koloni morfolojisi, şeker fermentasyonu ve hemolitik özelliklere göre inceleme yapılan geleneksel kültür yöntemlerine dayalıdır. Bu yöntemler altın standart olarak isimlendirilir; ancak bu yöntemlerde toplam izolasyon süresi uzundur ve kısa raf ömrüne sahip gıdaların testi için uygun olmayabilir. Bu nedenle, antikorlar (ELISA) veya moleküler tekniklere (PZR veya DNA hibridizasyonu vb.) dayalı daha hızlı testler geliştirilmiştir. Bu testler eşit duyarlılığa sahip olmakla birlikte hızlı sonuç verirler, 48 saat içinde testin tamamlanmasını sağlarlar. Bunun yanı sıra Ters Transkripsiyon-PZR (RT-PZR), gerçek zamanlı PZR veya Nükleik Asit Bazlı Sekans Amplifikasyonu (NASBA) gibi DNA yerine RNA'yı hedefleyen moleküler yöntemler de geliştirilmiştir. Bu testler hem hücre canlılığının

ölçülmesinde hem de kantitatif analiz için kullanılabilirler. Aynı zamanda, epidemiyolojik araştırmalarda alt tür karakterizasyonu için yararlı olan çeşitli testler de mevcuttur.

2.7.1. Geleneksel Kültür Yöntemleri

Düzenleyici kurum ve kuruluşlar tarafından *L. monocytogenes*' in zenginleştirme ve izolasyonu için tasarlanmış çeşitli resmi standartlaştırılmış protokoller ve ayrıca özel bileşenler içeren besiyerleri kullanan ticari zenginleştirme protokolleri vardır. Bu resmi protokollerden üçü Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2: *L. monocytogenes* için standartlaştırılmış bazı zenginleştirme ve izolasyon protokolleri (Liu, 2008).

Süt ve süt ürünleri, deniz ürünleri ve sebzelerde *L. monocytogenes* tespiti ve sayımı için Lovett tarafından oluşturulan ve değişik varyasyonlara uğramış güncel FDA protokolü kullanılmaktadır (Lovett, 1988).

FDA protokolü, 4 saat boyunca seçici bileşik içermeyen bir ön zenginleştirme aşaması ile başlar. İnkübasyondan dört saat sonra gerçek seçici zenginleştirme, seçici olmayan ön zenginleştirme kültürüne seçici katkıların (akriflavin, nalidiksik asit, isteğe bağlı antifungal, örn., sikloheksimid) eklenmesiyle başlatılır.

Her iki aşama da Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) besiyerinde gerçekleşir. BLEB besiyeri, University of Vermont broth (UVM) ve Half Fraser broth besiyerine benzer şekilde düşük miktarda akriflavin, diğerlerinden daha yüksek miktarlarda nalidiksik asit içerir.

FDA protokolü, eskülin temelli besiyeri ortamları çeşitliliğine sahiptir. Bu besiyerleri, Oxford Agar (OXA), Polymyxin-Acriflavin Lithium Chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol Agar (PALCAM), Modified Oxford Agar (MOX) ve Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam (LPM)' dir. Bununla birlikte, LPM kullanılırsa normal bileşimin bir parçası olmadığı için eskülin ve ferrik demir ayrıca eklenmelidir. *L. innocua*' nın üremesinin *L. monocytogenes* üremesinin önüne geçmesini engelleyebilmek için bu besiyerlerinin yanı sıra Biosynth Chromogenic Medium (BCM), Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA), Rapid L'mono, veya CHROM agar *Listeria* gibi kromojenik agarlara da ekim yapılması önerilmektedir (Hitchins ve diğ., 2017).

USDA protokolü, et ve kümes hayvanı ürünlerinde *L. monocytogenes*' i tespit etmek amacıyla Lee ve McClain tarafından geliştirilmiştir (Lee ve McClain, 1986; McClain ve Lee, 1988). USDA protokolü, ön ve seçici zenginleştirmelerin sadece MOX agar üzerine ekimini gerektirmektedir. Orijinal USDA prosedürü, 3 gün içinde *L. monocytogenes* tespitini mümkün kılmıştır. USDA-FSIS, orijinal prosedürde birkaç değişiklik yapılmasını önermiştir. Bu revize edilmiş yöntem, selektif katkıları (akriflavin ve nalidiksik asit) içeren modifiye edilmiş UVM, selektif katkıları (akriflavin, nalidiksik asit ve ferrik amonyum sitrat) içeren Fraser broth (FB), selektif katkıları (sikloheksimit, kolistin sülfat, sefotetan, fosfomisin, akriflavin) içeren Modified Oxford Agar (MOX), Horse Blood Overlay Agar (HL, aynı zamanda HBO olarak da bilinir), %5 koyun kanlı Triptik Soy Agar ve Brain Heart Infusion (BHI) broth besiyerlerini içermektedir. 2002 yılından beri kırmızı et, kümes hayvanları, yumurta ve

çevresel numunelerden *L. monocytogenes*' i izole etmek ve tanımlamak için USDA-FSIS yöntemi kullanılmaktadır (USDA, 2013).

Çeşitli gıdalarda *L. monocytogenes* izolasyonunu gerçekleştirebilmek için günümüzde yaygın olarak ISO 11290 protokolü kullanılmaktadır. Bu yöntemde; ortamda mevcut olan diğer bakterilerin üremesini engellemek için ön zenginleştirme aşamasına ek olarak seçici zenginleştirme aşaması da kullanılır. *L. innocua* ve diğer bakterilerin üremesinin *L. monocytogenes* üremesinin önüne geçmesinin engellenmesi için ön zenginleştirme besiyeri olan Half- Fraser sıvı besiyerine, katkılardan (akriflavin ve nalidiksik asit) Fraser broth besiyerine katılan oranın yarısı olacak şekilde eklenir. Seçici zenginleştirme besiyeri olarak Fraser Broth besiyerine selektif katkılar normal oranda katılır. İnkübasyon süresi sonunda eskülin hidrolizine bağlı olarak zenginleştirme sıvı besiyeri bulunan tüplerde siyahlaşma meydana gelirse *L. monocytogenes* şüpheli olarak kabul edilir. Rengi siyaha dönen kültürden bir öze dolusu alınarak yöntemde tavsiye edilen ALOA ve başka bir seçici besiyerine ekim gerçekleştirilir. ISO protokolünde ALOA' ya ek olarak PALCAM veya MOX üzerine ekim yapılmasını da gerektirir. ALOA için 37 °C' de 48 saat, diğer seçici besiyeri ise üreticinin tavsiye ettiği zaman ve sıcaklığa göre inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda, ALOA besiyerinde mavi-yeşil renkli yuvarlak ve etrafında şeffaf lipoliz zonu bulunan koloniler *L. monocytogenes* şüpheli olarak kabul edilip seçici olmayan Kanlı Agar, Nutrient Agar ya da TSA-YE besiyerlerinden uygun olana ekimi yapılır (ISO, 2017).

USDA-FSIS ve ISO protokolleri, seçici ortama ekilmeden önce ön ve seçici zenginleştirme kullanır. Her iki durumda da seçici zenginleştirme besiyeri Fraser broth' dur. Her ikisi için ön zenginleştirme ortamı (USDA-FSIS yönteminde UVM ve ISO yönteminde Half Fraser broth), seçici zenginleştirme besiyerinden daha düşük inhibitör konsantrasyonları içerir. Dolayısıyla seçici zenginleştirme daha seçicidir, bu da zenginleştirme ilerledikçe *L. monocytogenes* için ayırımın daha güçlü olmasını sağlar. Hem FDA hem de ISO yöntemleri, *L. monocytogenes* izolasyonu şansını arttıran iki farklı seçici besiyeri üzerine ekim yapılmasını gerektirir.

2.7.2. Hızlı Tanı Yöntemleri

Hızlı Tanı Kitleri

L. monocytogenes'in identifikasyonu için klasik yöntemler dışında hızlı sonuç alınabilen ticari test ürünleride vardır. Hızlı tanı kitleri, pozitif veya negatif reaksiyonun nasıl tespit edilmesi

gerektiğini belirlerler. Sonuçlar, kit tipine bağlı olarak renk değişimi, spektrofotometrik veya aglütinasyonun görsel olarak tespiti ile belirlenir. Ticari olarak desteklenen hızlı test kitlerinin standardizasyon, kitlerin kullanılabilirliğinin yüksek ve basit olması, düşük maliyetli olmaları, gibi avantajları bulunmaktadır (Norton, 2002).

Bu ticari test ürünlerinden bazıları; EIAFoss *Listeria* (Foss North America, Inc.), ISO-GRID (QA Life Sciences, Inc.), *Listeria* Rapid Test (Oxoid, Inc.), *Listeria*-Tek™ (Organon Teknika Corp.), Microbact 12L (BioControl Systems, Inc.), MICRO-ID *Listeria* (Remel), Probelia PCR System (BioControl Systems, Inc.), Reveal® for *Listeria* (Neogen Corporation), Vidas LIS (BioMérieux Inc.), Vidas LMO (BioMérieux Inc.), VIP for *Listeria* (Visual BioControl Systems, Inc.), Dynabeads anti-*Listeria* (Dynal Inc.)'dır (Alden ve diğ., 1990).

Latex Aglütinasyon Testi

Lateks aglütinasyon kitlerinde antiserumlarla kaplı lateks parçacıkları kullanılır. Koloni materyali, zenginleştirme kültürleri veya saf kültürler koyu renkli bir kartta lateks parçacıkları ile karıştırılır. Antijenler varsa, beyaz lateks parçacıklarının aglutine olmasına ve görünür beyaz kümeler oluşturmaya neden olan antikorlara bağlanırlar. Bu reaksiyon sadece birkaç dakika sürmektedir (Liu, 2008).

Latex aglütinasyon testi kullanılarak, listeriozis hastalarının buzdolaplarından alınmış peynir ve et örneklerinin çoğunlukta olduğu ve toplamda 208 gıda örneğinin incelendiği bir çalışmada 17 örneğin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu bulunmuştur (Matar ve diğ.,1997).

Serotipleme

Serotipleme, *Salmonella* ve patojenik *Escherichia coli* gibi Gram negatif patojenlerin alt tiplendirilmesinde kullanılan en yaygın fenotipik yöntemlerden biri ve *L. monocytogenes* epidemiyolojik çalışmaları için de önemli bir araçtır. Serotipleme, somatik (O), kapsüller (K) ve flagellar (H) antijenleri dahil olmak üzere hücre yüzeylerindeki antijenik varyasyonları hedefler. Serotiplemenin başlıca dezavantajı, poliklonal veya monoklonal antiserumların korunması ve işlemesi gerekliliği nedeniyle pahalı ve zaman alıcı olmasıdır. Serotiplemeyle ilişkili bir başka sorun, farklı suşlardan gelen antijenlerin farklı antikorlarla çapraz reaksiyona girebilmesidir ve bazı suşlar, antijenleri eksprese etmeyebilirler (Riley, 2004).

Bununla birlikte, serotipleme *L. monocytogenes* alt tipleri için oldukça iyi bir performans göstermiştir. McLauchlin ve Jones (1998), O antijen ve H antijen yapılarının kombinasyonuna dayanan 13 serotip (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e,7) ile tanımlanan *L. monocytogenes* için standart bir serotipleme protokolü geliştirmişlerdir. Serotipleme salgınlarda yer alan *L. monocytogenes* suşlarının izlenmesi için yararlı olabilir.

Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

ELISA, bir numunede antikor veya antijenin varlığını tespit edebilmek için enzim aktivitesinin değerlendirilmesine dayanan immünolojik bir yöntemdir. En fazla tercih edilen şeklinin sandviç ELISA olmasının yanı sıra direkt ve indirekt ELISA yöntemleri de kullanılmaktadır (Fung, 2009). Yüksek hassasiyet ve otomasyona uygun olan ELISA, PZR ürünlerinin tespiti için de uyarlanmıştır (Scheu ve diğ., 1999; Kerdahi ve Istafanos 2000; Garrec ve diğ., 2003). Yapılan bir çalışmada Palumbo ve diğ., (2003) çeşitli gıdalardan, çevreden ve insanlardan izole ettikleri *L. monocytogenes* suşlarını ELISA yöntemi kullanarak serotiplendirmiştir.

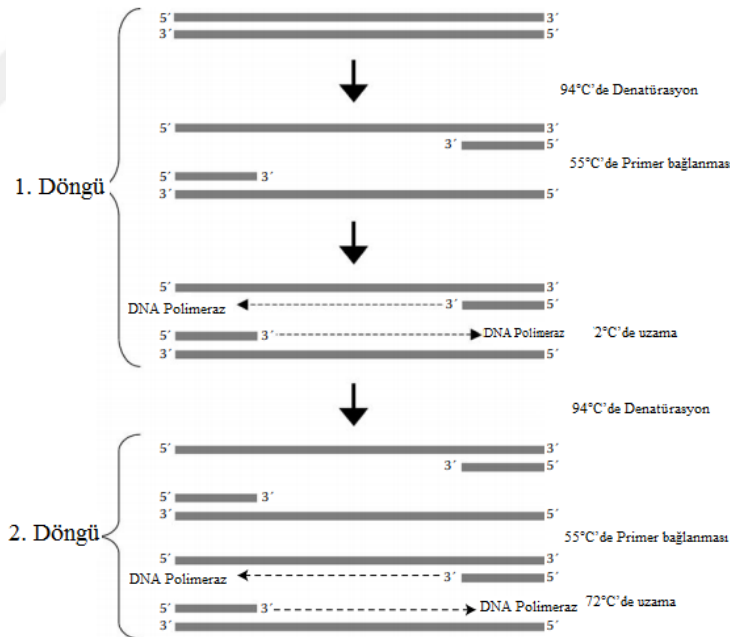
İmmünomanyetik Ayırma (IMS)

İmmünomanyetik Ayırma (IMS) yönteminde, mikro ölçekli manyetik boncuklar spesifik patojenleri hedefleyen antikorlarla kaplanır. Bu boncuklar, hedef patojenleri içeren bir numune ile karıştırılarak patojen bakterilerin bağlanması sağlanır. Boncuklar daha sonra harici bir manyetik alan uygulanarak çıkartılabilir ve konsantre edilebilirler. Bu şekilde, hedef patojenler numuneden izole edilir ve FISH (Cho ve diğ., 2014) veya akış sitometrisi (Seo ve diğ., 1998) gibi teknikler kullanılarak tespit edilebilirler. İmmünomanyetik ayırma teknikleri günümüzde gıda ve patojen bakterilerin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılır (Safarik ve diğ., 1995). IMS tekniklerinin kullanımının toplam test süresini azalttığı ve gıdalar üzerinde yapılan mikrobiyolojik testlerin duyarlılığını artırdığı bildirilmiştir. Fluit ve diğ. (1993), peynirde *L. monocytogenes* saptanması için IMS ve PZR' yi birleştirmiştir. Ticari bir immünomanyetik ayırma sistemi (VICAM Listertest, Vicam, Sommerville, ABD), zenginleştirme sonrasında gıda örneklerinde *Listeria* cinsi bakterilerin tespit edilmesini sağlamıştır (Betts, 1994).

2.7.3. Genotipik Yöntemler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR yöntemi, hem araştırma hem de klinik laboratuvarlarda ilk tercih edilen ve en yaygın olarak uygulanan yöntemdir. En basit haliyle, PZR amplifikasyonu, belirli bir DNA dizisinin oligonükleotid primerler kullanılarak ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz yardımı ile çoğaltılıp kopyalarının elde edilmesidir. PZR amplifikasyon işlemi genellikle, çift iplikli DNA' yı tek iplikli hale dönüştürmek için yüksek sıcaklıkta (94°C) başlar, bunu takiben tek iplikçikli primer ile tek iplikçikli şablon arasındaki bağlanmaya olanak tanınması için nispeten düşük bir sıcaklıkta (55° C) ve daha sonra şablon boyunca uzanan DNA polimerazın etkinleştirilmesi için 72° C' de devam eder. Tüm denatürasyon, bağlanma ve uzatma işlemi 25-30 kez tekrarlanır, böylece DNA şablonunun bir kopyası 3-4 saat içinde milyarlarca kopyaya dönüştürülür (Liu, 2008). Şekil 2.3' de PZR uygulamasının temel aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Polimeraz zincir reaksiyonuna şematik bakış (Liu, 2008).

Kocaman ve Sarımeahmetoğlu (2017) yaptıkları çalışmada, PZR yöntemi ile 120 çiğ kuzu eti örneğinden 19'unun *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. PZR yönteminin kullanıldığı başka bir çalışmada (Azak ve diğ., 2012) ise 100 adet tulum peyniri örneği incelenmiş ve örneklerin %3'ünde *L. monocytogenes* bulunduğu bildirilmiştir.

Multiplex PZR

Geleneksel PZR' nin başka bir uyarlaması olarak multipleks PZR, aynı tüpteki farklı hedefler için spesifik iki veya daha fazla primer çifti seti sunar, bu da aynı anda birden fazla gen ürününün amplifikasyonu ile sonuçlanır. Bu modifikasyon, tek bir örnekten farklı patojenleri tespit etmeyi mümkün kılar. Orijinal formatında, multipleks PZR' den amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrılır ve bir boya ile görselleştirilir. Bununla birlikte, farklı floresan boyaların tek tek gen primer bölgelerine dahil edilmesiyle, multipleks PZR ürünlerinin uygun, gerçek zamanlı bir şekilde saptanması mümkündür. Örneğin, yüksek oranda korunmuş *Listeria 23S rRNA* geni ve *L. monocytogenes*' e özgü *hly* geni, tamamlayıcı primerler kullanarak, her iki *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* bakterileri gerçek zamanlı PZR ile eşzamanlı olarak ayırt edilebilir (Rodriguez-Lazaro, 2004).

Bununla birlikte, aynı tüpe birkaç primer çiftinin dahil edildiği göz önüne alındığında, bu primerlerin benzer bağlanma sıcaklıklarını paylaşmasını ve multipleks PZR formatında birbirini etkilememesini sağlamak için primerlerin ampirik olarak dikkatlice tasarlanması ve optimize edilmesi gereklidir (Lawrence ve Gilmour, 1994; Hsih ve Tsen, 2001; Kanuganti ve diğ., 2002; Borucki ve Call, 2003; Alarcon ve diğ., 2004; Doumith ve diğ., 2004a; Doumith ve diğ., 2004b; Jofre ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2006; Park ve diğ., 2006).

180 hindi eti örneğinin incelediği bir çalışmada Erol ve Ayaz (2011) izole edilen 37 *L. monocytogenes* bakterisinin serotiplendirmesini multiplex PZR yöntemi kullanarak gerçekleştirmiş ve yaz aylarında toplanmış olan örneklerdeki baskın serotipin 1/2a and 4b olduğunu, kış aylarında toplanan örneklerdeki baskın olan serotipin ise 4b olduğu tespit etmişlerdir.

Ters Transkripsiyon-PZR (RT-PZR)

Geleneksel PZR' de olduğu gibi DNA' yı hedeflemek yerine RT-PZR, tamamlayıcı bir primer varlığında kopyalanmış bir gene karşılık gelen bir haberci RNA (mRNA) şablonundan tamamlayıcı DNA (cDNA) oluşturmak için bir reverse transkriptazın avantajını kullanır. Daha sonra cDNA, normal PZR koşulları altında oligonükleotid primerleri ve DNA polimeraz kullanılarak çoğaltılır. RT-PZR, çok az sayıdaki mRNA molekülünün çoğaltılabildiği ve tespit edilebildiği oldukça hassas yöntemdir. Yapılan bir çalışmada, *L. monocytogenes*

bakterisi ile yapay olarak kontamine edilmiş tavuk eti örneklerinde RT-PZR yöntemi ile bu bakterinin tespiti yapılmıştır (Navas ve diğ., 2005).

DNA Mikrodizilimi

DNA mikrodizilimi, hibridizasyon tabanlı dizi teknolojisinin bir uzantısıdır. Mikroorganizmaların moleküler alt tiplerleri için güçlü bir araçtır. Binlerce oligonükleotid probu, tüm genom dizilerine dayanarak tasarlanır ve cam, plastik ve silikon gibi küçük katı yüzeylere tespit edilir (Liu, 2008).

Bilinmeyen izolatların genomik DNA'sı elde edilir, etiketlenir ve oligonükleotid dizisine hibridize edilir. DNA mikrodizileri, her bir suşa özgü sekansların tanımlanmasına izin veren oligonükleotid problemlerini tamamlayıcı olan genomik bölgelerin varlığını veya yokluğunu tespit edebilir. Oligonükleotid problemlerinin uzunluğu, hedeflenen farklı markerlara bağlı olarak değişebilir. Örneğin, oligonükleotidlerin uzunlukları yeterince küçükse, mikrodiziler tek nükleotid mutasyonlarını tespit edebilir. Mikrodizilerin diğer yöntemlere göre en büyük avantajı, birçok izolatın tüm genomları boyunca aynı anda varyasyonları (insersiyon ve delesyon) tespit edebilmeleridir. Mikrodiziler, moleküler sınıflandırma ve genomik mutasyon çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu, 2008).

Floresan Yerde Hibridizasyon (FISH)

FISH yöntemi, bir kromozom dağılımında spesifik bir tamamlayıcı dizinin tanımlanmasında bir nükleik asit probunun etiketlenmesi için bir floresan molekülü kullanan gen probu hibridizasyonunun bir başka çeşididir, böylece bu alan bir mikroskop altında görünür hale gelir. FISH genlerin, tüm kromozomların veya spesifik DNA dizilerinin konumlarını vurgulamak ve ayrıca bakteri izolatlarının filogenetik durumunu açıklamak için yararlıdır. FISH yöntemini gerçekleştirmek için örnek, etanol kullanılarak bir lam, membran filtre veya kuyuya sabitlenir. *L. monocytogenes* gibi Gram-pozitif organizmalar ile çalışıldığı durumlarda, sabit hücreler proteinaz K ile geçirgen hale getirilir, böylece floresan problemlerin hücre içine girmesi sağlanır. Patojen DNA' yı tamamlayıcı olan ve Cy3, Cy5 veya CFLUOS gibi bir floresan boya ile etiketlenmiş spesifik problemler oluşturulur. Sabit hücreler, tamamlayıcı dizileri bağlayacak floresan etiketli problemlerle inkübe edilir. Etiketlenmiş hücreler daha sonra bir floresan mikroskobu altında görselleştirilir. *16S rRNA* genlerine özgü etiketli primerler

kullanılarak, *Listeria* bakterilerini cins ve tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tayin etmek mümkündür (Wagner ve diğ., 1998; Schmid ve diğ., 2003).

Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)

Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE), büyük DNA moleküllerinin özgün restriksiyon ile sindirildikten ve periyodik olarak yönü değiştiren elektrik alanı altında bir jel matrisine uygulandıktan sonra ayrılması için kullanılan güçlü bir genotipleme tekniğidir (Sharma-Kuinkel ve diğ., 2016). PFGE, büyük DNA fragmanlarının (10-2000 kb) ayrılmasına izin verir (Finney, 2000). DNA fragmanları, her bir nükleotit üzerindeki parçası nedeniyle boyutlarıyla orantılı olarak genel bir negatif yüke sahiptir. Jel içindeki bir DNA örneğine bir elektrik akımı uygulandığında, DNA pozitif elektroda (anot) doğru hareket eder. Jel matrisi bir elek görevi gördüğünden, hareketlerinde daha büyük DNA parçaları geciktirilirken, daha küçük parçalar boşluklardan daha kolay geçer ve jel üzerinde daha fazla ilerler. Normal bir agaroz jelde, etkili bir şekilde ayrılabilen en büyük DNA boyutu 20 ila 40 kb arasındadır. Bu boyutun üstünde DNA fragmanları elek boyunca sıkışabilen bir şekle getirilmelidir bu da daha sonra tüm büyük parçaların aynı oranda göç etmesini sağlar. PFGE, daha fazla ayrılma için temel olarak büyük DNA fragmanlarının hareket için uzun şekillerine sıkıştırılması için geçen süreden yararlanır. Bu işlem daha büyük DNA fragmanlarında daha uzun sürer (Liu, 2008). Chou ve Wang (2006), deniz ürünlerinden izole edilen *L. monocytogenes* izolatları ve insanlar arasındaki ilişkiyi PFGE yöntemi kullanarak incelemiştir.

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

AFLP ilk olarak Vos ve diğ. (1995) tarafından tarif edilen oldukça ayırt edici bir alt tiplendirme yöntemidir. AFLP ile genomik DNA saflaştırılıp, restriksiyon enzimi ile muamele edilmesinin ardından elde edilen parçaların daha sonra seçici olarak çoğaltılmasına dayanan bir DNA parmak izi tekniğidir (Aarts ve diğ., 1999). Ripabelli ve diğ. (2000) ve Guerra ve diğ. (2002), *L. monocytogenes* alt tiplendirilmesi için AFLP şemaları geliştirmişler ve yeterince ayırt edici olmamasına rağmen AFLP sonuçlarının serotipleme, faj tiplendirmesi ve diğer alt tiplendirme yöntemleriyle uyumlu olduğunu bulmuşlardır. Vogel ve diğ. (2004) gıda ve klinik örneklerden elde ettikleri 96 farklı *L. monocytogenes* suşlarının ayrımını AFLP yöntemini kullanarak yapmıştır.

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) analizi, genetik profillerdeki farklılıkları belirlemek için DNA'daki restriksiyon endonükleaz kalıplarını kullanır. Belirli bir hedef genin (örn., *actA* ve *inlA*) PZR amplifikasyonundan sonra ürünler, seçili restriksiyon enzimleri ile parçalanır. Restriksiyon parçaları jel elektroforezi ile ayrılır ve *L. monocytogenes* ve alt tipleri arasındaki genetik ilişki, parçaların sayısı ve boyutu karşılaştırılarak belirlenir (Wiedmann ve diğ., 1997). 23S rRNA geninin PZR ile amplifiye edilmiş fragmanlarının RFLP analizine dayanarak *Listeria* bakterileri tür düzeyinde tanımlanır (Paillard ve diğ., 2003).

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD yöntemi, nispeten düşük sıcaklıkta (örneğin, 36° C), *Listeria* genomik DNA sekansları ile hibridize olmak için kısa rasgele sekans primerleri (10-15 baz uzunluğunda) kullanır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi ile ayrılabilen farklı boyutlarda amplifiye ürünler üretilir (Liu, 2008). Williams ve diğ. (1990), RAPD tarafından üretilen polimorfizmlerin mikroorganizmaların alt tiplendirilmesinde yararlı belirteçler olabileceğini bulmuşlardır. Mazurier ve diğ. (1992), *L. monocytogenes* salgın izolatları kullanılarak RAPD' nin epidemiyolojik ilgi düzeyini değerlendirmiş, 102 izolattan 92' sinin salgın gruplarına ile ilişkili olduğunu bulmuştur.

Ribotiplendirme

Bakteri genom polimorfizmini Southern Blot analizi ile gösteren bir yöntemdir. Bu yöntem için, *Listeria* DNA' sı başlangıçta restriksiyon enzimleri (örn. EcoRI, PvuII ve XhoI) ile birçok küçük boyutlu parçalara ayrılır. Nihai DNA parçaları daha sonra agaroz jel elektroforezi ile ayrılır, Southern blot yoluyla bir membrana aktarılır ve rRNA' yı (rDNA) kodlayan *E. coli* geninden türetilmiş bir prob ile tespit edilir. Böylece sadece rRNA genlerini içeren DNA parçaları tanınır (Graves ve diğerleri, 1994). Bruce ve diğ. (1995) 1346 *L. monocytogenes* suşunu incelediği çalışmada, *L. monocytogenes* DNA' sının EcoRI ile parçalanması ve *E. coli* rrnB rRNA operonu ile saptanmasından sonra 50 bant paterninin tespit edilebildiğini göstermiştir. Çeşitli çalışmalarda *Listeria* türlerinin farklılaştırılması, soy I ve III'e ait *L. monocytogenes* serotip 4b suşlarının netleştirilmesi ve ayrıca *L. monocytogenes* alt gruplarının IIIA, IIIB ve IIIC' nin doğrulanması için kullanılmıştır (Liu ve diğ., 2006a; Liu ve diğ., 2006b)

DNA-DNA Hibridizasyonu

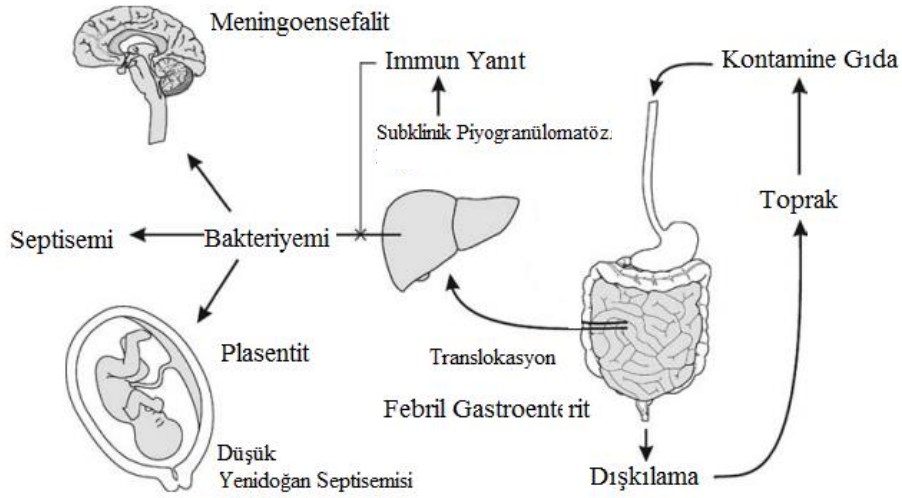
Bu teknik, farklı orijinli DNA'lar arasındaki dizi benzerliğini ve bir DNA içindeki dizi tekrarlamı miktarını belirlemek için kullanılır. Orijinal DNA-DNA hibridizasyon protokolünde, bir referans suştan genomik DNA sonikasyon ile kesilir ve daha sonra bir test suştan radyoaktif olarak etiketlenmişt genomik DNA ile karıştırılır. Sonraki protokollerde, radyoaktif izotop yerine enzim, biyotin ve SYBR green yeşil boya kullanılmıştır. SYBR green' in DNA' ya olan afinitesinden faydalanarak DNA-DNA ilişkisinin tahmin edilmesi için kolay ve hızlı bir florimetrik yöntem geliştirilmiştır (Gonzalez ve Sai-Jimenez, 2004). Karışım 100° C' de 3-4 dakika ısıtılır ve 16 saat 60 veya 75° C' de tutulur. Bir hidroksiapatit kolonu yoluyla bağlanmamışt, tek sarmallı DNA' nın ortadan kaldırılmasından sonra, bağli olan çift sarmallı DNA yıkanır, buradan geri kalan radyoaktivite sayılarak yeniden birleşme değeri belirlenir (Brenner ve diğ., 1982).

2.8. LISTERIA MONOCYTOGENES'İN PATOGENEZİ

2.8.1. Konakçıya Alınması

Hem sporadik hem de epidemik listeriozis için birincil enfeksiyon kaynağı neredeyse her zaman kontamine olmuşt besindir, bu nedenle gastrointestinal sistem, *L. monocytogenes* ' lerin konakçıya girişinin ana kapısıdır (Farber ve diğ., 2001; Vazquez-Boland ve diğ., 2001).

Listeriozis için diğ er olası enfeksiyon yolları, granümatöz dermatit ile karakterize edilen, genellikle genital sekresyonlara ve listeriyal kaynaklı düşük meydana gelmişt olan gevişt getiren hayvanlarla teması olan veteriner ve çiftçilerde deri yoluyla (genellikle ellerde ve kollarda) doğrudan bulaşma (Allcock, 1992; McLauchlin ve Low, 1994), gevişt getiren hayvanlarda meydana gelen belirli bir gıda kaynaklı listeriozis, kontamine silajla taşınan *L. monocytogenes* ' lerin nazofarenks ve hatta gözdeki sinir terminallerinin lokal invazyonundan sonra, hücre-hücre yayılımı yoluyla kranial sinirlerden geçerek doğrudan rombensefalon' a ulaştığı düşünölen bulaşma (Vazquez-Boland ve diğ., 2001), annede görölen ve gıda yoluyla edinilmişt olan enfeksiyonun plasenta yoluyla fetüse geçtiğı bulaşma olarak gösterilebilir. Şekil 2.4' de *Listeria* fizyopatolojisi gösterilmiştır.



Şekil 2.4: *Listeria* fizyopatolojisinin şematik gösterimi (Vazquez-Boland ve diğ., 2001).

L. monocytogenes' in bağırsak mukozası yoluyla konakçıya girebileceği iki mekanizma vardır. Birincisi, mikrovillusun emici epitelini kaplayan ve bağırsak hücrelerinin enfeksiyonuna yol açan doğrudan enterosit istilasıdır. Bu enteropatojenik mekanizma spesifik ligand-reseptör etkileşimlerini içerir ve sadece bağırsak hücrelerinin reseptör invazinlere reseptörlerin duyarlı izoformlarını eksprese ettiği hayvan konakçılarında (örnek olarak insanlar veya kobaylar) meydana geldiği düşünülmektedir (Vazquez-Boland ve diğ., 2001; Lecuit, 2005; Lecuit ve diğ., 2007). Diğer giriş yolu, Peyer yamaları (plaka)'nın membranöz epitel hücreleri (M hücreleri) tarafından fagositozunu içerir. Bu ikinci bağırsak enfeksiyon mekanizması spesifik değildir, reseptörlerin duyarlı izoformunu eksprese etmeyen konakçı sistemlerinde (örneğin fareler ve sıçanlar) meydana gelir ancak bu giriş yolunun enterositlerin istilasından daha az etkili olduğu düşünülmektedir. İlk giriş mekanizması ne olursa olsun, bakteriler daha sonra fagositler ve antijen sunucu hücreler içinde lamina propriadaki enfeksiyon odaklarında, özellikle bakteriyel replikasyonun gerçekleştiği subepitelyal foliküler dokuda lokalize olurlar (Pron ve diğ., 1998; Lecuit, 2005; Lecuit ve diğ., 2007).

Yapılan bir in vivo çalışma, *Listeria* bakterilerinin bağırsaktan mezenterik lenf düğümlerine (MLD) çok hızlı bir şekilde (6 saat içinde) yayıldığını, muhtemelen dendritik hücreler içinde taşındığını göstermektedir (Pron ve diğ., 2001). Birincil hedef organlar *L. monocytogenes*' in mezenterik lenf düğümlerinden lenfohematojen yayılımla ulaştığı dalak ve karaciğerdir. Hayvan enfeksiyon modelleri, bunun bir oral inokülasyondan sonraki ilk 24 saat içinde gerçekleştiğini göstermektedir (Czuprynski ve diğ., 2002; Bakardjiev ve diğ., 2004).

Bakteriyel yükün çoğu (yaklaşık %90' ı) karaciğer parankiminde lokalize olur. Hepatositlerin, hem reseptör aracılı içselleştirme hem de hücre içi replikasyon açısından *L. monocytogenes*' lere izin verdiği ve bağırsak translokasyonundan sonra ana çoğalma bölgesi olduğuna inanılmaktadır. Enfeksiyöz odaklar, muhtemelen doğrudan hücreden hücreye yayılma ile oluşur. Bu odaklar hemen nötrofillerle ve daha sonra makrofajlarla çevrelenerek tipik piyogranüloamatöz lezyonlar üretir (Conlan ve North, 1991; Portnoy, 1992; Dramsi ve diğ., 1995; Conlan, 1996; Gaillard ve diğ., 1996; Cousens ve Wing, 2000, Gregory ve Liu, 2000).

Listeriyal bulaş mezenterik lenf düğümlerinin yanı sıra dalakta da lokalize olur. Farede *L. monocytogenes*, splenik hücrelerin apoptozu, özellikle tip I IFN ile aktive edilen lenfositleri indükler ve hem CD4⁺ hem de CD8⁺ lenfositlerinin tükenmesine bağlı olarak dalağın lenf düğümleri ve lenf damarlarından oluşan kısmının yani beyaz pulpanın dramatik bir gerilemesine neden olur. Bu büyük lenfosit ölümü, bakteriyel kolonizasyon için izin veren bir ortam yaratarak erken doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini azaltabilir (Conlan, 1996; Marco diğ., 1991; Carrero ve diğ., 2004a; Carrero ve diğ., 2004b).

İmmün sistemi baskılanmış olan konakçıların immün savunmadaki yetersizlikleri nedeniyle bakteriler kan dolaşımına geçebilir. Bu düşük seviyeli bakteriyemi yeterince uzarsa, *L. monocytogenes* enfeksiyonu septisemik hastalık veya beyindeki lokal enfeksiyon şeklinde klinik listeriyoza doğru ilerleyebilir (Vazquez-Boland ve diğ., 2001; Berche, 1995; Blanot, 1997; Bakardjiev, 2006). *L. monocytogenes*' in enfekte fagositlerin içinde taşınan bir Truva atı mekanizması kullanarak vücutta yayıldığına dair kanıtlar vardır (Drevets ve diğ., 1995; Drevets, 1999).

L. monocytogenes enfeksiyonu patojenin önce bağırsak bariyerini geçmesi, daha sonra birincil hedef organları işgal etmesi ve çoğalması; son olarak klinik hastalığa neden olduğu ikincil hedef organlarını işgal etmek ve çoğaltmak için iki diğer engeli (endotel bariyeri, özellikle beyin mikropillerleri ve materno-fetal bariyer) aşması gereken çok aşamalı bir süreçtir.

2.8.2. Listeriozis Tanısı

Kontamine gıdalar hem epidemik hem de sporadik vakalarda ana enfeksiyon kaynağı olduğundan gastrointestinal sistemin patojenik *Listeria* organizmalarının konakçıya girişinin birincil bölgesi olduğu düşünülmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Pinner ve diğ., 1992). Enfeksiyonun klinik seyri, gastroenterit vakalarında ağır derecede kontamine yiyeceklerin

alınmasından 20 saat sonra başlar (Dalton ve diğ., 1997), invaziv hastalık için kuluçka süresi (yaklaşık 20 ila 30 gün) genellikle çok daha uzundur (Linnan ve diğ., 1988; Riedo ve diğ., 1994).

L. monocytogenes 1929 yılından beri bir insan patojeni olarak kabul edilmektedir (Nyfeldt, 1929), ancak bir dizi salgının gıda kaynaklı *L. monocytogenes* ile ilişkili olduğunun gösterildiği 1980 yılına kadar bulaşma yolu belirsiz olarak kalmıştır (Schlech ve diğ., 1983; Fleming ve diğ., 1985; Ho ve diğ., 1986; McLauchlin ve diğ., 1991; Linnan ve diğ., 1988; Riedo ve diğ., 1994; Goulet ve diğ., 1995). Artık insan listeriozis vakalarının neredeyse hepsinin gıda kaynaklı olduğu kabul edilmektedir (Nyfeldt, 1929; Schwartz ve diğ., 1988; Schuchat ve diğ., 1992; Nguyen ve Yu, 1994; Mead ve diğ., 1999).

Hamile kadınlarda *L. monocytogenes* enfeksiyonu düşük, ölü doğum, erken doğum veya yenidoğan enfeksiyonuna neden olabilir. Listeriozis hamilelik sırasında herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir, ancak en sık üçüncü trimesterde görüldüğü tespit edilmiştir (Bortolussi, 1990; Mylonakis ve diğ., 2002).

Yapılan bir çalışmada, 1986 yılında meydana gelen menenjit vakalarının en sık görülen beşinci nedeninin *L. monocytogenes* olduğu bulunmuştur (Wenger ve diğ., 1990). Yapılan başka bir çalışmada ise, akut bakteriyel menenjit vakası geçirmiş olan 103 erişkinde, vakaların %10' unu oluşturan ve en sık izole edilen ikinci bakterinin *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir (Hussein ve Shafran, 2000).

Merkezi sinir sistemi listeriozisli gebe olmayan erişkinlerde görülen semptomlar ateş, halsizlik, ataksi, nöbetler ve zihinsel durumda görülen değişimlerdir. Ateş genellikle bakteriyemili hastalarda görülür; keyifsizlik ve karın ağrısı gibi diğer spesifik olmayan semptomlar da ortaya çıkabilir. *L. monocytogenes* çevre boyunca çeşitli gıda örneklerinden ve bazen de sağlıklı insanların gastrointestinal sistemlerinden izole edilebilir (Farber ve Peterkin, 1991; Pinner ve diğ., 1992). Çeşitli salgın araştırmalarında, *L. monocytogenes*' in normal konakçılarda ateşli bir gastroenterite neden olduğu tespit edilmiştir (Schlech, 1997). Bu gastroenterit ve ateş görülen ilk salgın, *L. monocytogenes* ile kontamine olan çikolatalı süt tüketimiyle bağlantılıdır ve süt tüketen 58 kişinin %79' unun ishal ve %72' sinin de ateş gibi semptomlar gösterdiği bildirilmiştir (Dalton ve diğ., 1997).

İnvaziv listeriozis tanısı, *L. monocytogenes*' lerin kan veya beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi normal steril bir bölgeden izole edilmesine bağlıdır. Organizma Gram boya ile difteroid çomaklar ile karıştırılabileceğinden, tam bakteriyolojik değerlendirme yapılmalıdır. Ateşli gastroenteritten şüphelenildiğinde bu bakterinin dışkı örneklerinden izole edilmesi yararlıdır, ancak asemptomatik taşıma meydana geldiğinden sadece dışkıdan izolasyon güvenli bir teşhis olarak kabul edilmez. Ateşli bir gastroenterit salgını belgelemek için semptomatik kişiler arasındaki izolasyon oranı asemptomatik kişilerden önemli ölçüde daha yüksek olmalıdır. Steril bölge (BOS veya kan) örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes* suşları rutin olarak kullanılan besiyerlerinde genellikle iyi üremektedir. Örnek doğrudan %5 koyun, at veya tavşan kanı içeren TSA' ya ekilir ve bakterinin genellikle 36 saat içerisinde teşhisi sağlanır (Ryser ve Marth, 2007).

L. monocytogenes' in dışkı örnekleri gibi çok sayıda mikroorganizmayı içeren diğer kaynaklardan izole edilmesi daha zordur; bu örneklerin *Listeria* seçici besiyerleri üzerine ekilmeden önce sıvı besiyerinde seçici olarak zenginleştirilmesi sağlanmalıdır. Bazı durumlarda ise, *L. monocytogenes* bakterilerinin kültür yöntemleri ile tanımlamasının yapılması mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda tanıyı desteklemek için Listeriolisin O antikoru ile tespit çalışmalarının yapılması gerekir. Listeriolisin O antikoru tespiti için yapılan çalışmalar, bazı epidemiyolojik araştırmalarda yararlı olmuştur ve merkezi sinir sisteminin kültür negatif listeriozisinde tanıyı desteklemek için de kullanılmıştır (Dalton ve diğ., 1997; Gaillard ve diğ., 1992).

2.8.3. Listeriozis Tedavisi

Listeriozis için en uygun antibiyotik tedavisini belirlemek amacıyla kontrollü çalışmalar yapılmamıştır. İnsan listeriozis tedavisinde gentamisin ile birlikte ampisilin veya amoksisilin birincil tedavi seçeneğidir (MacGowan ve diğ., 1990; Hof, 1991). Aminoglikozitlerin rolü, hücrelere zayıf şekilde nüfuz ettikleri ve canlı konakta etkisiz olabildikleri için iyi anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, *Listeria*' nın çoğunluğu menenjit vakalarında hücre dışı kaynaklı olabilmektedir (Hof, 2003). *L. monocytogenes* aminoglikozitlerin yüksek ekstraselluar konsantrasyonlarına rağmen hücrelerde çoğalmıştır (Havell, 1986).

Trimetoprim-sülfametoksazol kolayca hücrelere girer ve *L. monocytogenes* bakterilerini öldürür. Bu ilacın penisiline aşırı duyarlılığı olan listeriozisli hastalarda etkili olduğu kanıtlanmıştır (Armstrong, 1995).

Aminopenisilinlerle karşılaştırıldığında, daha yeni olan kinolon antimikrobiyaller bakteridisidal aktiviteyi arttırabilir, kan-beyin bariyerine, merkezi sinir sistemine geçebilir ve konakçı hücrelerde birikebilir, ancak klinik çalışmalar henüz yapılmamıştır (Hof, 2004).

L. monocytogenes' lerin hücreler içinde büyüme ve hayatta kalma kabiliyeti muhtemelen bakteriyostatik ilaçlara verilen zayıf yanıtı ve penisiline olan yavaş yanıtını açıklamaktadır. Kloramfenikol veya tetrasiklin gibi bakteriyostatik ilaçlar tedavide yüksek başarısızlık oranları ile ilişkilendirilmiştir, bu nedenle önerilmemektedir (Southwick ve Purich, 1996). Sefalosporinler de, *Listeria*' nın penisilin bağlayıcı proteini için düşük bir afiniteye sahip olduklarından tedavi için önerilmez (Vicente ve diğ., 1990)

Bağışıklığı baskılanmış hastalarda iki haftalık penisilin tedavisinden sonra hastalık tekrar bildirilmiştir (Watson ve diğ., 1978). Bağışıklığı baskılanmış birçok hastada enfekte olmuş hücrelerin iyileşmesinde azalma olduğundan, 3 ila 6 hafta boyunca antibiyotik tedavisi daha ihtiyatlı olabilmektedir (Armstrong ve Fung, 1993). Diğer hasta grupları için optimal tedavi süresi belirlenmemiştir. Uygun bir tedavi süreci, gebelikte listeriozis için 2 hafta, yenidoğan listeriozis' i için 2 ila 3 hafta, menenjit ve bakteriyemisi olan bağışıklığı baskılanmamış yetişkinler için 2 ila 4 hafta ve endokardit gibi karmaşık enfeksiyonlara sahip hastalarda ise için daha uzun olabilmektedir.

2.8.4. Kontrol ve Önleme

Listeria spp., özellikle *L. monocytogenes*, gıda işleme uygulamalarının ardındaki aşırı sıcaklık, pH ve ozmotik koşullara toleranslıdır. Genel olarak, gıda ürünleri, *Listeria* çoğalması için besin açısından zengin bir ortam sağlar ve bu bakteriler, tüketimden önce tamamen ortadan kaldırılmadığı takdirde çoğalarak enfeksiyona neden olurlar.

İnsanlar genellikle kontamine gıdalar yoluyla *L. monocytogenes* ile enfekte olurlar. Bu nedenle, insanlarda listeriozisi önlemenin en önemli adımı, gıda ürünlerinde *Listeria* bakterilerini azaltmak ve ortadan kaldırmaktır. Bu, tüketiciler için perakende pazarlarına *Listeria* içermeyen ürünlerin piyasaya sürülmesini sağlamak için gıda işleme tesislerinde

izleme prosedürlerinin uygulanmasını gerektirmektedir. Buna ek olarak, perakende pazarlardan gıda ürünlerinin düzenli olarak kontrol edilmesi, o zamandan bu yana kontamine olmuş veya mevcut düşük seviyelerde *Listeria*'nın saptanabilir miktarlara dönüştüğü ürünlerin raflardan çıkarılmasını da gerektirir. Daha sonra, tüketicilerin gıda ürünlerinin gerekli buzdolabı sıcaklıklarında saklanmasını ve tüketilmeden önce gıda ürünlerinin uygun şekilde işlenmesini ve pişirilmesini sağlamak için eğitilmesi de önemlidir. Bunlara ek olarak, çabuk bozulabilen veya RTE gıdaların kullanılması, buzdolaplarının düzenli olarak temizlenmesi ve buzdolabı sıcaklığının 4° C' de kalmasının sağlanması tavsiye edilmektedir (Ryser ve Marth, 2007).

USDA, şarküteri hindi eti ile bağlantılı büyük bir salgının ardından hazır gıda et ve kümes hayvanı ürünlerinin *L. monocytogenes* kontaminasyonunu daha da azaltmayı amaçlayan yeni düzenlemeler yayınlamıştır (FSIS, 2003). Halka beslenme ve gıda hazırlama önlemleri önerilmiştir; bunlar sadece listeriozis değil, aynı zamanda salmonelloz ve campylobacteriosis gibi diğer yaygın gıda kaynaklı hastalıkların riskini de azaltmalıdır. Bu önlemler, hayvansal kaynaklardan çiğ gıdaların tam olarak pişirilmesi, çiğ sebzelerin yemeden önce iyice yıkanması, pişmemiş etlerin sebzelerden, pişmiş gıdalardan ve yemeye hazır gıdalardan ayrı tutulması, çiğ (pastörize edilmemiş) süt veya çiğ süttten yapılan gıdalardan kaçınılması, pişmemiş yiyecekler ile temastan sonra ellerin, kullanılan bıçakların ve kesme tahtalarının yıkanmasıdır (CDC, 1992).

Gıda endüstrisinde kontaminasyonun nasıl oluştuğuna dair bir anlayış geliştirmesi ve daha sonra gıdaların işlenmesi, dağıtımı ve pazarlanmasında önemli noktalarda *L. monocytogenes* varlığını en aza indirmek için tehlike analizi kritik kontrol noktası (HACCP) programları uygulaması önemlidir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER

Kıyma örneklerinden *L. monocytogenes* bakterisinin izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu, Ankara), LMKVII, LMTT15, (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı, Bolu) *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterileri kullanılmıştır.

3.2. KIYMA ÖRNEKLERİNDEN *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN KÜLTÜR YÖNTEMİYLE İZOLASYONU

Çalışmamızda kıyma örneklerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) kültür metodu kullanılmıştır. İstanbul ili sınırları içerisinde farklı semtlerden toplam 100 kıyma örneği soğuk zincir ile laboratuvara getirilmiş ve inceleme yapılınca kadar +4 °C' de bekletilmiştir. İncelenen örneklerin ilçelere göre dağılımı Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1: İncelenen örneklerin ilçelere göre dağılımı.

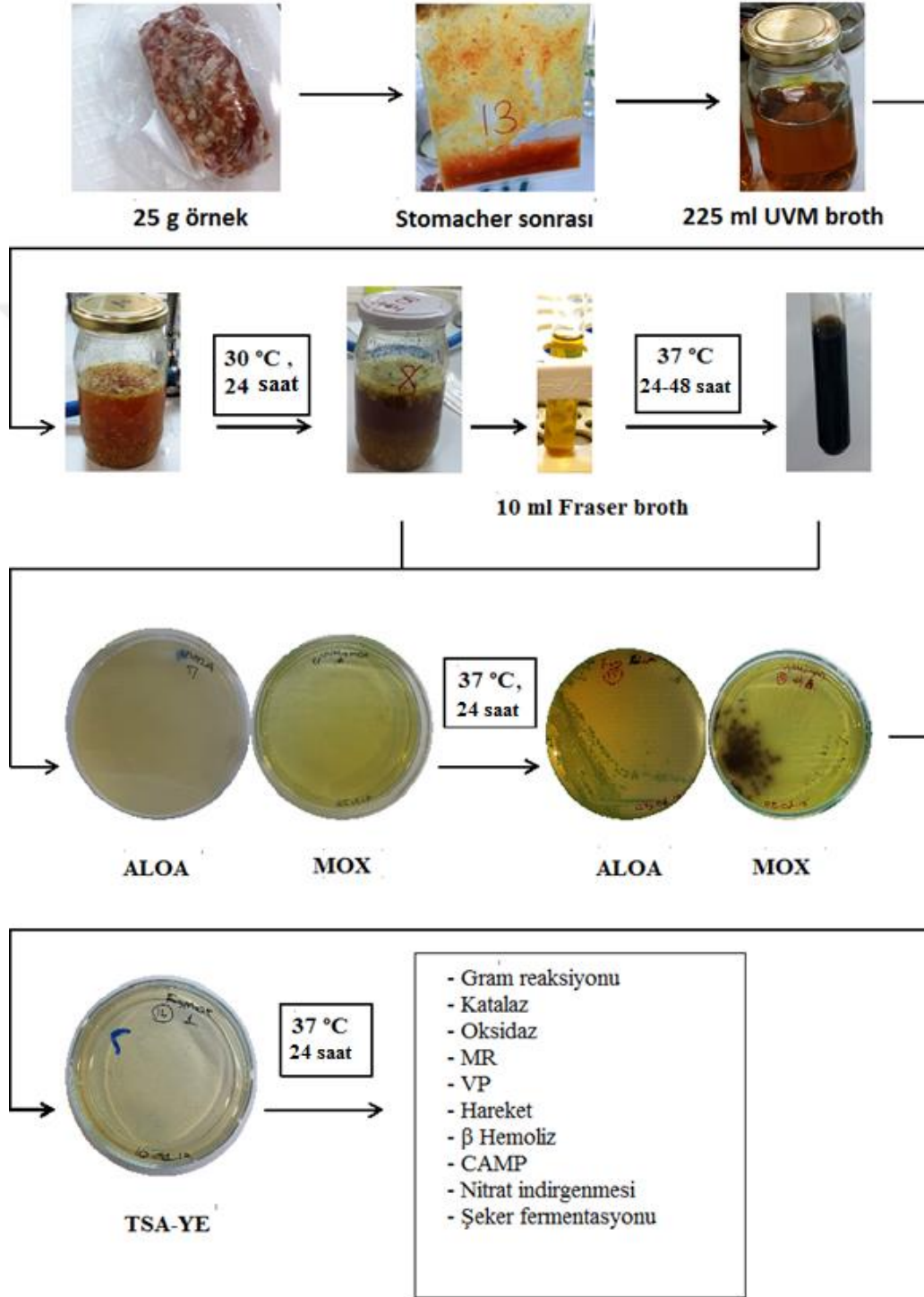
İlçe	Örnek Sayısı	İlçe	Örnek Sayısı
Avclar	7	Kartal	6
Bakırköy	5	Maltepe	2
Beşiktaş	6	Şişli	7
Eyüp	2	Tuzla	26
Fatih	18	Üsküdar	8
Kadıköy	13		

Kültür yöntemi, ön zenginleştirme, seçici zenginleştirme ve seçici izolasyon olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada işlem sırasında veya çevresel etmenler nedeniyle olumsuz olarak etkilenmiş hücreleri canlandırmak veya onları onarmak için ön zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 25 g kıyma örneği stomacher cihazı (IUL Instruments, İspanya) yardımıyla homojenize edilip 225 ml University of Vermont (UVM) Broth (Biolife, İtalya) besiyerinde 30°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda sıvı kültürden 1 öze dolusu alınarak selektif katkı (sikloheksimit, kolistin sülfat, sefotetan, fosfomisin, akriflavin) eklenmiş Modified Oxford Agar (MOX) (Biolife, İtalya)’ a ve selektif katkıları (lipaz C substrat ve nalidiksik asit sodyum tuz, eftazidim, sikloheksimit, polimiksin B sülfat) eklenmiş *Listeria* Ottaviani & Agosti Agar (ALOA) (Conda, İspanya) besiyerine azaltma yöntemi ile ekim yapıp 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.1).

İkinci aşamada seçici zenginleştirme işlemi ile *L. monocytogenes* dışındaki mikroorganizmaların üremelerine engel olunarak ya da üreme hızları düşürülerek ortamdaki rekabetçi bakteri türlerinin çoğalmaları engellenip *L. monocytogenes* bakterilerinin çoğalmaları için ortam hazırlanmıştır. Seçici zenginleştirme için UVM’ den 0.1 ml homojenat alınıp selektif katkı (ferrik amonyum sitrat, nalidiksik asit, akriflavin HCl) eklenmiş 10 ml Fraser Broth (Biolife, İtalya)’ a aktarılaraq 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Fraser Broth kültürde siyahlaşma *L. monocytogenes* şüpheli olarak kabul edilip üçüncü aşamaya geçilmiştir. Fraser Broth kültürde siyahlaşma görülmeyen tüpler 24 saat daha inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresi sonrası siyahlaşma görülmeyen tüpler değerlendirme dışında bırakılmıştır (Şekil 3.1).

Üçüncü aşamada ise *L. monocytogenes* bakterilerini izole edilebilmek için seçici katı besiyerlerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Bu amaçla USDA-FSIS yöntemi uyarınca tavsiye edilen selektif katkı eklenen MOX besiyeri yanında hangi selektif katı besiyerinden daha fazla *L. monoytogenes* izolasyonu yapılabildiğinin karşılaştırılabilmesi için (ALOA) besiyeri de kullanılmıştır. Fraser broth kültürlerinden MOX ve ALOA besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra petriler 37°C’de 24 saat inkübe edilmişlerdir. MOX besiyerinde gelişen gri renkli hafif bombeli etrafı eskülin hidrolizi sonucunda siyahlaşmış olan yaklaşık 1 mm boyutundaki, ALOA besiyerinde gelişen yeşil renkli, hafif bombeli, etrafında açık renk zon bulunan tipik koloniler *L. monocytogens* açısından şüpheli olarak kabul edilip TSA-YE

(Conda, İspanya) besiyerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek saf kültürler elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: *L. monocytogenes* bakterisinin kültür yöntemi ile izolasyonu.

3.3. *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASI

MOX ve ALOA besiyerinde tipik *L. monocytogenes* morfolojisine sahip koloniler TSA-YE besiyerine azaltma yöntemi ile ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. TSA-YE besiyerinde üreyen *L. monocytogenes* şüpheli izolatlar ilk olarak Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri açısından incelenmiştir. Gram pozitif, oksidaz negatif, katalaz pozitif olan izolatlar *L. monocytogenes* şüpheli olarak kabul edilip Metil Red (MR), Voges Proskauer (VP), nitrat redüksiyon testi, SIM besiyerinde hareket tayini, karbonhidrat fermentasyon testleri (mannitol, ksiloz, riboz, ramnoz, metil α -D-mannopiranosit), kanlı besiyerinde hemoliz ve Christie Atkins Munch Peterson (CAMP) gibi biyokimyasal testler açısından incelenmiştir (Şekil 3.1).

3.3.1. Gram Boyama

Gram boyama için kullanılacak lamalar, üzerlerindeki yağdan arındırıldıktan sonra alevden 3 kere geçirilerek steril edilmiştir. Lamaların üst yüzeyine 1 damla steril fizyolojik tuzlu su (FTS) eklenip üzerine bir öze dolusu şüpheli izolat bozuk para büyüklüğünde yayıldıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatın alt yüzeyi 3 kere alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Hazırlanan preparatlar Gram boyamanın ilk aşaması için 1 dakika kristal viyoleye maruz bırakılmış ve süre sonunda distile su ile yıkanıp fazla kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Mordan aşaması için preparatlar lugol ile 1 dakika muamele edildikten sonra fazla lugol distile su ile uzaklaştırılmıştır. Dekolorizasyon sağlanabilmesi için preparat etil alkol ile 10-15 saniye muamele edilip distile su ile yıkanmıştır. Son olarak sulu fuksin ile 45 saniye boyunca boyanmış, fazla boya distile su ile uzaklaştırılıp preparat kurumaya bırakılmıştır. Gram boyama işlemi sonrası preparatlar ışık mikroskobunda immersiyon yağı damlatılarak 100' lük objektifte incelenmiştir. Gram boyama sonunda Gram pozitif, basil veya kokobasil morfolojisine sahip bakteriler *L. monocytogenes* şüpheli olarak kabul edilmiştir (Hitchins, 1998).

3.3.2. Katalaz Testi

TSA-YE besiyerinde gelişen *L. monocytogenes* şüpheli izolatlardan platin öze yardımıyla örnek alınıp, alevden geçirilerek steril edilmiş temiz ve yağsız bir yüzeye sahip bir lamın üzerine yayılmıştır. Daha sonra bu kültür üzerine %3' lük H₂O₂ solüsyonundan birkaç damla

damlatılarak gaz çıkışı takip edilmiştir. Hava kabarcıklarının çıkışı pozitif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* kullanılmıştır (Hitchins, 1998).

3.3.3. Oksidaz Testi

Bu test sitokrom oksidaz enziminin varlığının ortaya konması için yapılmaktadır. Steril filtre kağıdına platin bir öze yardımıyla şüpheli izolattan biraz sürülmüş ve üzerine taze hazırlanmış oksidaz ayırıcından 1-2 damla damlatılmıştır. Steril filtre kağıdı üzerinde meydana gelen renk değişimi maksimum 30 saniye boyunca izlenmiş, filtre kağıdı üzerinde mavi-mor renk oluşması pozitif, renk değişimi görülmemesi ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Oksidaz testi için pozitif kontrol olarak *P. aereginosa* kullanılmıştır (Hitchins, 1998).

3.3.4. Metil Kırmızısı Testi

Bu test, glikozun fermentatif metabolize olması ile besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ortaya koymak için yapılmaktadır. Hazırlanan Clark-Lubs besiyerine şüpheli izolatların ekimi yapılmış ve 37 °C'de 2-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler 3-4 damla Metil kırmızısı solüsyonu eklenmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif reaksiyon, sarı renk ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. coli*, negatif kontrol olarak *Klebsiella* spp. kullanılmıştır (Feng, 1998).

3.3.5. Voges Proskauer Testi

Bu test, ortamdaki glikozun fermente edilerek, nötral bir ürün olan asetilmetilkarbinol' u (asetoin) oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için yapılmaktadır. Şüpheli izolatların Clark-Lubs besiyerine ekimi yapılarak 37 °C'de 2-5 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda kültür üzerine %5'lik 0.6 ml α -naftol çözeltisi ve %40'lık 0.2 ml KOH ayırıcı ilave edilip 37 °C'de su banyosunda yarım saat bırakılmıştır. Kırmızı renk oluşumu pozitif reaksiyon, sarı renk oluşumu ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol için *Klebsiella* spp., negatif kontrol için ise *E. coli* kullanılmıştır (Feng, 1998).

3.3.6. Nitrat Redüksiyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların nitratları redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılmaktadır. *L. monocytogenes* şüpheli izolatların Nitrat Broth'a ekimi yapılmış ve 35 °C'de 2-5 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda kültüre ilk olarak 4-5 damla

ayıraç A ve 4-5 damla ayıraç B eklenmiştir. Ayıraçların besiyeri yüzeyinde temas ettikleri noktada kırmızı renk gözlemlenmesi nitratın nitrite indirgendiğini yani nitrat redüksiyon testinin pozitif olduğunu göstermektedir. Kırmızı rengin gözlemlenmediği durumlarda ise çinko tozu ilave edilmiş ayıracın besiyeri ile temas ettiği kısımlarda kırmızı renk oluşması nitratın ortamda hala mevcut olduğunu dolayısıyla nitrite dönüşmediğini ve nitrat redüksiyonun negatif olduğunu göstermiştir (Hitchins, 1998).

3.3.7. Hareket Testi

Hareket tayini için, *L. monocytogenes* şüpheli izolatlardan iğne uçlu öze ile yarı katı bir besiyeri olan SIM besiyerine batırma yöntemi ile ekim yapılmış ve 25 °C’de 2-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda şemsiye şeklinde üreme hareket testi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

3.3.8. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Bu test, bakterilerin spesifik karbonhidratları kullanma yeteneğini belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Steril %5’ lik mannitol, ksiloz, riboz, ramnoz ve metil α -D-mannopiranosit karbonhidrat çözeltileri 9 ml steril karbonhidrat fermentasyon besiyeri içeren tüplere 1 ml olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan bu tüplere şüpheli izolatlardan ekim yapılarak 35 °C’ de 2-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüplerdeki sıvı besiyerindeki rengin sarı- yeşil renge dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Hitchins, 1998).

3.3.9. Hemoliz testi

Hemoliz testinde %5’ lik koyun kanlı besiyeri kullanılmıştır. Şüpheli izolatlardan koyun kanlı besiyerine batırma yöntemi ile ekimi yapıp 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ekim bölgesinde şeffaf hemoliz zonu oluşturan örnekler β -hemoliz pozitif olarak kabul edilmiştir (Hitchins, 1998).

3.3.10. Christie, Atkins and Munch-Peterseon (CAMP) Testi

CAMP testi için %5’ lik koyun kanlı TSA besiyeri hazırlanıp sterilite kontrolü için 30 °C’ de 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra koyun kanlı agarın orta kısmına yaklaşık 5 cm uzunluğunda düz bir çizgi halinde *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ekimi yapılmıştır. *L. monocytogenes* şüpheli izolatın ortadaki *S. aureus* ekimine

değmeyecek ve 90 derecelik açı yapacak şekilde ekimleri yapılmış ve 35 °C’ de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda, ok başı şeklinde meydana gelen hemoliz pozitif CAMP reaksiyonu olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

3.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ

3.4.1. Kullanılan Antibiyotikler

L. monocytogenes bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarını tespit etmek için kullanılan antibiyotik diskleri Tablo 3.2 ’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotikler.

Antibiyotik	Kısaltma	Miktarı
Ampisilin	AMP	10 µg
Penisilin	P	10 units
Amoksisilin-klavulanik asit	AMC	30 µg
Sefaklor	CEC	30 µg
Vankomisin	VA	30 µg
Amikasin	AN	30 µg
Gentamisin	GM	10 µg
Klaritromisin	CLR	15 µg
Tetrasiklin	TE	30 µg
Siprofloksasin	CIP	5 µg
Kloramfenikol	C	30 µg
Rifampisin	RA	5 µg
Trimetoprim-sulfametoksazol	SXT	25 µg

3.4.2. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Kıyma örneklerinden izole ettiğimiz *L. monocytogenes* cinsi bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını tespit edebilmek amacıyla TSA- YE agar’da 37 °C’ de 24 saat üretilen taze kültürlerden McFarland No 0.5 bulanıklığına göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

3.4.3. Antibiyotik Duyarlılık Deneyi

McFarland No 0.5 bulanıklığına göre hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100 µl alınarak Mueller-Hinton Agar (Sigma-Aldrich, Almanya) besiyerleri üzerine yayma ekim yapılmış ve 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Petriler kuruduktan sonra antibiyotik diskler eşit uzaklıkta, bir petriye 4 tane olacak şekilde yerleştirilip 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmişlerdir. Bu deney 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık deneyleri NCCLS (Ulusal Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, M31-A3/2010) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak Kirby Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik disklerin etrafında oluşan zon çapların ortalaması alınmış, ortalama zon çapları NCCLS (M31-A3/2010)’deki standartlar ile karşılaştırılarak duyarlılık sınıflandırılması yapılmıştır.

3.5. *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ

3.5.1. DNA İzolasyonu

Geleneksel kültür yöntemi ile tespit edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin DNA izolasyonları GeneAll Exgene™ Clinic SV DNA izolasyon kitinin vermiş talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. *L. monocytogenes* bakterilerinin TSA-YE agar’daki taze kültürlerinde McFarland No 1 bulanıklığına göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonları ilk olarak 1.5 ml’ lik santrifüj tüplerine alınmış, 10000 g’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kalan peletin üzerine 180 µl lizozim enzimi eklenerek kuru blok ısıtıcısında (Biosan, Letonya) 37 °C’ de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 20 µl Proteinaz K solüsyonu ile birlikte kit içinde mevcut bulunan BL tamponundan 200 µl eklenerek vortekslenmiş ve 56 °C’ de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 200 µl saf etanol eklenip ters düz edilerek karıştırılıp DNA izolasyon kitinin içerisinde mevcut olan 2 ml’ lik toplama tüpüne dikkatli bir şekilde pipetaj yapılarak aktarılmış ve 12000 g’ de 2 dakika santrifüj edilip altta kalan toplama tüpü atılarak yenisi ile değiştirilmiştir. DNA izolasyon kitine dahil olan BW tamponundan 600 µl eklenmiş ve 12000 g’ de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünün yenisi ile değiştirilmesinin ardından kit’ e dahil olan TW tamponundan 700 µl eklenmiş ve 12000 g’ de 2 dakika santrifüj edilip toplama tüpünde biriken sıvı atılıp tüp tekrar geri yerleştirilmiştir. Yıkama tamponunu uzaklaştırabilmek için

12000 g' de 2 dakika santrifüj edilmesinin ardından ayrıştırma kolonları 1.5 ml' lik mikro santrifüj tüplerinin üzerlerine yerleştirilmiştir. Son aşama olarak 100 µl AE tamponundan eklenerek oda sıcaklığında kapakları açık bir biçimde 15 dakika bekletildikten sonra 12000 g' de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Elüsyon aşaması sayesinde ayrıştırma kolonu üzerinde bağlı olarak duran DNA serbest duruma gelerek altta bulunan mikro santrifüj tüpünde toplanmıştır. Bu aşamadan sonra üstte bulunan ayrıştırma kolonu atılmıştır. Mikro santrifüj tüplerinde toplanan *Listeria* bakterilerine ait DNA 'lar polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

3.5.2. DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Mikro santrifüj tüplerinde toplanan *L. monocytogenes* bakterilerine ait DNA 'ların miktarları Multiskan GO (Thermo Scientific, ABD) adlı cihaz kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boyunda absorpsanları ölçülerek tespit edilmiştir. 260/280 absorpsan oranının 1.8 olduğu örnekler saf olarak değerlendirilerek -20 °C'de saklanmıştır. -20 °C'de muhafaza edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bunun için 10x TBE (Tris borate EDTA) solüsyonu ile hazırlanan %0.8' lik agaroz jel kaynatmamaya özen gösterilerek eritilmiş ve sıcaklığı 45 °C'ye düştüğünde 0.33 µl GelRed (Biotium) floresan boya eklenmiştir. Hazırlanan jel, kuyucuklar oluşturmak için kullanılan tarakların takılı olduğu jel dökme tepsisine dökülmüş ve 15-20 dakika donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra mevcut olan taraklar dikkatlice çıkartılmış, elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzeri örtülecek kadar 1x TBE eklenmiştir. Kuyucuklara birbiriyle iyice karıştırılmış 4 µl DNA, 1 µl 6x jel yükleme boyası (Biomatik) yüklenmiştir. Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 standart bakterisinden elde edilen DNA örneği, negatif kontrol olarak ise ultra saf su kullanılmıştır. DNA markerı olarak 1 kb DNA Ladder (Bioline) kullanılmıştır. 70 volt'da 60 dakika yürütülen jelin görüntülenmesi UV görüntüleme sistemi (UVITEC Cambridge, İngiltere) ile sağlanmıştır.

3.5.3. *Listeria monocytogenes* Bakterilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Doğrulanması

3.5.3.1. Kullanılan Primerler

Geleneksel kültür yöntemiyle kıyma örneklerinden izole edilen ve biyokimyasal yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlanan bakteriler ile standart *L. monocytogenes* RSKK 475

bakterilerinin *iap* ve *hlyA* genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu ile tayin edilmiştir. *L. monocytogenes* bakterilerinin *iap* ve *hlyA* genlerini tespit etmek için kullanılan primerler Tablo 3.3' te verilmiştir.

Tablo 3.3: *L. monocytogenes* bakterilerinin doğrulanması için kullanılan primerler.

Primer adı	Primer dizisi (5' → 3')	Primer boyu (bp)	Referans
<i>iap</i>	IAP1: 5' ACA AGC TGC ACC TGT TGC AG 3' IAP2: 5' TGA CAG CGT GTG TAG TAG CA 3'	131	Kohler ve diğ., 1990
<i>hlyA</i>	PCRGO: 5' GAA TGT AAA CTT CGG CGC AAT CAG 3' PCRDO: 5' GCC GTC GAT GAT TTG AAC TTC ATC 3'	388	Bohnert ve diğ., 1992

3.5.3.2. PZR Yöntemi

PZR' de kullanılan karışım MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline, Singapur) ile hazırlanmıştır. 0.2 ml' lik mikro tüpler içerisine daha önce hazırlamış olduğumuz her bir reverse ve forward primerlerden 1 µl, 2 µl kalıp DNA, 5 µl MyTaq Reaction Buffer, 0.5 µl MyTaq DNA polimeraz ve 15.5 µl steril ultra saf su eklenerek son hacim 25 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Pozitif kontrol için *L. monocytogenes* RSKK 475 kalıp DNA'sı, negatif kontrol için ultra saf su kullanılmıştır.

Hazırlanan örnekler T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) cihazına yerleştirilerek PZR işlemi başlatılmıştır. Tablo 3.4' te *iap* ve *hlyA* genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları verilmiştir.

Tablo 3.4: *L. monocytogenes* bakterilerinin *iap* ve *hlyA* genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

Döngü	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu 1 döngü	95 °C	1 dk.
Denatürasyon	95 °C	15 sn.
Bağlanma	62 °C	15 sn.
Uzama	72 °C	10 sn.
Son uzama 1 döngü	72 °C	5 dk.

Elde edilen PZR ürünleri %1.2' lik agaroz hazırlanarak elektroforez işlemi ile 60 volt akımda 90 dk yürütülüp UV görüntüleme sistemi (UVITEC Cambridge, İngiltere) ile görüntülenmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin bant uzunlukları Bioline (Singapur) marka 100 bp DNA Ladder kullanarak tespit edilmiştir.

3.5.4. *Listeria monocytogenes* Bakterilerinin Filogenetik Analizi

3.5.4.1. Kullanılan primerler

Kıyma örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesinin belirlenebilmesi için PZR yöntemi uygulanmıştır. 16S rRNA gen bölgesine ait primerler üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 3.5' te gösterilmiştir.

Tablo 3.5: *L. monocytogenes* bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesinin belirlenmesinde kullanılan primerler.

Primer adı	Primer dizisi (5' → 3')	Primer boyu (bp)	Referans
16S rRNA	1492R: 5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3' 16S24F: 5' AGA GTT TGA TCC GGC TCA G 3'	1500	Lane, 1991

3.5.4.2.PZR Yöntemi

PZR’ de kullanılan karışım MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline, Singapur) ile hazırlanmıştır. 0.2 ml’ lik mikro tüpler içerisine daha önce hazırlamış olduğumuz her bir reverse ve forward primerlerden 1µl, 1 µl kalıp DNA, 5 µl MyTaq Reaction Buffer, 0.25 µl MyTaq DNA polimeraz ve 16.75 µl steril ultra saf su eklenerek son hacim 25 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Pozitif kontrol için *L. monocytogenes* RSKK 475 kalıp DNA’sı, negatif kontrol için ultra saf su kullanılmıştır.

Hazırlanan örnekler T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) cihazına yerleştirilerek PZR işlemi başlatılmıştır. Tablo 3.6’ da 16S rRNA genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları verilmiştir.

Tablo 3.6: 16S rRNA genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

Döngü	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu 1 döngü	95°C	2 dk.
Denatürasyon	95°C	1dk.
Bağlanma	55°C	1dk.
Uzama	72°C	2 dk.
Son uzama 1 döngü	72°C	1 dk.

Elde edilen PZR ürünleri %1.2’ lik agaroz üzerinde elektroforez işlemi ile 60 volt akımda 90 dk yürütölüp UV görüntüleme sistemi (UVITEC Cambridge, İngiltere) ile görüntülenmiştir. Elde edilen multipleks PZR ürünlerinin bant uzunlukları 100 bp DNA Ladder kullanarak tespit edilmiştir.

3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.6.1. *Listeria* UVM Broth Base (Biolife, İtalya)

Listeria UVM Broth Base et ve et ürünlerinden *Listeria* türlerinin ön zenginleştirme aşaması için kullanılmaktadır (Kornacki ve diğ., 1993; Fraser ve Sperber, 1988).

Proteaz pepton	5.0 g
Trypton	5.0 g
Et özütü	5.0 g
Maya özütü	5.0 g
Sodyum klorit	20.0 g
Sodyum fosfat bibazik	12.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1.35 g
Eskülin	1.0 g
Akriflavin hidroklorit	0.012 g
Nalidiksik asit	0.002 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 7.2 ± 0.2

54.4 g *Listeria* UVM Broth Base 1000 ml distile suda çözdürülmüş ve 225 ml' lik şişelere paylaştırıldıktan sonra 121 °C'de 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir.

3.6.2. *Listeria* Fraser Broth Base (Biolife, İtalya)

Listeria Fraser Broth Base *Listeria* türlerinin et ve et ürünlerinden seçici zenginleştirme aşamasında kullanılmaktadır (Kornacki ve diğ., 1993; Fraser ve Sperber, 1998).

Hayvan dokularının enzimatik sindirimi	5.0 g
Kazeinin enzimatik sindirimi	5.0 g
Et özütü	5.0 g
Maya özütü	5.0 g
Sodyum klorit	20.0 g
Disodyum hidrojen fosfat anhidroz	9.5 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1.35 g
Eskülin	1.0 g
Lityum klorit	3.0 g
Akriflavin hidroklorit	0.025 g
Nalidiksik asit	0.02 g
dH ₂ O	500 ml

pH: 7.2 ± 0.2

27.4 g *Listeria* Fraser Broth Base tartılarak 500 ml soğuk distile suda çözdürülmüş ve 1.2 atm basınçta, 121 °C’de 15 dakika otoklav ile steril edilmiştir. 50 °C’ ye kadar soğutulmuş 500 ml *Listeria* Fraser Broth Base besiyerine 5 ml steril distile su ile sulandırılmış ferrik amonyum sitrat katkısı eklenerek aseptik koşullarda 10’ ar ml tüplere dağıtılmıştır.

3.6.2.1. *Listeria* Fraser Supplement (Biolife, İtalya)

Listeria türlerinin seçici zenginleştirme aşamasında kullanılan katkı karışımıdır (Kornacki ve diğ., 1993; Fraser ve Sperber, 1988).

Ferrik amonyum sitrat	0.25 g
dH ₂ O	5 ml

1 vial selektif katkı, aseptik koşullar altında 5 ml steril distile suda çözündürülmüştür.

3.6.3. *Listeria* Oxford Agar Base (Biolife, İtalya)

Listeria türlerinin seçici izolasyonu için kullanılan besiyeridir (Kornacki ve diğ., 1993; Fraser ve Sperber, 1988).

Peptokompleks	10.0 g
Triptoz	10.0 g
Pepton	3.0 g
Mısır nişastası	1.0 g
Sodyum klorit	5.0 g
Lityum klorit	15.0 g
Eskülin	1.0 g
Ferrik amonyum sitrat	0.5 g
Agar	12.0 g
dH ₂ O	500 ml

pH: 7.0 ± 0.1

28.7 g *Listeria* Oxford Agar Base besiyeri 500 ml distile suda eritilmiş ve 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. 50 °C' de soğutulmuş besiyerine 5 ml 1:1 etanol-steril distile su ile hazırlanan *Listeria* Oxford antimicrobial supplement çözeltisi aseptik koşullarda eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra Petri kutularına aseptik olarak dağıtılmıştır. Sterilite kontrolü için 30 °C' de 1 gece bekletilmiştir.

3.6.3.1. *Listeria Oxford Antimicrobial Supplement (Biolife-İtalya)*

Listeria türlerinin seçici izolasyonu için kullanılan antimikrobiyal katkı maddesidir.

Sikloheksimit	200 mg
Kolistin sülfat	10.0 mg
Sefotetan	0.1 mg
Fosfomisin	5.0 mg
Akriflavin	2.5 mg
dH ₂ O	2.5 ml
Etil alkol	2.5 ml

Listeria Oxford antimikrobiyal katkı maddesi, aseptik koşullarda 5 ml steril distile suda çözündürülmüştür.

3.6.4. *Listeria Chromogenic Agar Base according to Ottaviani and Agosti (ALOA) ISO (Conda, İspanya)*

Listeria türlerinin selektif izolasyonu ve tanımlamasında kullanılmaktadır (Ottaviani ve diğ., 1997).

Kazeinin enzimatik sindirimi	6.0 g
Glukoz	2.0 g
Bakteriyolojik agar	13.5 g
Magnezyum sülfat	0.5 g
Sodyum klorit	5.0 g
disodyum hidrojen fosfat	2.5 g

Sodyum propiyonat	2.0 g
Maya özütü	10.0 g
Hayvan dokularının enzimatik sindirimi	18.0 g
Lityum klorit	10.0 g
Magnezyum gliserofosfat	1.0 g
5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D- glukopiranosid	0.05 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 7.2 ± 0.2

35.275 g besiyeri 500 ml distile suda çözündürülüp 121 °C’ de 15 dk otoklav ile steril edilmiştir. Besiyeri 70 °C’ye soğutulduktan sonra 1 vial *Listeria* Lipase C Supplement eklenip iyice karıştırılmıştır. Besiyeri sıcaklığı 40 °C’ye kadar düştüğünde steril şartlarda 1 vial *Listeria* Chromogenic Selective Supplement eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra Petri kutularına paylaştırılarak donması beklenmiş ve sterilite kontrolü için 30 °C’ de 1 gece bekletilmiştir.

3.6.4.1. *Listeria* Lipase C Supplement (Conda, İspanya)

Listeria türlerinin seçici izolasyonu için kullanılan antimikrobiyal katkı maddesidir (Ottaviani ve diğ., 1997).

Lipaz C Substrat	10.0 ml
------------------	---------

Aseptik koşullarda 500 ml *Listeria* Chromogenic Agar Base besiyerine 70 °C’deyken 1 vial *Listeria* Lipase C Supplement eklenip iyice karıştırılmıştır.

3.6.4.2. *Listeria* Chromogenic Selective Supplement (Conda, İspanya)

Listeria türlerinin seçici izolasyonu için kullanılan antimikrobiyal katkı maddesidir (Ottaviani ve diğ., 1997).

Nalidiksik asit sodyum tuzu	10.0 mg
Seftazidim	10.0 mg
Sikloheksimit	25.0 mg
Polimiksin B sülfat	38500 (IU)

1 vial *Listeria* Lipaz C katkısı, aseptik koşullarda 6 ml steril distile suda çözündürülmüştür.

3.6.5. Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSA-YE) (Conda, İspanya)

Listeria türlerinin seçici besiyerinden saf kültür olarak elde edilmesi için kullanılmaktadır (Hitchins, 1998).

Kazeinin enzimatik sindirimi	17.0 g
Glukoz	2.5 g
Bakteriyolojik agar	15.0 g
Soya fasulyesi papaik sindirimi	3.0 g
Sodyum klorit	5.0 g
Maya özütü	6.0 g
Dipostasyum hidrojen fosfat	2.5 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 7.3 ± 0.2

51 g Tryptone Soya Yeast Extract Agar 1 litre distile suda ısıtılarak çözündürülmüş 1 dakika boyunca kaynatılıp iyice karıştırıldıktan sonra 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir. Steril edilen besiyeri 45-50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra iyice karıştırılıp Petri kutularına paylaştırılarak donması beklenmiş ve sterilite kontrolü için 30 °C' de 1 gece bekletilmiştir.

3.6.6. Oksidaz Testi Ayıracı

N,N,N',N'-Tetrametil-p- fenilendiamin dihidroklorür	0.1 g
dH ₂ O	10 ml

10 ml distile suya 0.1 g N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride eklenip iyice karıştırılıp çözünmesi sağlanmıştır. Ayıraç taze hazırlanıp ışık geçirmeyecek şekilde dikkatlice sarılmıştır.

3.6.7. Katalaz Testi Ayıracı

Bu ayıraç yapımı için hazır şekilde satılan %3'lük hidrojen peroksit (Dermosept, Türkiye) kullanılmıştır.

3.6.8. Gram Boyama

Kristal Viyole

A Çözeltisi:

Kristal viyole	2.0 g
%96'luk Etil alkol	20.0 ml

B Çözeltisi:

Amonyum oksalat	0.8 g
dH ₂ O	80.0 ml

Hazırlanan A ve B solüsyonları karıştırıldıktan sonra 24 saat geçmesinin ardından süzölmüştür.

Gram İyot Çözeltisi (Lugol)

İyot	1 g
Potasyum iyodür	2 g

dH ₂ O	300 ml
-------------------	--------

İyot ve potasyum iyodür ilk önce 20 ml distile su ile çözündürülüp 280 ml su daha ilave edilip süzölmüştür. Solüsyon koyu renkli şişelere dağıtılmış ve saklanmıştır.

%96' lık Etil Alkol

Saf etil alkol	96.0 ml
----------------	---------

dH ₂ O	4.0 ml
-------------------	--------

Distile su ve etil alkol birbirlerine karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

Sulu Fuksin Çözeltisi

Bazik fuksin (stok)	10 ml
---------------------	-------

dH ₂ O	100 ml
-------------------	--------

Fuksin distile suya eklenerek çözöndürölmüş ve filtre kağıdından süzölmüştür.

3.6.9. %0.85' lık Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Genel amaçlı seyreltme çözeltisi olarak kullanılmaktadır.

NaCl	8.5 g
------	-------

dH ₂ O	1000 ml
-------------------	---------

Distile su ve sodyum klorit iyice karıştırıldıktan sonra 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.6.10. Clark-Lubs Besiyeri

Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri için bakterilerin karbonhidrat metabolizmalarını tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Polipepton	7.0 g
------------	-------

Glukoz	5.0 g
Dipotasyum fosfat	5.0 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 6.9 ± 0.2

1000 ml distile suda iyice çözüldürülerek hazırlanan besiyeri cam tüplere her biri 5'er ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.6.11. Nitrat Besiyeri

Bakterilerin nitratı redükte edebilme yeteneğini tespit etmek için kullanılmaktadır.

Potasyum nitrat	0.2 g
Baktopepton	5.0 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 7.4 ± 0.2

1000 ml distile suda iyice çözüldürülerek hazırlanan besiyeri cam tüplere her biri 10'ar ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.6.12. Sulfate Indole Motility (SIM) Besiyeri (Merck, Almanya)

Bakterilerin hareket yeteneğinin, indol ve H₂S oluşumunun saptanması amacıyla kullanılmaktadır.

Kazein pepton	20.0 g
Et pepton	6.6 g
Amonyum demir(II)sitrat	0.2 g

Sodyum tiyosülfat	0.2 g
Agar	3.0 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 7.3 ± 0.2

30 g besiyeri tartılıp üzerine distile su eklenmesinin ardından homojen şekilde çözündürülüp 10' ar ml olacak şekilde cam tüplere paylaştırılmıştır. 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiş ve sterilite kontrolü için 25 °C'de bir gece bekletilmiştir. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de en fazla iki gün saklanmaktadır.

3.6.13. Muller Hinton Agar (MHA) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Bakterilerin antibiyotik duyarlılık özelliklerini tespit etmek için kullanılmaktadır (Mueller ve Hinton, 1941).

Sığır infüzyon ekstraktı	2.0 g
Nişasta	1.5 g
Kazein hidrolizat	17.5 g
Agar	17.0 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 7.3 ± 0.2

38 g besiyeri 1 litre distile suda ısıtılarak çözündürülmüş 1.2 atm basınçta 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri 45-50 °C ye soğutulup iyice karıştırıldıktan sonra Petri kutularına dağıtılmış, 30 °C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılmasının ardından kullanılmıştır.

3.6.14. Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri

Bakterilerin karbonhidrat metabolizmalarını tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Proteaz pepton	10.0 g
Et özütü	1.0 g
Sodyum klorit	5.0 g
Brom krezol moru	10 ml
dH ₂ O	1000 ml

pH: 6.8 $\pm$ 0.2

16 g besiyeri 1 litre distile suda ısıtılarak çözündürülmüş, 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Besiyeri 45-50 °C' ye soğutulup üzerine aseptik koşullarda 10 ml brom krezol moru eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra tüplere 10 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. 30 °C' de 24 saat sterilite kontrolü yapılmasının ardından kullanılmıştır.

3.6.15. Brom krezol moru

Brom krezol moru	0.02 g
Saf etil alkol	2.5 ml
dH ₂ O	7.5 ml

0.02 g brom krezol morunun 2.5 ml etanolde iyice çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 7.5 ml distile su eklenmiş ve 0.45 μ m por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Hazırlanan çözelti karbonhidrat fermentasyon besiyeri' ne ilave edilinceye kadar +4 °C' de saklanmıştır.

3.6.16. %5'lik Ramnoz, Ksiloz, Mannitol, Riboz, α -Metil-D-mannosit Çözeltileri

Şekerler ayrı ayrı 5' er g tartıldıktan sonra 100 ml distile su ilave edilerek çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltiler 0.22 μ m por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilip, her birinden 0.5 ml alınarak aseptik şartlarda 4.5 ml karbonhidrat fermentasyon besiyerine aktarılmıştır.

3.6.17. Metil Kırmızısı Ayıracı

Metil kırmızısı	0.1 g
Saf etil alkol	300 ml
dH ₂ O	200 ml

Metil kırmızısı boyası etil alkolde seyreltildikten sonra distile su eklenerek karıştırılmıştır.

3.6.18. Voges Proskauer Ayıracı**A ayıracı**

α -naftol	5.0 g
%96'lık Etil alkol	100 ml

B ayıracı

Potasyum hidroksit	40.0 g
dH ₂ O	100 ml

3.6.19. Nitrat Testi Ayıracı**Reagent A**

α -naftilamin	0.25 g
Asetik asit (5N, %30)	200 ml

α -naftilamin üzerine çeker ocak içinde 5N, %30'luk asetik asit ilave edilerek hazırlanmıştır.

Reagent B

Sülfanilik asit	1.0 g
Asetik asit (5N, %30)	125 ml

sülfanilik asit üzerine çeker ocak içinde 5N, %30'luk asetik asit ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.6.20. %5' lik Koyun Kanlı Agar

100 ml olarak hazırlanmış, otoklavlanmış ve uygun sıcaklığa kadar soğutulmuş TSA besiyerine 5 ml koyun kanı steril şartlarda ilave edilip homojenize olana kadar karıştırılmasının ardından Petri kutularına bölüştürülmüştür.

3.6.21. 10 M NaOH

NaOH	10.0 g
------	--------

dH ₂ O	25 ml
-------------------	-------

Distile suda hazırlanan 10 M NaOH 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre kullanılarak steril edilmiştir.

3.6.22. 1 M HCl

%37' lik HCl	8.4 ml
--------------	--------

dH ₂ O	100 m
-------------------	-------

İçinde distile su bulunan behere, %37' lik HCl çok dikkatli bir şekilde çeker ocak içinde yavaş yavaş ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan 1M HCl 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre kullanılarak steril edilmiştir.

3.6.23. 0.5 M EDTA

EDTA	18.1 g
------	--------

dH ₂ O	100 ml
-------------------	--------

pH: 8

18.1 g EDTA temiz bir beherde 70 ml steril distile su ile çözündürülerek HCl ile pH 8'e ayarlanmış ve toplam hacim 100 ml olacak şekilde steril distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve Schott şişesi içinde +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.24. 10x TBE

Trisma Base	108.0 g
Borik asit	9.3 g
EDTA	5.84 g
dH ₂ O	1000 ml

pH: 8.3

108 g Trisma Base, 9.3 g Borik asit, 5.84 g EDTA tartıldıktan sonra üzerine 1000 ml steril bidistile su ilave edilerek homojen olana kadar çözündürülmüş ve 1.2 atm basınçta 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra soğumaya bırakılıp +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.25. 1x TBE

10x TBE stok solüsyonundan 100 ml alınarak içerisinde 900 ml bidistile su bulunan steril Schott şişesine konularak iyice karıştırılmış ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.26. %0.8' lik Agaroz Jel

0.8 g agaroz tartılıp üzerine 50 ml 1x TBE ve 50 ml distile su eklenmiş ve mikrodalgada kaynama noktasına ulaşmamasına dikkat edilerek çözündürülmüştür.

3.6.27. Primer Konsantrasyonu Hazırlanması

Kullandığımız primerler üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda hazırlanmış olup bütün forward ve reverse primerler için 100 µM stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyondan 20 µl alınıp üzerine 80 µl steril ultra saf su eklenmiş ve 1.5 ml' lik mikro santrifüj tüplerinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Aralık 2018-Kasım 2019 tarihleri arasında İstanbul' un 11 ilçesindeki farklı kasaplardan alınan 100 farklı kıyma örneği *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir.

Geleneksel kültür yöntemi ile izole edilen ve biyokimyasal testler ile *L. monocytogenes* olarak tanımlaması yapılan bakterilerin antibiyotik direnç profilleri 13 farklı antibiyotik kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Biyokimyasal testler uygulanarak *L. monocytogenes* olarak tanımlanan bakteriler PZR yöntemi ile *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin varlığı açısından incelenerek *L. monocytogenes* bakterilerinin moleküler olarak doğrulaması yapılmıştır.

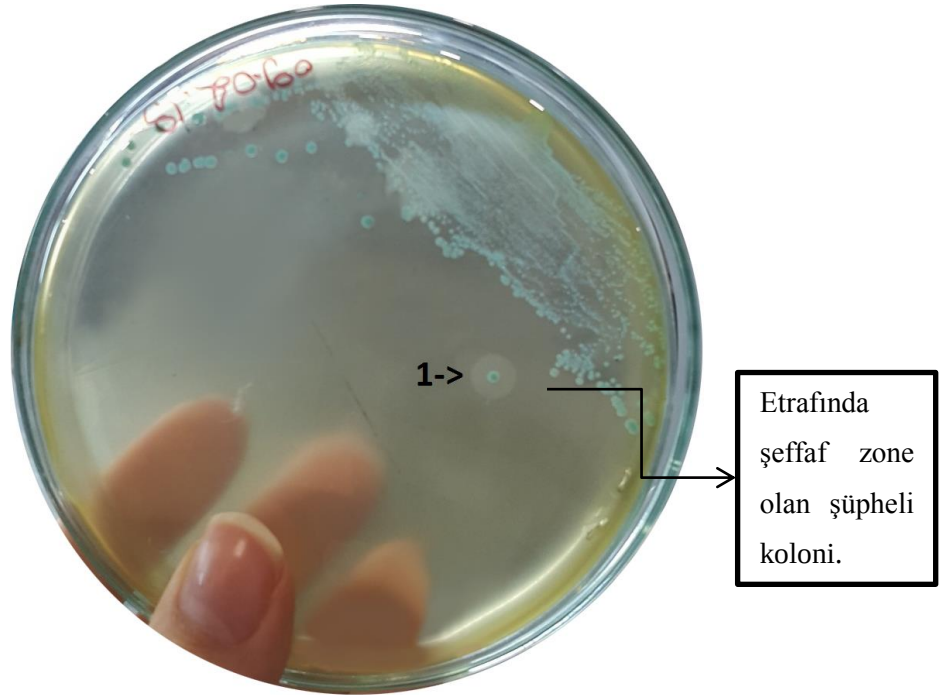
4.1. KIYMA ÖRNEKLERİNDEN *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN KÜLTÜR YÖNTEMİYLE İZOLASYONU

USDA-FSIS metodu ile 100 adet kıyma örneği incelenmiştir. Çalışmada USDA-FSIS yönteminde tavsiye edilen selektif katkılı (sikloheksimit, kolistin sülfat, sefotetan, fosfomisin, akriflavin) MOX besiyeri yanı sıra selektif katkılı (Lipaz C substrat ve nalidiksik asit sodyum tuz, seftazidim, sikloheksimit, polimiksin B sülfat) eklenmiş Agar *Listeria* Ottaviani & Agosti (ALOA) besiyeri de kullanılmıştır.

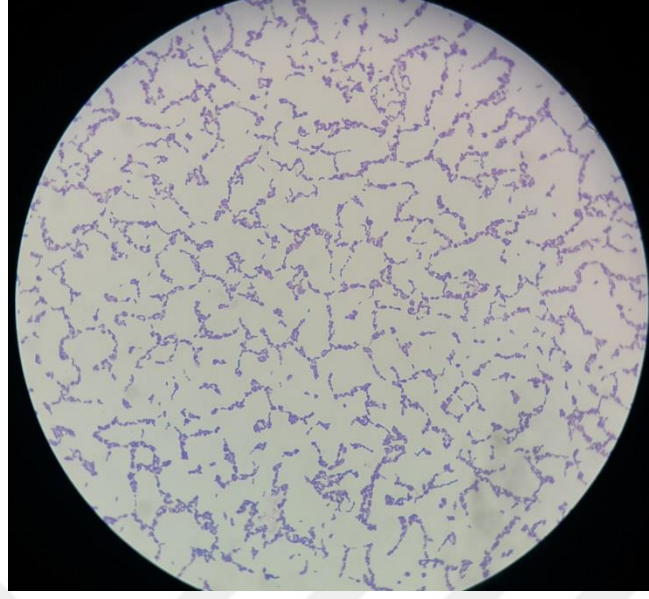
MOX besiyerinde gri renkli hafif bombeli etrafı eskülin hidrolizi sonucunda siyahlaşmış olan yaklaşık 1 mm boyutunda 458 (Şekil 4.1), ALOA besiyerinde ise yeşil renkli hafif bombeli etrafında açık renk zon bulunan 111 (Şekil 4.2) olmak üzere toplam 569 *L. monocytogenes* şüpheli koloni seçilmiştir.



Şekil 4.1: *L. monocytogenes* şüpheli kolonilerin (1, 2, 3) MOX besiyerinde görünümü.



Şekil 4.2: *L. monocytogenes* şüpheli kolonilerin (1) ALOA besiyerinde görünümü.



Şekil 4.3: *L. monocytogenes* şüpheli bakterilerin Gram boyama sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.

Seçilen 569 *L. monocytogenes* şüpheli koloninin TSA-YE besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek saf kültürleri elde edilmiştir. *L. monocytogenes* şüpheli 569 koloni içerisinde Gram pozitif çomak veya kokobasil (Şekil 4-3), katalaz reaksiyonu pozitif, oksidaz reaksiyonu negatif özellik gösteren 186 izolat elde edilmiştir. *L. monocytogenes* şüpheli 186 izolatın hangi besiyerinden izole edildiği Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Besiyerlerine göre *L. monocytogenes* şüpheli izolat sayısı.

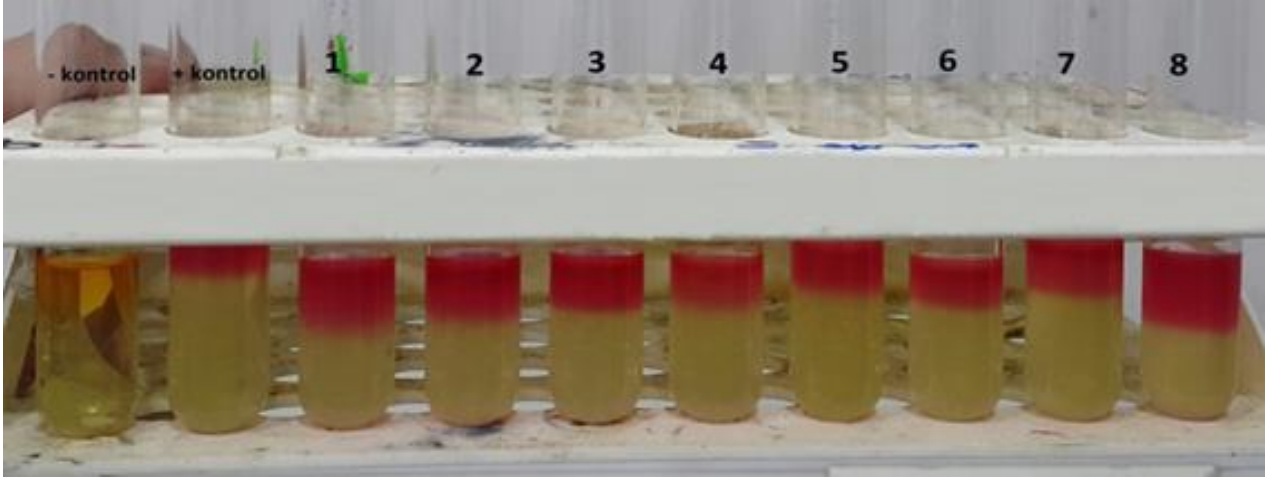
Ön Zenginleştirme Basamağı	Seçici Besiyeri	Ayrt Edici Katı Besiyeri	Şüpheli İzolat Sayısı
Ön zenginleştirme	UVM Broth	MOX	67
		ALOA	14
Seçici zenginleştirme	Fraser Broth	MOX	73
		ALOA	32

Tablo 4.1 incelendiğinde ön zenginleştirme ve seçici zenginleştirme besiyerinden MOX besiyerine ekim yapıldıktan sonra elde edilen *L. monocytogenes* şüpheli izolat sayısının (67,73) ön zenginleştirme ve ikincil zenginleştirme besiyerinden ALOA besiyerine ekim yapıldıktan sonra elde edilen izolat sayısından (14,32) fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca seçici zenginleştirme besiyeri olan Fraser Broth besiyerinden iki seçici katı besiyerine ekim yapıldıktan sonra elde edilen *L. monocytogenes* şüpheli izolat sayısının (105) da UVM Broth besiyeri sonrası yapılan ekimlerden izole edilenlere (81) göre yüksek olduğu saptanmıştır.

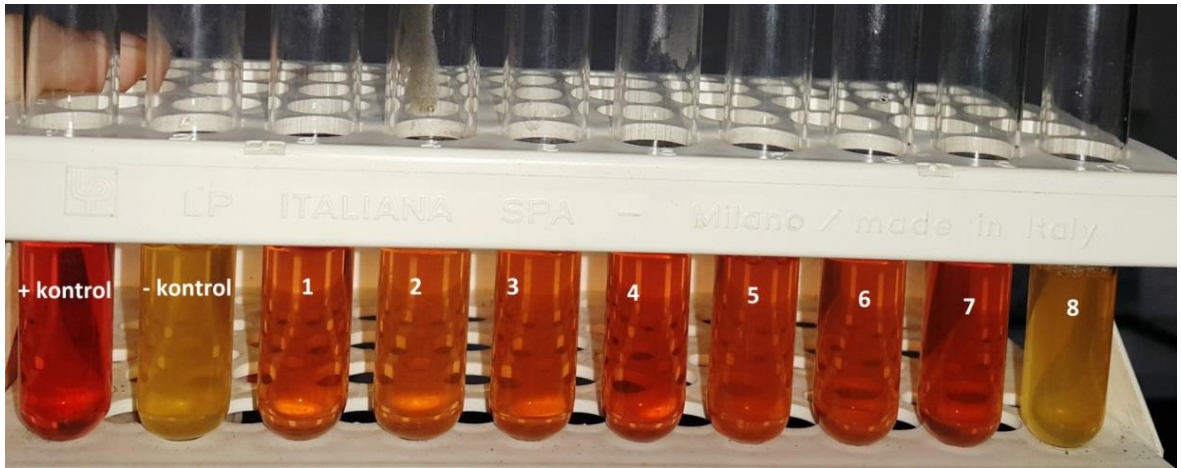
4.2. BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI

Çalışmamızda kıyma örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes* şüpheli 186 suş MR-VP reaksiyonu, nitrat redüksiyonu, SIM besiyerinde hareket, karbonhidrat fermentasyonu (ramnoz, riboz, ksiloz, α -metil-D-mannosit ve mannitol), CAMP ve hemoliz testleri açısından incelenmiştir.

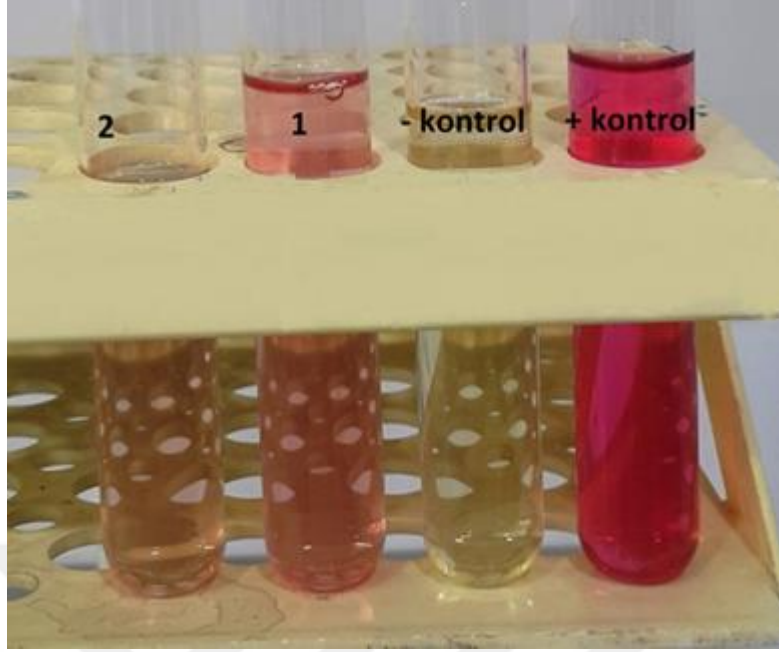
MR-VP (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5), nitrat indirgenmesi (Şekil 4.6) ve hareket (Şekil 4.7) bakımından *L. monocytogenes* ile benzerlik gösteren 136 şüpheli izolatın 52' sinin aynı zamanda şeker fermentasyonu (Şekil 4.8) bakımından benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Daha sonra CAMP (Şekil 4.9) ve hemoliz testi (Şekil 4.10) sonucunda 17 farklı kıyma örneğinden izole edilen 21 suş *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.4: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların MR testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: 1-8 (KA 75/1, KA 76/3, KA 77/1, KA 77/2, KA 78/2, KA 79/1, KA 80/1, KA 80/3), + kontrol: *E. coli*, - kontrol: *Klebsiella* spp.



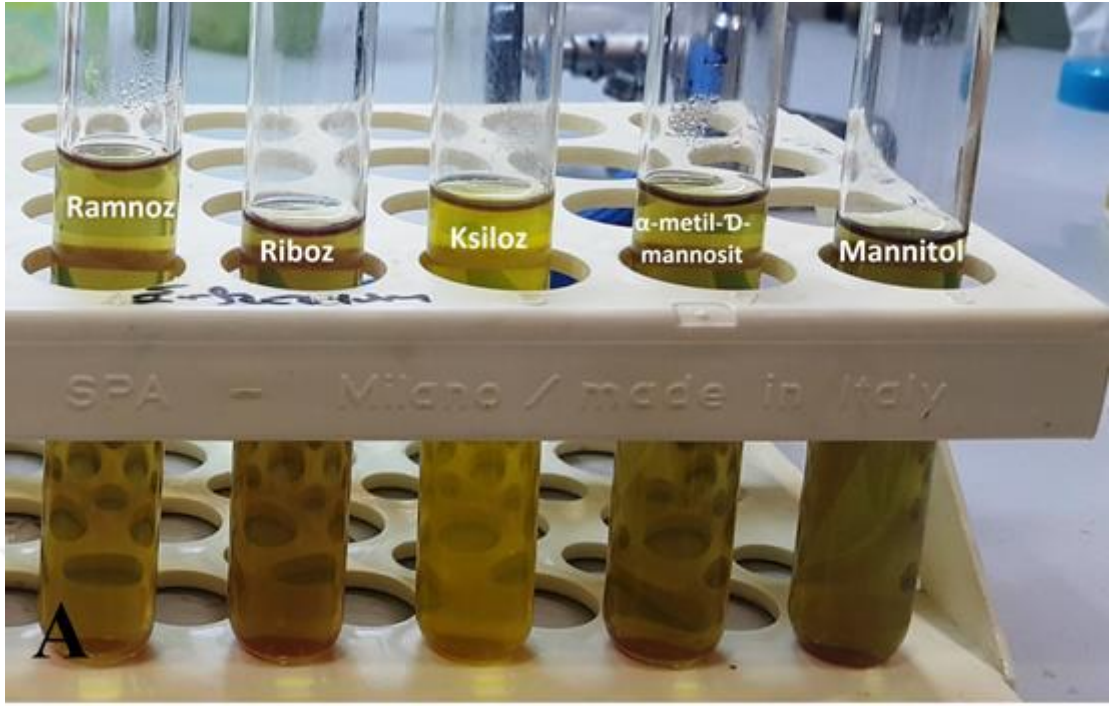
Şekil 4.5: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların VP testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: 1-7 (KA 11/1, KA 11/2, KA 1/2, KA 1/3, KA 1/5, KA 3/2, KA 7/3), Negatif reaksiyon: 8 (KA 9/1), + kontrol: *E. coli*, - kontrol: *Klebsiella* spp.



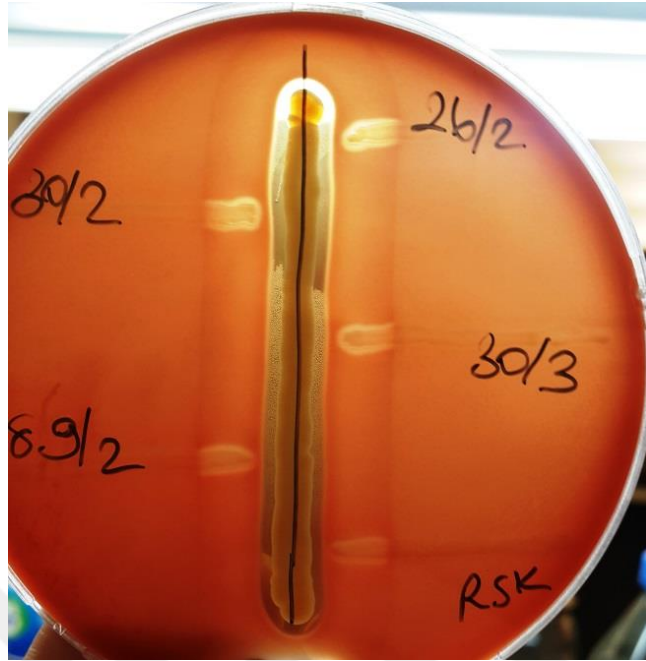
Şekil 4.6: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların nitrat redüksiyon testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: 1,2 (KA 30/4, KA 36/1), + kontrol: *P. aeruginosa*, - kontrol: *L. monocytogenes* RSKK 475.



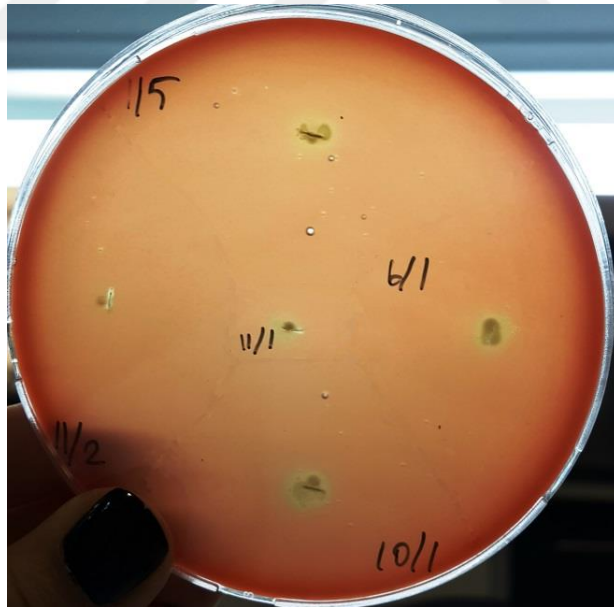
Şekil 4.7: *L. monocytogenes* şüpheli izolatın SIM besiyerinde şemsiye şeklindeki hareketi (KA 12/2).



Şekil 4.8: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların karbonhidrat fermentasyon testi sonuçları. A) Pozitif reaksiyon: (KA 1/2), B) Negatif reaksiyon: (KA 49/1).



Şekil 4.9: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların CAMP testi sonuçları. Pozitif reaksiyon: KA 26/2, KA 30/2, KA 30/3, KA 89/2; + kontrol: *L. monocytogenes* RSKK 475.



Şekil 4.10: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların hemoliz testi sonuçları. β hemoliz pozitif reaksiyon: KA 11/2, α hemoliz pozitif reaksiyon: KA 1/5, KA 6/1, KA 10/1, KA 11/1.

Tablo 4.2: *L. monocytogenes* şüpheli izolatların biyokimyasal test sonuçları.

İzolat No	Toplanan İlçe	İzole Edilen Besiyeri	MR	VP	Nitrat İndirgenmesi	Hareket	Mannitol	Riboz	Ramnoz	Ksiloz	α -Metil-Dmannosit	CAMP	Hemoliz Çeşidi
KA 1/5	Tuzla	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 6/1	Tuzla	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 10/1	Eyüp	U-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 11/1	Kadıköy	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 11/2	Kadıköy	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 12/1	Kadıköy	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 12/2	Kadıköy	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 12/3	Kadıköy	U-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 12/4	Kadıköy	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 14/1	Fatih	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 16/1	Bakırköy	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 16/2	Bakırköy	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 16/4	Bakırköy	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 17/2	Kartal	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 17/3	Kartal	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 19/2	Şişli	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 20/2	Beşiktaş	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 20/4	Beşiktaş	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 21/2	Şişli	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 23/2	Şişli	U-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 24/1	Beşiktaş	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 26/1	Bakırköy	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 26/2	Bakırköy	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 26/4	Bakırköy	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 27/1	Bakırköy	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 28/1	Bakırköy	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α

F: Fraser broth, U: UVM broth, M: MOX, A: ALOA

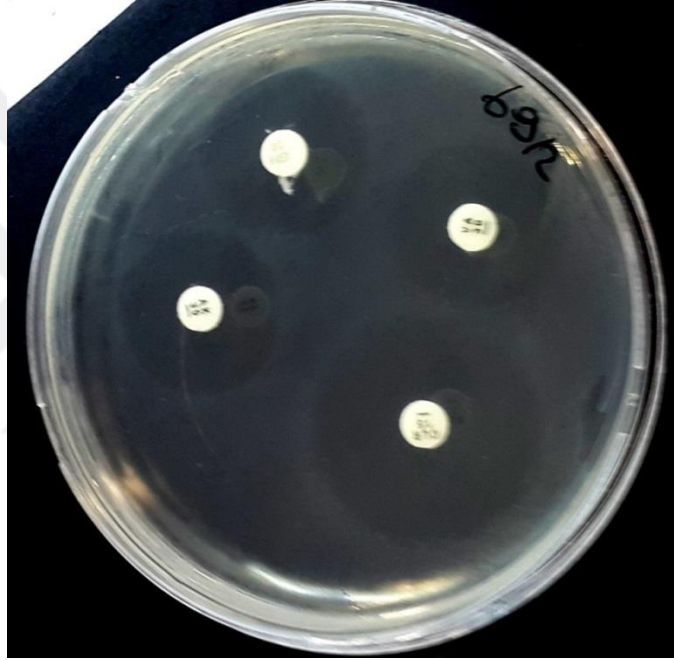
Tablo 4.2 (devam): *L. monocytogenes* şüpheli izolatların biyokimyasal test sonuçları.

İzolat No	Toplanan İlçe	İzole Edilen Besiyeri	MR	VP	Nitrat indirgenmesi	Hareket	Mannitol	Riboz	Ramnoz	Ksiloz	α -Metil-Dmannosit	CAMP	Hemoliz Çeşidi
KA 28/2	Bakırköy	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 30/2	Avcılar	U-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 30/3	Avcılar	U-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 32/1	Avcılar	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 35/1	Avcılar	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 35/2	Avcılar	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 42/1	Fatih	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 42/2	Fatih	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 45/1	Maltepe	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 48/2	Kartal	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 55/2	Kadıköy	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 63/2	Fatih	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 66/1	Fatih	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 69/1	Fatih	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 69/2	Fatih	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 71/1	Üsküdar	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 71/4	Üsküdar	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 72/1	Üsküdar	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 79/1	Beşiktaş	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 79/2	Beşiktaş	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 80/2	Beşiktaş	F-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 84/1	Tuzla	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 88/1	Tuzla	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	α
KA 89/2	Tuzla	F-A	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 90/1	Tuzla	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β
KA 95/1	Tuzla	U-M	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	β

F: Fraser broth, U: UVM broth, M: MOX, A: ALOA

4.3. *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ SAPTANMASI

Kıymalardan izole edilen ve klasik tanı yöntemleri ile *L. monocytogenes* olarak tanımlanan bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmış ve NCCLS (M31-A3/2010)'deki standartlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-12, Tablo 4.3).



Şekil 4.11: *L. monocytogenes* bakterisinin antibiyotik duyarlılık testi sonuçları (KA 69/2).

Tablo 4.3: *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik zon çapları.

İzole edilen <i>L. monocytogenes</i> bakterileri												
Antibiyotik	KA 11/1	KA 11/2	KA 12/1	KA 14/1	KA 17/2	KA 19/2	KA 21/2	KA 23/2	KA 26/1	KA 26/2	KA 26/4	
AMP	21.75 ± 2.0	22.25 ± 1.2	22.5 ± 1.7	23.0 ± 0	24.25 ± 0.5	24.25 ± 0.9	24.0 ± 0.8	22.75 ± 1.5	24.5 ± 1.24	23.75 ± 0.9	19.5 ± 5.1	
P	25.0 ± 1.4	24.5 ± 1.2	23.5 ± 2.3	22.25 ± 0.9	28.5 ± 1.2	25.5 ± 1.2	20.25 ± 2.2	12.75 ± 0.7	24.5 ± 1.9	22.5 ± 1.0	22.25 ± 5.1	
AMC	25.25 ± 3.0	24.75 ± 2.0	22.75 ± 2.6	25.0 ± 2.4	28.5 ± 1.2	26.25 ± 0.9	11.0 ± 2.8	23.0 ± 6.4	23.0 ± 2.4	22.25 ± 2.8	24.75 ± 2.0	
CEC	19.0 ± 0.5	18.0 ± 0.8	20.0 ± 0	18.5 ± 1.2	19.5 ± 1.2	21.25 ± 0.5	9.25 ± 0.7	23.0 ± 2.1	20.25 ± 0.5	19.5 ± 0.5	21.25 ± 0.5	
VA	17.0 ± 3.5	20.5 ± 0.5	19.5 ± 0.5	20.75 ± 0.9	20.0 ± 0.8	20.75 ± 0.9	20.0 ± 0	10.0 ± 0	20.25 ± 0.5	21.25 ± 0.5	20.25 ± 0.5	
AK	23.0 ± 1.5	22.5 ± 1.0	20.25 ± 0.9	20.25 ± 3.2	23.0 ± 1.4	23.5 ± 1.9	22.75 ± 2.2	21.0 ± 0.8	20.75 ± 0.9	22.0 ± 0.82	22.5 ± 1.91	
CN	22.0 ± 1.8	21.5 ± 1.7	21.5 ± 0.5	19.75 ± 0.5	22.75 ± 1.2	21.5 ± 1.7	19.5 ± 1.2	21.75 ± 1.2	22.5 ± 0.5	21.25 ± 1.0	20.5 ± 3.0	
CLR	25.0 ± 2.1	26.25 ± 2.6	27.25 ± 3.2	24.5 ± 1.9	27.5 ± 1.7	25.25 ± 3.3	24.0 ± 4.6	30.0 ± 0	28.75 ± 2.2	26.0 ± 1.1	23.5 ± 3.5	
TE	24.5 ± 1.0	25.5 ± 1.9	30.0 ± 4.6	21.5 ± 3.6	25.25 ± 0.9	24.25 ± 2.2	22.5 ± 1.7	24.5 ± 0.5	21.25 ± 4.8	24.25 ± 0.9	24.75 ± 3.3	
CIP	20.0 ± 0.5	22.75 ± 0.9	22.5 ± 1.0	23.0 ± 0	23.25 ± 0.9	24.25 ± 0.9	22.25 ± 0.5	23.5 ± 0.5	21.75 ± 8.4	21.75 ± 1.7	24.75 ± 1.7	
C	21.5 ± 1.0	22.0 ± 0	23.75 ± 1.8	22.0 ± 0	23.0 ± 2.1	26.0 ± 1.4	11.5 ± 0	31.5 ± 0.7	27.25 ± 1.2	27.0 ± 1.1	20.75 ± 4.5	
RD	24.0 ± 0.5	26.0 ± 0.8	26.0 ± 0.8	21.5 ± 1.2	2.05 ± 0.8	23.75 ± 1.8	22.75 ± 0.9	25.25 ± 0.5	23.25 ± 1.5	22.75 ± 1.2	26.75 ± 0.5	
SXT	10.0 ± 0	25.5 ± 4.0	23.5 ± 0.5	23.0 ± 1.1	22.75 ± 0.9	28.0 ± 2.9	28.25 ± 1.2	28.25 ± 2.2	18.0 ± 4.0	27.25 ± 1.7	21.0 ± 7.3	

AMP: Ampisilin, P: Penisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit, CEC: Sefaklor, VA: Vankomisin, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, CLR Klatitromisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, RD: Rifampisin, C: Kloramfenikol SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, ±: standart sapma.

Tablo 4.3 (devam): *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik zon çapları.

İzole edilen <i>L. monocytogenes</i> bakterileri										
Antibiyotik	KA 30/2	KA 30/3	KA 45/1	KA 55/2	KA 69/2	KA 72/1	KA 79/2	KA 89/2	KA 90/1	KA 95/1
AMP	23.0 ± 2.4	22.5 ± 1.9	21.5 ± 0.7	24.75 ± 0.5	25.0 ± 1.6	24.5 ± 0.5	24.75 ± 1.1	20.5 ± 0.5	20.0 ± 0	27.25 ± 2.5
P	24.0 ± 0.5	21.75 ± 1.7	23.0 ± 1.4	21.25 ± 0.5	25.25 ± 0.9	22.75 ± 1.2	25.0 ± 1.6	21.0 ± 1.4	18.25 ± 1.5	24.25 ± 0.9
AMC	23.0 ± 2.0	25.25 ± 2.6	29.0 ± 0	22.75 ± 3.2	29.25 ± 1.5	26.25 ± 1.7	28.0 ± 1.4	13.5 ± 1.2	16.0 ± 4.0	21.5 ± 1.9
CEC	19.0 ± 2.0	19.25 ± 0.9	19.0 ± 0	19.0 ± 0.8	20.5 ± 3.5	18.5 ± 1.0	19.75 ± 1.2	15.75 ± 2.2	10.5 ± 0.5	21.5 ± 1.2
VA	20.5 ± 0.5	19.75 ± 1.2	19.0 ± 0.8	20.25 ± 0.5	21.25 ± 1.2	22.5 ± 0.5	22.75 ± 2.5	18.75 ± 2.2	12.25 ± 0.5	19.0 ± 1.6
AK	23.0 ± 0.9	20.25 ± 0.9	18.25 ± 2.2	21.0 ± 0.8	24.25 ± 0.9	21.75 ± 2.2	20.0 ± 0	20.0 ± 2.8	11.0 ± 0.8	26.0 ± 1.6
CN	22.5 ± 0.5	21.5 ± 0.5	18.75 ± 5.9	21.5 ± 1.0	24.0 ± 1.1	20.75 ± 0.5	21.5 ± 1.0	21.5 ± 3.7	12.25 ± 0.5	26.75 ± 2.2
CLR	27.0 ± 2.2	24.25 ± 1.5	23.75 ± 1.2	25.0 ± 0.8	29.5 ± 1.0	26.25 ± 0.9	25.75 ± 0.9	22.0 ± 0.8	19.0 ± 1.4	24.0 ± 1.4
TE	25.0 ± 0.5	22.25 ± 1.7	23.75 ± 1.2	23.75 ± 1.7	26.25 ± 0.9	24.5 ± 3.0	21.0 ± 0.8	20.75 ± 0.5	20.5 ± 1.2	25.5 ± 1.7
CIP	23.0 ± 1.5	22.5 ± 1.9	22.75 ± 1.2	21.25 ± 1.2	24.75 ± 1.2	23.75 ± 1.5	24.75 ± 2.6	20.0 ± 0.8	11.5 ± 1.9	24 ± 1.1
C	25.0 ± 0.9	24.75 ± 2.0	25.5 ± 1.2	24.5 ± 1.0	23.5 ± 1.0	22.75 ± 0.9	22.0 ± 0.8	24.75 ± 0.5	20.25 ± 0.5	23.5 ± 1.7
RD	23.0 ± 0	22.75 ± 1.2	22.75 ± 1.2	25.0 ± 0	24.75 ± 1.2	23.5 ± 2.3	20.75 ± 0.9	23.0 ± 0.8	14.5 ± 2.3	25.75 ± 1.4
SXT	24.5 ± 1.0	23.25 ± 1.7	23.25 ± 1.7	26.5 ± 1.7	33.7 5 ± 1.5	29.25 ± 0.9	23.0 ± 2.0	21.25 ± 1.0	7.75 ± 0.7	25.25 ± 2.2

AMP: Ampisilin, P: Penisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit, CEC: Sefaktor, VA: Vankomisin, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, CLR Klaritromisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, RD: Rifampisin, C: Kloramfenikol SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, ±: standart sapma.

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde, 21 bakteriden birinin sadece trimetoprim-sulfametoksazol'a (KA11/1), birinin Amoksisilin/Klavulanik asit' e (KA 89/2), birinin penisilin ve vankomisine (KA 23/2), birinin amoksisilin/klavulanik asit, sefaklor, kloramfenikol (KA 21/2), birinin de penisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefaklor, vankomisin, amikasin, gentamisin, siprofloksasin ve rifampisin (KA 90/1) antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Tablo 4.4 incelendiğinde, 21 *L. monocytogenes* bakterisinden altısının (KA 12/1, KA 19/2, KA 26/1, KA 26/4, KA 69/2, KA 95/1) incelenen 13 antibiyotikten 13' üne de duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 21 *L. monocytogenes* bakterilerinin hepsinin ampisilin ve tetrasiklin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.4: *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları.

İzolat Kodu:	Antibiyotik:												
	AMP	P	AMC	CEC	VA	AK	CN	CLR	TE	CIP	C	RD	SXT
KA 11/1	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Di
KA 11/2	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 12/1	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 14/1	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 17/2	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 19/2	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 21/2	Du	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Di	Du	Du
KA 23/2	Du	Di	Du	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 26/1	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 26/2	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 26/4	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 30/2	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 30/3	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 45/1	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 55/2	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 69/2	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 72/1	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 79/2	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
KA 89/2	Du	Du	Di	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du
KA 90/1	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Yd	Du	Di	Du	Di	Di
KA 95/1	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du

AMP: Ampisilin, P: Penisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit, CEC: Sefaklor, VA: Vankomisin, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, CLR Klaritromisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, C: Kloramfenikol, RD: Rifampisin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, Di: Dirençli, Yd: Yarı duyarlı, Du: Duyarlı.

Tablo 4.5: *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	n (%)		
	Dirençli	Yarı Duyarlı	Duyarlı
AMP	-	-	21 (100)
P	2 (9.52)	-	19 (90.47)
AMC	3 (14.28)	-	18 (85.71)
CEC	2 (9.52)	12 (57.14)	7 (33.33)
VA	2 (9.52)	-	19 (90.47)
AK	1 (4.76)	-	20 (95.23)
CN	1 (4.76)	-	20 (95.23)
CLR	-	1 (4.76)	20 (95.23)
TE	-	-	21 (100)
CIP	2 (9.52)	1 (4.76)	18 (85.71)
C	1 (4.76)	-	20 (95.23)
RD	1 (4.76)	-	20 (95.23)
SXT	2 (9.52)	-	19 (90.47)

AMP: Ampisilin, P: Penisilin AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit, CEC: Sefaklor, VA: Vankomisin, AK: Amikasin, CN: Gentamisin CLR Klaritromisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, C: Kloramfenikol, RD: Rifampisin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol n: Bakteri sayısı, %: Yüzde.

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde, *L. monocytogenes* bakterilerin Amoksisilin/Klavulanik asit (%14.28), penisilin (%9.52), sefaklor (%9.52), vankomisin (%9.52), siprofloksasin (%9.52) ve trimetoprim-sulfametoksazol (%9.52)' a karşı dirençli, ampisilin (% 100) ve tetrasiklin (% 100)' e karşı ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.6: *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri.

Direnç Profili No	Çoklu Direnç Profili	Dirençli Antibiyotik Sayısı
KA (11/1)	SXT	1
KA (89/2)	AMC	1
KA (23/2)	P, VA	2
KA (21/2)	AMC, CEC, C	3
KA (90/1)	P, AMC, CEC, VA, AK, CN CIP, RD, SXT	9

P: Penisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik asit, CEC: Sefaklor, VA: Vankomisin, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, C: Kloramfenikol, RD: Rifampisin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol .

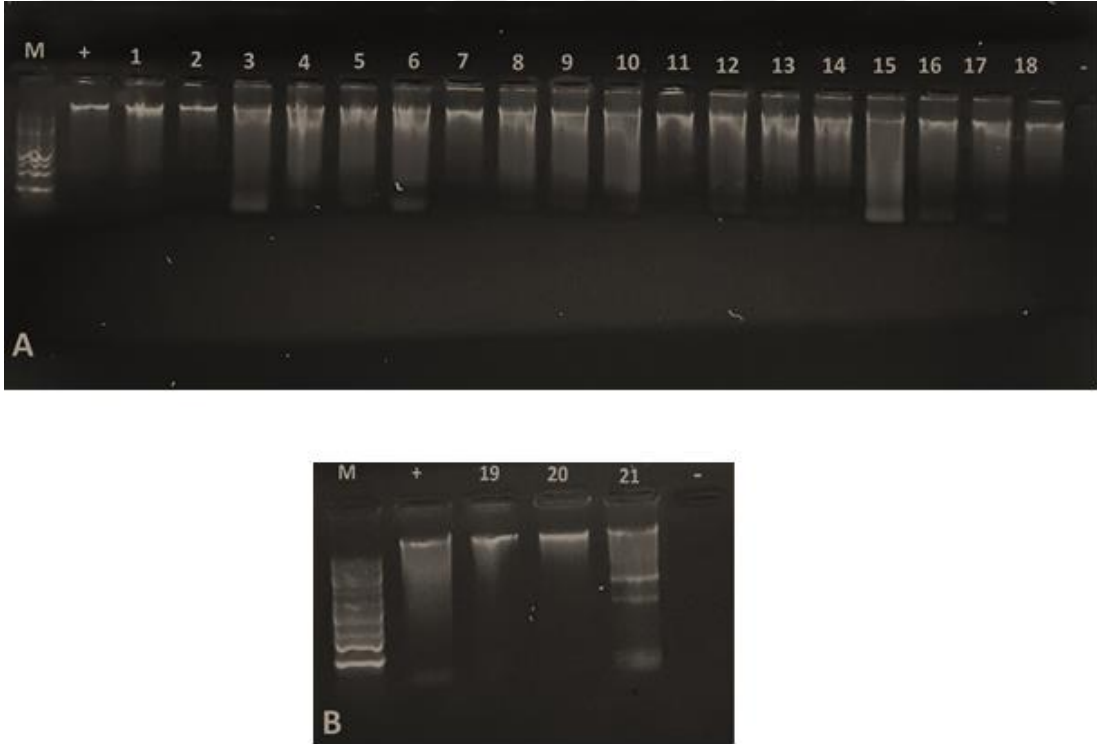
Tablo 4.6 incelendiğinde KA 11/1 ve KA 89/2 numaralı bakterilerin sadece 1 antibiyotiğe (sırasıyla SXT ve AMC) dirençli olup çoklu direnç göstermediği, KA 23/2 numaralı bakterinin 2 antibiyotiğe (P, VA) karşı dirençli olduğu, KA (21/2) numaralı bakterinin 3 antibiyotiğe (AMC, CEC, C) ve KA90/1 numaralı bakterinin ise 9 antibiyotiğe (P, AMC, CEC, VA, AK, CN, CIP, RD, SXT) karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

4.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ

4.4.1. *Listeria monocytogenes* Bakterilerinin PZR Uygulaması ile Doğrulanması

4.4.1.1. DNA Eldesi

Kıyma örneklerinden izole edilen ve *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 21 *L. monocytogenes* bakterisinden GeneAll Exgene™ Clinic SV DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmış ve örnekler jel elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile elde edilen *L. monocytogenes* bakterilerine ait genomik DNA'ların jeldeki görüntüsü. A) M: 1 Kb DNA marker. 1-18: *L. monocytogenes* şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol. B) M: 1 Kb DNA marker. 19-21: *L. monocytogenes* bakterileri. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol.

4.4.1.2. PZR Yöntemi Sonuçları

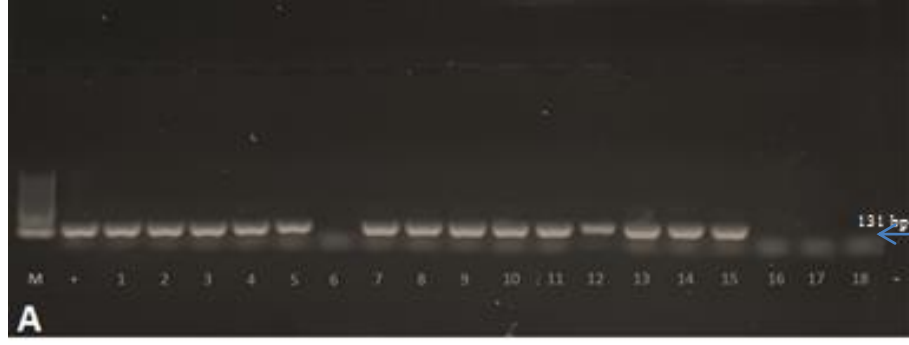
Geleneksel kültür yöntemi ile izole edilen ve biyokimyasal yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 21 suşun moleküler olarak doğrulanması için tüm *Listeria* türlerinde

bulunan invaziflikle ilgili gen olan 131 bp uzunluğundaki *iap* geni PZR yöntemi incelenmiştir. PZR sonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi işlemiyle, GelRed floresan boya kullanılarak UV görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

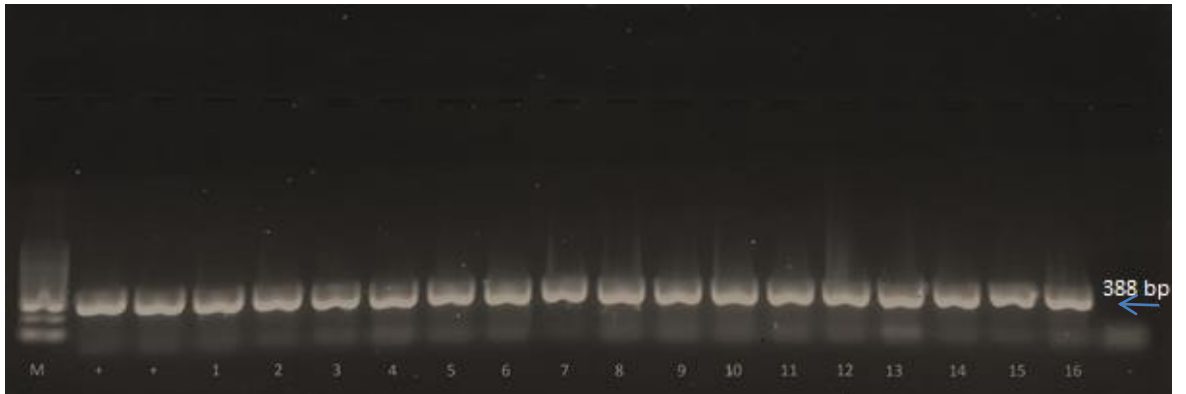
Şekil 4.13 incelendiğinde, kıyma örneklerinden izole edilen biyokimyasal yöntemlerle *L. monocytogenes* olduğu doğrulanan 21 bakteriden 16’sının (KA 11/1, KA 11/2, KA 12/1, KA 17/2, KA 19/2, KA 21/2, KA 23/2, KA 26/1, KA 26/2, KA 26/4, KA 30/2, KA 30/3, KA 45/1, KA 55/2, KA89/2 ve KA 95/1) *iap* gen bölgesine sahip olduğu, beşinin (KA 14/1, KA 69/2, KA 72/1, KA 79/2 ve KA 90/1) ise *iap* gen bölgesine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Fenotipik yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 21 bakteriden 16’sının PZR yöntemi ile *Listeria* spp. olduğu saptanmıştır. 100 bp ladder ile, elde ettiğimiz PZR ürünlerinin uzunluğu 131 bp olarak tespit edilmiştir.

PZR yöntemi ile *iap* geni varlığı açısından incelenen ve *Listeria* spp. olduğu moleküler olarak doğrulanan bakteriler, *L. monocytogenes*’ e özgü listeriolysin O toksinini kodlayan gen olan 388 bp uzunluğundaki *hlyA* geni PZR yöntemi ile incelenmiştir. PZR sonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi işlemiyle, GelRed floresan boya kullanılarak UV görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.14’te gösterilmiştir. 100 bp ladder ile elde ettiğimiz PZR ürünlerinin uzunluğu 388 bp olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.14 incelendiğinde, *hlyA* gen varlığı açısından incelenen ve *Listeria* spp. olarak saptanan 16 bakterinin (KA 11/1, KA 11/2, KA 12/1, KA 17/2, KA 19/2, KA 21/2, KA 23/2, KA 26/1, KA 26/2, KA 26/4, KA 30/2, KA 30/3, KA 45/1, KA 55/2, KA89/2 ve KA 95/1) *hlyA* gen bölgesine sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.13: Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin *iap* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüleri. A) M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 1: KA 26/2. 2: KA 11/1. 3: KA 45/1. 4: KA 11/2. 5: KA 12/1. 6: KA 14/1.7: KA 17/2. 8: KA 19/2. 9: KA 21/2. 10: KA 23/2. 11: KA 26/1. 12: KA 26/4.13: KA 30/2. 14: KA 30/3. 15: KA 55/2. 16: KA 69/2. 17: KA 72/1. 18: KA 79/2. -: Negatif kontrol. B) M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 19: KA 89/2. 20: KA 90/1. 21: KA 95/1. -: Negatif kontrol.



Şekil 4.14: Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin *hlyA* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 1: KA 11/1. 2: KA 11/2. 3: KA 12/1. 4: KA 17/2. 5: KA 19/2. 6: KA 21/2. 7: KA 23/2. 8: KA 26/1. 9: KA 26/2. 10: KA 26/4. 11: KA 30/2. 12: KA 30/3. 13: KA 45/1. 14: KA 55/2. 15: KA 89/2. 16: KA 95/1. -: Negatif kontrol.

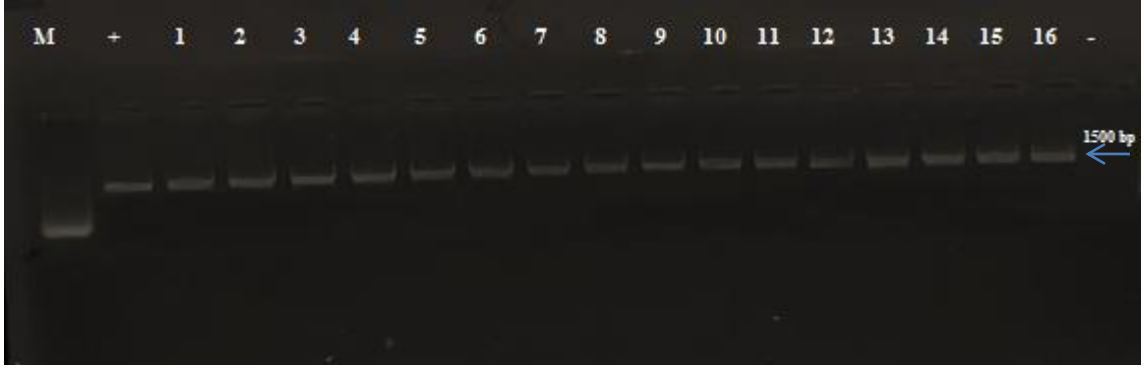
Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile izole edilen *L. monocytogenes* şüpheli bakterilerin *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin incelenmesinin ardından 7 farklı ilçedeki kasaplardan alınan 12 farklı kıyma örneğinden elde edilmiş 16 izolatin *L. monocytogenes* olduğu doğrulanmıştır. Kıyma örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin besiyerlerine göre dağılımları Tablo 4.7’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Kıyma örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin besiyerlerine göre dağılımı.

Ön Zenginleştirme Basamağı	Seçici Besiyeri	Ayırt Edici Katı Besiyeri	<i>L. monocytogenes</i> sayısı
Ön zenginleştirme	UVM Broth	MOX	1
		ALOA	3
Seçici zenginleştirme	Fraser Broth	MOX	4
		ALOA	8

4.4.2. *Listeria* Cinsi Bakterilerin Filogenetik Analizi

Kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile elde edilen *L. monocytogenes* şüpheli bakterilerinin *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin incelenmesinin ardından *L. monocytogenes* oldukları tespit edilen 16 farklı izolatin 1500 bp uzunluğundaki *16S rRNA* geni PZR yöntemi incelenmiştir. PZR sonunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroferezi işlemiyle, GelRed floresan boya kullanılarak UV görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.15’te gösterilmiştir. 100 bp ladder ile elde ettiğimiz PZR ürünlerinin uzunluğu 1500 bp olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.15: *hlyA* gen bölgesinin tespiti ile *L. monocytogenes* olduğu belirlenen bakterilerin 16S *rRNA* genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). 1: KA 11/1. 2: KA 11/2. 3: KA 12/1. 4: KA 17/2. 5: KA 19/2. 6: KA 21/2. 7: KA 23/2. 8: KA 26/1. 9: KA 26/2. 10: KA 26/4. 11: KA 30/2. 12: KA 30/3. 13: KA 45/1. 14: KA 55/2. 15: KA89/2. 16: KA 95/1. -: Negatif kontrol.

Kıymalardan elde edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin 16S *rRNA* gen bölgesini tespit edilmesi için 16S *rRNA* primerleriyle elde edilen PZR örnekleri sekans için BM Laboratuvar Sistemlerine (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. Sekans analizi ardından elde edilen 16S *rRNA* dizileri NCBI BLAST programı ile GenBank veritabanına dayalı olarak tanımlanmış ve sıralanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen *L. monocytogenes* 16S *rRNA* dizileri GenBank'a kaydedilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Kıyma örneklerinden elde edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin erişim numaraları.

Suş No	% Benzerlik	Erişim No
KA 11/1	%100	MT633093
KA 11/2	%99	MT633094
KA 12/1	%100	MT633095
KA 17/2	%100	MT633096
KA 19/2	%99	MT633097
KA 21/2	%100	MT633098
KA 23/2	%100	MT633099
KA 26/1	%100	MT633100
KA 26/2	%99	MT633101
KA 26/4	%100	MT633102
KA 30/2	%100	MT633103
KA 30/3	%100	MT633104
KA 45/1	%99	MT633105
KA 55/2	%99	MT633106
KA 89/2	%100	MT633107
KA 95/1	%100	MT633108

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Taze et, kimyasal ve fiziksel özellikleri sebebiyle mikroorganizmaların gelişimi ve çoğalması için oldukça elverişli bir ortam sağlamaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda kıymalarda *E. coli*, total koliform bakteriler, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, maya ve küfler gibi mikroorganizmaların bulunabileceği saptanmıştır (Sancak ve diğ., 1993; Başkaya ve diğ., 2004; Öztürk, 2007; Aydemir Atasever ve Atasever, 2015). *Listeria* insan ve hayvanlarda listeriosiz etkenidir. *Listeria* cinsi bakteriler içinde patojenitesi en yüksek tür olan *L. monocytogenes*' in kıyma dahil olmak üzere gıdalarda hiçbir şekilde bulunmasına izin verilmemektedir. Uygun şartlar altında saklanmayan kıymaların düşük derecelerde üreyebilen *L. monocytogenes* bakterilerini içermesi sonucu insanlarda, menenjit, ensefalit, düşük ve bazı durumlarda ölüme dahi yol açabilecek listeriozis enfeksiyonuna neden olduğu bilinmektedir (Ray, 1997).

Gıdalarda *L. monocytogenes* varlığını tespit edebilmek için çeşitli protokoller (ISO, FDA, USDA) geliştirilmiştir. Bu protokollerdeki seçici zenginleştirme aşamasında kullanılan besi ortamı sadece *L. monocytogenes*' e özel olmadığı için, benzer fenotipik özelliklere sahip olmaları nedeniyle, *L. monocytogenes*' i diğer *Listeria* cinsi bakterilerden ayırt etmek zor olmaktadır (Dailey ve diğ., 2014; Dailey ve diğ., 2015).

Çalışmamızda İstanbul ilindeki farklı kasaplardan alınan 100 farklı dana kıyma örneği *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. Öncelikle United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) kültür metodu kullanılarak bakteriler izole edilmiş, biyokimyasal testler (MR-VP reaksiyonu, nitrat redüksiyonu, SIM besiyerinde hareket, karbonhidrat fermentasyonu, CAMP ve hemoliz testleri) ile *L. monocytogenes* olarak tanımlamaları yapılmıştır.

L. monocytogenes bakterilerini tespit etmek için kullanılacak izolasyon yöntemleri ve besiyerlerinin seçimi, et örneklerinde bildirilen *Listeria* prevalansını önemli ölçüde etkilemektedir. Çok çeşitli *Listeria* izolasyon prosedürleri (USDA, ISO, FDA) ve besiyerleri (UVM, BLEB, Fraser, OXA, PALCAM, MOX, LPM, ALOA vb.) tanımlanmış olsa da, bir yöntemin diğerine göre seçimi incelenecek gıdaya bağlı olmakla birlikte genellikle kişisel tercih meselesidir. Nitekim, çalışmamızda etlerden *L. monocytogenes* bakterilerini izole

etmek için kullandığımız USDA-FSIS izolasyon yönteminin birçok araştırmacı tarafından da tercih edildiği görülmüştür (Yu ve Fung, 1991; Warburton ve diğ., 1991; Kornacki ve diğ., 1993; Sancak ve diğ., 1993; Şireli ve Erol, 1999; Gudbjörnsdottir ve diğ., 2004; Yücel ve diğ., 2005; Berktaş ve diğ., 2006).

İstanbul ilinde satışa sunulan kıymalar ile yapmış olduğumuz çalışmamızda ilk olarak USDA-FSIS metodu yöntemi ile *L. monocytogenes* şüpheli bakteriler izole edilmiştir. USDA-FSIS yöntemi uyarınca tavsiye edilen MOX besiyeri yanında farklı selektif katı besiyerlerinin *L. monocytogenes* izolasyon oranlarının karşılaştırılabilmesi amacıyla ALOA besiyeri kullanılmıştır. Seçici zenginleştirme besiyeri ile ön zenginleştirme besiyerlerinden selektif katı besiyerine ekim yapıldığında, seçici zenginleştirme besiyerinden ekim yapılan örneklerden izole edilen *L. monocytogenes* bakterisi sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, ön zenginleştirme besiyerinden, MOX besiyerine (UVM-MOX) ekim yapıldıktan sonra bir (KA 95/1), ALOA besiyerine (UVM-ALOA) ekim yapıldıktan sonra üç (KA 23/2, KA 30/2, KA 30/3); ikincil zenginleştirme besiyerinden, MOX besiyerine (Fraser B.-MOX) ekim yapıldıktan sonra dört (KA 11/1, KA 11/2, KA 12/1, KA 26/1), ALOA besiyerine (Fraser B.-ALOA) ekim yapıldıktan sonra sekiz (KA 17/2, KA 19/2, KA 21/2, KA 26/2, KA 26/4, KA 45/1, KA 55/2) *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Sonuçlar incelendiğinde ön zenginleştirme ve seçici zenginleştirme besiyerinden MOX ve ALOA besiyerlerine ekim yapıldığında MOX besiyerinden toplam beş ALOA besiyerinden ise toplamda 11 *L. monocytogenes* izole edilmiştir. *L. monocytogenes* bakterilerinin izolasyonunda ALOA besiyerinin MOX besiyerine göre daha başarılı olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar kıyma örneklerinden *L. monocytogenes*' in kültür yöntemi ile izolasyonunda zenginleştirme basamağı ve kullanılan ayırt edici katı besiyeri seçiminin *L. monocytogenes* bakterisinin tespit edilme olasılığını arttırdığını göstermektedir.

Bizim çalışmamıza benzer olarak 2000 yılında yapılan bir çalışmada (Vlaemynck ve diğ., 2000), *L. monocytogenes* tespiti için ALOA, Oxford ve PALCAM besiyerleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda *L. monocytogenes* bakterilerinin izolasyonunda duyarlılığın ALOA besiyerinde (%86.1), Oxford/PALCAM (%61.1) besiyerine göre daha fazla olduğu, hem ön zenginleştirme hem de seçici zenginleştirme aşamasından sonra ALOA besiyerinden

bakterinin izole edildiği ve seçici zenginleştirmenin *L. monocytogenes* izolasyonunda gerekli olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda, MOX ve ALOA seçici katı besiyerlerinden izole edilen *L. monocytogenes* şüpheli 186 suş, MR-VP reaksiyonu, nitrat redüksiyonu, SIM besiyerinde hareket, karbonhidrat fermentasyonu (ramnoz, riboz, ksiloz, α -metil-D-mannosit ve mannitol), CAMP ve hemoliz testleri açısından incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde incelenen 100 kıyma örneğinin 17 (%17)' sinden elde edilen 21 suşun *L. monocytogenes* ile benzer fenotipik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, ülkemizde ve diğer ülkelerde daha önce kıymalar üzerine yapılmış olan çalışmaların bulguları ile uygunluk göstermektedir. Güven ve Patır (1998), Elazığ ilinde 100 kıyma örneğini inceledikleri çalışmalarında, örneklerin %35' inde *Listeria* spp. bulunduğunu bunların %13' ünün *L. monocytogenes*, %26' sının *L. innocua*, ve %4' nün ise her iki türü birlikte içerdiğini rapor etmişlerdir. Parça etler üzerine yapılan bir çalışmaya (Güven, 1994) baktığımızda 70 örnekten %28.6 oranında *Listeria* spp. tespit edilmiş ve bunlardan %11.4' ünde *L. monocytogenes*, %18.6' sında *L. innocua*, %1.4 ise *L. monocytogenes* ve *L. innocua*' nın birlikte izole edildiği bildirilmiştir. Berktaş ve diğ. (2006) ise Van' da kasap ve süpermarketlerden almış oldukları 100 adet kıyma örneğinin %73'ünden *Listeria* suşu izole ettiklerini, bunların 11 (%15.07)'inin *L. monocytogenes*, 43 (%58.9)' ünün *L. innocua*, dördünün (%5.5) *L. welshimeri*, dördünün (%5.5) *L. ivanovii*, beşinin (%6.9) *L. seeligeri* ve altısının (%8.2) *L. murrayi* olduğunu bildirmişlerdir. Akpolat ve diğ. (2004) Diyarbakır ilinde yapmış oldukları çalışmada 60 kıyma örneğini incelemiş ve bunlardan %5 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir. Et ve et ürünleri ile yapılan bir başka çalışmada (Doğruer ve diğ., 2015), 40 kıyma örneğinin üçünde (%7.5) *L. monocytogenes* tespit edilmiştir. Yücel ve diğ. (2005), Ankara'da 42 kıyma örneği ile yapmış oldukları çalışmada *L. monocytogenes*' i %4.7, *L. innocua*' yı ise %83.3 oranında izole etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, incelenen kıyma örneklerinden %4 oranında *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmiştir (Pamuk, 2018). İşleyici ve diğ. (2004), 50 adet çiğ köfte örneğinin birinde (%2) *L. monocytogenes* olduğunu saptamışlardır. Şanlıbaba ve diğ. (2020), 80 kırmızı çiğ et örneği incelemiş ve bu örneklerin 20 tanesinden (%25) *Listeria* spp. izole etmiş ve bunlardan %8.75' inin *L. monocytogenes* %10' unun *L. innocua* ve %6.25' inin ise *L. welshimeri* olduğunu bildirmişlerdir.

Dünyada yapılan çalışmalara baktığımızda ise, İtalya’da yapılan bir çalışmada (Comi ve diğ., 1992) 148 kıyma örneğinin 24 (%16)’ nün *L. monocytogenes*, Meksika’ da yapılan bir çalışmada (Heredia ve diğ., 2001) 88 kıyma örneğinin 55 (%62.5)’inin *Listeria* spp. ile kontamine olduğu ve bunlardan 18’ inde (%16) *L. monocytogenes* bakterisinin izole edildiği bildirilmiştir. De Simón ve diğ. (1992), İspanya’ da 168 kıyma örneğini inceledikleri çalışmalarında, 135 (%80.3) örnekte *Listeria* spp. bulunduğunu, bunların 29 (%17.5)’ unun *L. monocytogenes*, 112 (%66.6)’ sinin *L. innocua*, birinin (%0.6) ise *L. welshimeri* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. ABD’ de yapılan bir çalışmada (Yu ve diğ., 1995), 39 kıyma örneğinin %8’ inde *L. monocytogenes* saptanmıştır. Yaptığımız çalışmaya benzer olarak Wang ve diğ. (2013)’ nin yaptığı çalışmada, çiğ etlerde *L. monocytogenes* bulunma oranı %12.4 olarak tespit edilmiştir.

İrlanda’ da yapılmış bir çalışmada (Sheridan ve diğ., 1994) incelenen sığır eti örneklerinin %85’ inin *Listeria* spp. ile kontamine olduğu tespit edilmiş ve 5 örnekte *L. monocytogenes*, 16 örnekte *L. innocua* ve bir örnekte *L. seeligeri* bulunduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada sosis örneklerinin %65’ inin *Listeria* spp. ile kontamine olduğu bulunmuş ve bir örnekte *L. monocytogenes*, 12 örnekte *L. welshimeri*, ve bir örnekte de *L. seeligeri* bulunduğu tespit edilmiştir. Belçika’ da yapılan bir çalışmada (Uyttendaele ve diğ., 1999) 43 sığır eti örneğinin ikisinde (%4.7) ve 159 etli salata örneğinin 33 (%20.75)’ ünde *L. monocytogenes* varlığı tespit edilmiştir.

Danimarka’ da yapılan bir çalışmada Nørrung ve diğ. (1999), ısıt işlem uygulanmamış 335 et ürününün 35 (%10.8)’ inde ve ısıt işlem uygulanmış 772 adet et ürünlerinin 45 (%5)’ inde *L. monocytogenes* varlığını tespit etmişlerdir. Kanada’ da Aguado ve diğ. (2001), tarafından yapılan çalışmada ise 369 pişmiş et ürününün 34 (%9.2)’ ünde *L. monocytogenes*, 39 (%10.6)’ unda *L. innocua* ve dördünde (%1.1) *L. welshimeri* izole edilmiştir. Tiwari ve Aldenrath (1990) Kanada’ da, 38 sosisli örneğini incelemiş, %8 oranında *L. monocytogenes* izole ettiklerini, pişmiş et ve sosis örneklerinden ise *L. monocytogenes* izole edemediklerini bildirmişlerdir. Varabioff (1992) tarafından yapılan çalışmada, 132 salam örneğinin 35 (%26.5)’ inin *L. innocua*, beşinin (%3.8) *L. monocytogenes* ve birinin *L. seeligeri* (%0.8) ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Kıyma örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, bazı araştırmacıların bizim bulgularımızdan farklı olarak *L. monocytogenes* izolasyon oranını daha

yüksek buldukları tespit edilmiştir. Şireli (1994), Ankara’da 43 kıyma örneğinin 14 (% 32)’ünden, Aydemir Atasever ve Atasever (2015) Erzurum’da 100 adet kıyma örneğinin 24 (%24)’ünden *L. monocytogenes* bakterisi izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Çiftçioglu (1992)’nin 100 kıyma örneğini incelediği çalışmada, örneklerin %34’ünün *Listeria* spp. ile kontamine olduğu, bunlardan 11’inin (%32.4) ise *L. monocytogenes* olduğu saptanmıştır. Şireli ve Erol (1999), Ankara’da market ve kasaplardan alınan 100 kıyma örneğinin 97’ sinin (%97) *Listeria* spp. ile kontamine olduğunu saptamıştır. Kıyma örneklerinden *L. monocytogenes* %28, *L. innocua* %92, *L. murrayi* %10, *L. grayi* %9, *L. seeligeri* %3 ve *L. welshimeri* %2 oranında tespit edilmiştir.

Kanada’ da sığır ve dana kıymasının incelendiği bir çalışmada, *L. monocytogenes* bakterisi sırasıyla %77.3 ve %100 oranında tespit edilmiştir (Farber ve diğ., 1989). Kanada’ da yapılan başka bir çalışmada ise incelenen 50 kıyma örneğinin 29 (%58)’ unda *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Truscott ve McNab, 1988). Skovgaard ve Morgen (1988) tarafından Danimarka’ da yapılan bir çalışmada, 67 kıyma örneğinin %67’ sinde *Listeria* spp. kontaminasyonu olduğu, *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *L. grayi* bulunma oranlarının ise sırasıyla %28, %54 ve %10 olduğu tespit edilmiştir. Japonya’ da yapılan bir çalışmada ise incelenen kıymalardan %60 oranında *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmıştır (Ryu ve diğ., 1992).

Sharif ve Tunail (1995), köfte, hamburger köftesi, tantuni, kokoreç, sosis ve sucuk örneklerini *L. monocytogenes* açısından incelemiş ve *L. monocytogenes* izolasyon oranlarını sırasıyla %50, %40, %30, %90, %40 ve %60 olarak rapor etmişlerdir. Avustralya’ da yapılan bir çalışmada 50 sığır eti örneğinin 17 (%34)’ sinde *Listeria* spp. bulunduğu, *L. monocytogenes* ve *L. innocua* ile kontaminasyon oranlarının ise sırasıyla %24 ve %10 olduğu bildirilmiştir (İbrahim ve MacRae, 1991).

Et ve et ürünlerinden *L. monocytogenes* izolasyonu ile ilgili literatürler incelendiğinde, *L. monocytogenes* izolasyon oranlarının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* bakterilerin et ve et ürünlerinde görülme sıklığının farklılık göstermesinin, coğrafi konum, hava koşulları, çevresel koşullar, hayvan yetiştirme, gıda işleme (saklama koşulları ve özellikle sıcaklık kontrolü dahil), kesim uygulamalarındaki ve izolasyon yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklandığını düşündürmektedir (Johnson ve diğ., 1990).

Araştırma sonuçları incelendiğinde çiğ etlerde (kıyma ve parça etler) *L. monocytogenes* bulunma oranının yüksek olduğu saptanmıştır. Çiğ etlerde *Listeria* spp. insidansının yüksek olması, mezbahalarda hayvanların kesimi yapılırken organlarının boşaltılması sırasındaki dışkı kontaminasyonuna, gıda işleyen personele ve işleme, nakliye veya pazarlama sırasındaki çapraz kontaminasyondan kaynaklanmaktadır (Fenlon ve diğ., 1996; Al-Nabulsi ve diğ., 2015; Gómez ve diğ., 2015). Etin dış yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar, etlerin çekilme, karıştırma ve parçalama aşamalarında hazırlanan kıymaların her yerine bulaşmaktadır (Dempster, 1973; Pivnick ve diğ., 1976). Et ve et ürünlerinde kontaminasyon kaynağı olarak bıçaklar, toprak, dışkı, üretim aşamasındaki çalışanlar ve bazı ekipmanlar gösterilebilir (Roberts, 1990; Skovgaard, 1988). *L. monocytogenes* bakterilerinin psikrofil özellik göstermesi et endüstrisi için büyük bir endişe kaynağıdır. Çiğ ette işleme ve depolama sırasında meydana gelen *L. monocytogenes* kontaminasyonu etin işlenmesi sırasında yayılabilmekte ve artabilmektedir (Abay ve diğ., 2017; Yang ve diğ., 2017). Salam sosis ve sucuk gibi ürünlerde kontaminasyon oranının daha az olmasının nedeni ise yapım aşamasında kullanılan katkı maddeleri, pastörizasyon işlemi, oluşan fermentasyon ürünleri, uygulanan ısının derece ve süresinin etkisinin olduğu düşünülmektedir (Şireli ve Erol, 1999).

Listeria besin açısından zengin, kontamine sular, kanalizasyon, çamur, toprak, gıdalar ve hayvan konakçılarında kolayca çoğalır. Kontamine sular ve toprak ile etkileşim halinde olan hayvanların besin endüstrisinde kullanımı nedeni ile söz konusu etkenin insanlara tarım ve hayvansal gıdalar ile transfer olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca çiğ olarak tüketilebildiği gibi fermente şarküteri ürünlerinin içeriğinde de yer alan kıyma *L. monocytogenes* açısından daha da dikkat edilmesi gereken bir gıda halini almaktadır. *L. monocytogenes* bakterisi bulaştığı gıdalarda düşük derecelerde üreyebilme yeteneği, pH gereksinimi ve yüksek patojenitesi gibi özellikleri nedeniyle insan sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir. Özellikle kıyma söz konusu olduğunda, bakterinin gıdanın hazırlanması sırasında besinin her yerine yayılacağı ve rahatlıkla çoğalacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Belirtilen sebeplerden dolayı bu çalışmada, halk sağlığı açısından tehlikeli olan *L. monocytogenes* bakterisinin İstanbul ilinde satılan kıyma örneklerindeki varlığının saptanması, tedaviye yönelik bir müdahalede gösterecekleri direncin belirlenmesi ve bu sayede muhtemel halk sağlığı tehdidinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Geleneksel kültür yöntemi ile izole edilen ve biyokimyasal yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlaması yapılan 21 suşun 16' sının *iap* gen bölgesine sahip olduğu 5' inin ise *iap* gen bölgesine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda fenotipik yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 21 suştan 16' sının PZR yöntemi ile *Listeria* spp. olduğu tespit edilmiştir. *iap* gen varlığı açısından incelenen ve *Listeria* spp. olarak saptanan 16 bakterinin 16' sının da *L. monocytogenes*' e özgü olan *hlyA* gen bölgesine sahip olduğu PZR yöntemi ile tespit edilmiş bu bakterilerin *L. monocytogenes* olduğu moleküler olarak da doğrulanmıştır. *L. monocytogenes* olarak doğrulanan 16 suşun, sekans analizi sonucunda elde edilen 16S rRNA dizileri NCBI BLAST programı ile GenBank veritabanına dayalı olarak tanımlanmış ve sıralanmıştır (Tablo 4.8).

Klasik kültür yöntemleri ile izole edilen ve biyokimyasal testler sonucunda *L. monocytogenes* tanısı konan 21 izolatın sadece 16' sının *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç tek başına klasik kültür yöntemi ve biyokimyasal test sonuçlarına göre *L. monocytogenes* tanısının yetersiz olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Bizim çalışmamız ile benzer olarak çiğ ve işlenmiş et ürünleri, hayvan kesimhaneleri, sebzeler, salatalar, balık, kümes hayvanları, yumurta, süt ve süt ürünleri ile yapılmış olan bazı çalışmalarda da *L. monocytogenes* bakterisinin tanımlanması için *L. monocytogenes*' e özgü olan *hlyA* gen bölgesi incelenmiştir (Niederhauser ve diğ., 1992; Starbuck ve diğ., 1992; Chao ve diğ., 2007; Jallewar ve diğ., 2007; Ennaji ve diğ., 2008; Suo ve diğ., 2010; Al- Nabulsi ve diğ., 2015; Doğruer ve diğ., 2015; Çadırcı ve diğ., 2018; Şanlıbaba ve diğ., 2020).

Pek çok gıda ürünlerinin *Listeria* cinsi bakteriler ile kontamine olabileceği bilinmektedir. *Listeria* cinsi bakterilerin insanlara bulaşmasındaki en önemli kaynağının et ve et ürünleri olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemleri ile izole edilen *Listeria* şüpheli bakterilerinin *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin incelenmesinin ardından *L. monocytogenes*' in kıymalarda bulunma oranının %12 olduğu tespit edilmiştir.

Antibiyotiklerin keşfinden itibaren enfeksiyon hastalıkları nedeniyle gerçekleşen ölümlerin oranında dramatik bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte miktoorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç kazanabileceği ve hastalık tedavisinde büyük sorunlar ile karşılaşabileceği öngörülmüştür. Tıp, veterinerlik ve hayvancılıkta antibiyotiklerin dikkatli bir şekilde kullanılması, dirençli organizmaların yaygınlığını kontrol etmek ve azaltmak için

önemlidir. Ayrıca dirençli bakteriler veya direnç genleri gıdalardan insanlara aktarılabildiği ve bu transferin dirençli organizmaların çoğalmasına yol açabildiği gerçeğinin de göz ardı edilmemesi gerekir (Aarestrup ve Wegener, 1999; Anon, 2020). İnsan enfeksiyonlarında antimikrobiyal direnç insidansı, gıda ürünlerinde dirençli bakterilerin yaygınlığı ile doğrudan ilişkilidir (Olsen ve diğ., 2001; Smith ve diğ., 2002). *L. monocytogenes* bakterilerinde direnç genlerinin, diğer *Listeria* spp. türlerine, *S. aureus* ve *Enterococcus* spp. gibi patojen ve patojen olmayan diğer bakterilere aktarılabilme özelliğine sahip olması önemlidir (Courvalin, 1994; Walsh ve diğ., 2001). *Listeria* türlerindeki antibiyotik direnci, kendiliğinden transfer edilebilir ve mobilize edilebilir plazmidler ve konjugatif transpozonlar gibi üç tip mobil genetik elementten kaynaklanmaktadır (Charpentier ve diğ., 1995). Antibiyotiğe dirençli *L. monocytogenes* ilk olarak 1988’ de tanımlanmış (Poyart-Salmeron ve diğ., 1990) olup o zamandan bu zamana kadar listeriozis vakalarında çok daha dirençli suşlar tespit edilmiştir (Slade ve Collins-Thompson, 1990; Facinelli ve diğ., 1991; Hadorn ve diğ., 1993; Charpentier ve diğ., 1995; Roberts ve diğ., 1996; Charpentier ve Courvalin, 1999).

Yakın zamana kadar, *Listeria* cinsi bakterilerin, Gram pozitif bakterilere karşı aktif olarak kullanılan ampisilin veya penisilin (aminoglikozidlerle kombine), trimetoprim (tek başına veya sülfametoksazol ile kombine), tetrasiklinler, eritromisin ve gentamisin gibi antibiyotiklere eşit derecede duyarlı olduğu düşünüldüğünden, bu antibiyotikler, insan ve hayvanlarda listeriozis tedavisinde kullanılmıştır (Rota ve diğ., 1996; Teuber, 1999). Günümüzde insan listeriozis tedavisinde gentamisin ile birlikte ampisilin veya amoksisilin birincil tedavi seçeneğidir (MacGowan ve diğerleri, 1990; Hof, 1991). Bunlara ek olarak trimetoprim-sulfametoksazol listeriozis tedavisinde özellikle penisilin’ e alerjisi olan hastalarda kullanılmaktadır (Armstrong, 1995).

Çalışmamızda klasik kültür yöntemi ile izole edilen ve biyokimyasal yöntemlerle *L. monocytogenes* olarak tanımlanan bakterilerin 13 farklı antibiyotiğe (ampisilin, penisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefaklor, vankomisin, amikasin, gentamisin, klaritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol, rifampisin, trimetoprim-sulfametoksazol) karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 13 antibiyotiğin 13’ üne de dirençli olan bakteri saptanmamıştır. *L. monocytogenes* bakterilerinin üçünün (%14.28) amoksisilin/klavulanik asit’e, ikisinin (%9.52) penisilin’ e, ikisinin (%9.52) vankomisin’ e, ikisinin (%9.52) siprofloksasin’e ve ikisinin

(%9.52) de trimetoprim-sulfametoksazol'e karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. En az direnç ise amikasin (%4.76), gentamisin (%4.76), kloramfenikol (%4.76) ve rifampisin (%4.76)' e karşı olduğu bulunmuştur. Antibiyotik direnç özellikleri incelenen bakterilerde ampisilin, kloritromisin ve tetrasikline karşı herhangi bir direnç gözlemlenmemiştir.

Çalışmada incelenen kıyma örneklerinden 11. kıyma örneğinde iki, 26. kıyma örneğinde üç ve 30. kıyma örneğinde iki olmak üzere birden fazla *L. monocytogenes* bakterisi izole edilmiştir. 11. örnekten izole edilen KA 11/1 ve KA 11/2 izolatların antibiyotik direnç özelliklerinin farklı olduğu saptanmıştır. KA 11/1 izolatının, trimetoprim-sulfametoksazol' e karşı dirençli, sefaklor ve siprofloksasin' e karşı yarı duyarlı ve ampisilin penisilin, amikasin, amoksisilin/klavulanik asit, vankomisin, gentamisin, kloritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve rifampisinde karşı duyarlı olduğu, KA 11/2 izolatın ise sadece sefaklor' a karşı yarı duyarlı olduğu geri kalan 12 antibiyotiğe (ampisilin, penisilin, amoksisilin/klavulanik asit, vankomisin, amikasin, gentamisin, klaritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol, rifampisin, trimetoprim-sulfametoksazol) karşı ise duyarlı olduğu saptanmıştır.

26 numaralı örnekten izole edilen KA 26/1, KA 26/2 ve KA 26/4 izolatların antibiyotik direnç özelliklerinin KA 26/1 ve KA 26/4' ün 13 antibiyotiğin hepsine karşı duyarlı, KA 26/2' nin ise sefaklor'a yarı duyarlı ve geri kalan 12 antibiyotiğe ise duyarlı olduğu saptanmıştır.

30. örnekten izole edilen KA 30/2 ve KA 30/3 izolatların ikisinin de sefaklor' a karşı yarı duyarlı ve geri kalan 12 antibiyotiğe ise duyarlı olduğu saptanmıştır.

Elde edilen bulgular ışığında, KA 11/1 ile KA 11/2 numaralı bakterilerin birbirinden farklı olabileceği, KA 26/1 ile KA 26/4 aynı, KA 26/2' nin ise KA 26/1 ile KA 26/4' ten farklı bir bakteri olabileceği ve KA 30/2 ile KA 30/3 ün ise aynı bakteri olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.6 incelendiğinde çalışmamızda izole edilen 21 *L. monocytogenes* bakterisinden ikisinin (%9.5) sadece bir antibiyotiğe, birinin (%4.76) iki antibiyotiğe, ikisinin (%9.5) ise üç veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının incelendiği çalışmalarda, çalışmamızdan farklı olarak izole ettikleri *L. monocytogenes* bakterilerinin yüksek oranda çoklu direnç gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Çiğ et ve perakende gıdalar ile yapılan bir çalışmada (Pesavento ve diğ., 2010) 40 adet *L. monocytogenes* bakterisi izole edilmiş ve bunların sadece bir antibiyotiğe %37.5 oranında direnç, üç veya daha fazla antibiyotiğe karşı %27.5 oranında ise çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde Chao ve diğ. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada çiğ ve pişmiş et ürünlerinden izole edilen 72 *L. monocytogenes* bakterilerinin %19' unun sadece bir antibiyotiğe, izolatların %63.9' unun da iki veya daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Yücel ve diğ. (2005) et ve et ürünlerini inceledikleri çalışmalarında, izole ettikleri 9 *L. monocytogenes* bakterisinden %11' inin kanamisin'e, % 66' sının trimetoprim-sulfametaksazole'e, % 100' ünün sefolatin ve nalidiksik asite karşı direnç gösterdiğini, bizim elde ettiğimiz sonuçların aksine % 66' sının ampisiline karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Et ürünleri ve et işleme tesislerinde yapılan bir çalışmada Gómez ve diğ. (2014), 206 *L. monocytogenes* bakterisinin antibiyotik duyarlılıklarını incelemiş, %100' ünün kloramfenikol'e, %99.5' inin tetrasiklin ve siprofloksasin'e, %96.1' inin penisilin'e ve %65' inin klindamisin'e duyarlı olduğunu; %100' ünün oksasilin'e, %35' inin klindamisin' e ve % 0.5' inin de tetrasiklin' e karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca izole edilen bütün suşların amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin, klaritromisin, gentamisin, imipenem, levofloksasin, linezolid, meropenem, moksifloksasin, rifampisin, trimetoprim-sulfametoksazol, teikoplanin, tigesiklin ve vankomisin' e karşı duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Şanlıbaba ve diğ. (2020), çiğ et örneklerinden izole ettikleri yedi *L. monocytogenes* bakterisinin antibiyotik direnç özelliklerini incelediklerinde bizim sonuçlarımızdan farklı %71.43' ünün penisilin' e, %71.43' ünün siprofloksasin' e ve %100' ünün ampisiline direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda izole ettiğimiz *L. monocytogenes* bakterilerinin tetrasiklin' e karşı direnç göstermediği tespit edilmiştir. Şanlıbaba ve diğ. (2020)' nin yapmış olduğu çalışmada ise tetrasiklin' e dirençli bakteri oranı %14.29 olarak saptanmıştır. Ayrıca amoksisilin/klavulanik asit antibiyotiğine karşı duyarlı olan izolatların (%14.29) oranının çalışmamızdan daha az olduğu belirlenmiştir. Klaritromisin'e dirençli izolat bulunmaması ve gentamisin (%71.43), vankomisin (%100), trimetoprim-sulfametoksazol (%71.43), kloramfenikol (%100) antibiyotiklerine karşı duyarlılık oranlarının ise bizim çalışmamızın sonuçları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Çiğ ve işlenmiş et ürünleri ile yapılan bir çalışmada izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin %10' unun tetrasiklin'e, %3.3' ünün streptomisin'e, %6.7' sinin kanamisin'e, %1.7' sinin doksisiklin'e, %5' inin eritromisin'e dirençli olduğu tespit edilmiş, ayrıca bakterilerin hepsinin gentamisin, ampisilin ve vankomisine karşı duyarlı olduğu saptamıştır (Al-Nabulsi ve diğ., 2015).

Camargo ve diğ., (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerden hepsinin gentamisin, kloramfenikol, rifampisin, imipenem, vankomisin, eritromisin, penisilin, trimetoprim-sülfametoksazol ve tetrasiklin' e karşı duyarlı, %52.5' inin klindamisin' e ve %56.9' unun da oksasiline karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Doğruer ve diğ. (2015), et ve et ürünlerinden izole ettikleri 6 *L. monocytogenes* bakterisinin üç antibiyotiğe (amoksisilin/klavulanik asit, trimetoprim-sülfametoksazol ve vankomisin) karşı duyarlı ve bir antibiyotiğe (klindamisin) karşı dirençli olduğunu saptamışlardır.

Kümes hayvanları, çiğ et ve et ürünleri ile yapılan bir çalışmada izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin amoksisilin, gentamisin, amikasin, trimetoprim-sülfametoksazol, kloramfenikol, penisilin ve ampisilin' e karşı yüksek oranda duyarlı oldukları saptanmış olup bu sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlarla örtüşmektedir (Ennaji ve diğ., 2008).

Khen ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada, *L. monocytogenes* bakterilerinin ampisilin (%90), klindamisin (%36), daptomisin (%9), eritromisin (%100), gentamisin (%95), oksasilin +%2 NaCl (%16), penisilin (%96), kinopristin/dalfopristin (%92), rifampisin (%96), tetrasiklin' e (%99) ve vankomisin (%97)' e karşı duyarlı oldukları bulunmuştur. Khen ve diğ. (2015) bizim sonuçlarımızdan farklı olarak *L. monocytogenes* bakterilerinin tetrasikline karşı %1 direnç gösterdiğini, siprofloksasine karşı direncin (%99) ise bizim yaptığımız çalışmada görülen dirençten (%9.52) oldukça fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde, izole ettiğimiz *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direnç profilinin, diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İzole ettiğimiz *L. monocytogenes* bakterilerinin düşük antibiyotik direnç profiline sahip olması, çalışılan kıyma örnekleri kaynağının, hayvan besiciliğinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere daha önce maruz kalmadığını ve *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotiklere dirençli bakteriler ile karşılaşmayıp antibiyotik

direnç gen trasferi yapmamış olmalarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Çalışmamızda bazı bakterilerin çoklu direnç gösterdiği ve bazılarının da listeriozis tedavisinde başlıca kullanılan ampisilin, gentamisin, amoksisilin ve trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği de tespit edilmiştir. Antibiyotik direnci ve özellikle çoklu direnç uygulanan tedavilerin başarısız olmasına neden olabileceği gibi, gelecekte antibiyotik direnci nedeniyle hastalıklar ile karşılaşıldığında uygun antibiyotik tedavisinin bulunması güçleşecektir.

Çalışmamızda İstanbul ilinin farklı ilçelerinden alınan toplam 100 kıyma örneği klasik kültür, biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile incelenmiş ve 21 (%17)' inde *L. monocytogenes* bakterisi bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç hayvan kesimhaneleri ve kasaplarda İyi Üretim Uygulamaları (GMP), İyi Hijyen Uygulamaları (GHP)' nin bir sonucu olduğunu düşündürmüştür.

Çiğ gıda maddeleri ve çiftlik hayvanlarında *Listeria* insidansını azaltmak için *Listeria* kontaminasyonunu azaltan uygun tarım ve hayvancılık uygulamalarının benimsenmesi ve daha sonra, üretilen gıda ürünlerinde *L. monocytogenes*' i ortadan kaldırmak için işlem aşamaları öncesinde, sırasında ve sonrasında etkili kontrol önlemleri uygulamak oldukça önemlidir. Kıyma örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyon oranının ve izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin antibiyotik direnç insidansının düşük olmasına rağmen gıdalarda *L. monocytogenes* bakterisin bulunmasına izin verilmediğinden, kıymaların halk sağlığı açısından bir risk oluşturduğu açıktır. Özellikle ısıl işlem görmeden tüketilebilen veya mutfak ortamında çapraz kontaminasyona sebep olabilecek kıyma gibi örneklerin sık sık bu bakteri açısından incelenmesi, kesimhaneler ve kasaplarda hijyen ve sanitasyon uygulamalarına dikkat edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M. and Wegener, H.C., 1999, The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*, *Microbes and infection*, 1(8), 639-644.
- Aarts, H.J.M., Hakemulder, L.E. and Van Hoef, A.M.A., 1999, Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns, *International journal of food microbiology*, 49, 95-102.
- Abay, S., Irkin, R., Aydin, F., Müştak, H.K. and Diker, K.S., 2017, The prevalence of major foodborne pathogens in ready-to-eat chicken meat samples sold in retail markets in Turkey and the molecular characterization of the recovered isolates, *Food science and technology*, 81, 202-209.
- Aguado, V., Vitas, A.I. and García-Jalón, I., 2001, Random amplified polymorphic DNA typing applied to the study of cross-contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products, *Journal of food protection*, 64(5), 716-720.
- Akıllı, A., 1982, Ankara’da süper marketlerde satılan hazır kıymaların mikrobiyolojik ve kimyasal kaliteleri ile tek tırnaklı hayvan etleri yönünden incelenmesi üzerine araştırmalar, *Etlik veteriner enstitüsü dergisi*, 5, 4-5.
- Akpolat, N.Ö., Elci, S., Atmaca, S. and Gül, K., 2004, *Listeria monocytogenes* in products of animal origin in Turkey, *Veterinary research communications*, 28(7), 561-567.
- Alarcón, B., García-Cañas, V., Cifuentes, A., González, R. and Aznar, R., 2004, Simultaneous and sensitive detection of three foodborne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(23), 7180-7186.
- Alden, M.J., Marconi, L., Hogan, J., Rosen, I.G. and Johnson, R., 1990, A chemiluminescent DNA probe assay for the identification of *Listeria monocytogenes* from culture plates, abstract, *Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy*, 109.
- Allcock, J., 1992, Cutaneous listeriosis, *Veterinary record*, 130(1), 18-19.
- Al-Nabulsi, A.A., Osaili, T.M., Awad, A.A., Olaimat, A.N., Shaker, R.R. and Holley, R.A., 2015, Occurrence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and processed meat products in Amman, Jordan, *Ciencia y tecnologia alimentaria-journal of food*, 13(3), 346-352.
- Altekruse, S.F., Cohen, M.L. and Swerdlow, D.L., 1997, Emerging foodborne diseases, *Emerging infectious diseases*, 3(3), 285-293.

- Angelidis, A.S. and Koutsoumanis, K., 2006, Prevalence and concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the hellenic retail market, *Journal of food protection*, 69(4), 938-942.
- Anonim, 2020, *Antibiyotik Direnci*, http://www.akilciilac.gov.tr/?page_id=826, [Ziyaret Tarihi: 26 Haziran 2020].
- Armstrong, D., 1995, *Listeria monocytogenes*, Churchill Livingstone, New York, USA.
- Armstrong, R.W. and Fung, P.C., 1993, Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review, *Clinical infectious diseases*, 16(5), 689-702.
- Autio, T., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Björkroth, J., Sjöberg, A.M. and Korkeala, H., 2002, Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources, *International journal of food microbiology*, 77(1-2), 83-90.
- Aydemir Atasever, M. ve Atasever, M., 2015, Kıymalarda bazı patojenlerin izolasyon ve identifikasyonu, *İstanbul üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 41(1), 60-68.
- Azak, M.G., Kılıç, H., Hızlısoy, H. ve Abay, S., 2012, Erzincan ili tulum peynirlerinden *Listeria* spp. izolasyonu ve identifikasyonu, *Erciyes üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 9(3), 149-156.
- Bakardjiev, A.I., Stacy, B.A., Fisher, S.J. and Portnoy, D.A., 2004, Listeriosis in the pregnant guinea pig: a model of vertical transmission, *Infection and immunity*, 72(1), 489-497.
- Bakardjiev, A.I., Theriot, J.A. and Portnoy, D.A., 2006, *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back, *PLOS pathogens*, 2(7), 726-727.
- Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L.K., Fortes, E., Nightingale, K.K., Kephart, D. and Wiedmann, M., 2014, *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(6), 1882-1889.
- Başkaya, R., Karaca, T., Sevinç, İ., Çakmak, Ö., Yıldız, A., ve Yörük, M., 2004, İstanbul'da satışa sunulan hazır kıymaların histolojik, mikrobiyolojik ve serolojik kalitesi, *Yüzüncü yıl üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 15(1), 41-46.
- Berche, P., 1995, Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*, *Microbial pathogenesis*, 18(5), 323-336.
- Bergey, D.H., 1934, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 4th ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alisharlı, M., ve Güdücüoğlu, H., 2006, Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes*' in izolasyonu, *Van tıp dergisi*, 13(2), 36-41.

- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C. and Meile, L., 2013, *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 526-532.
- Betts, R., 1994, *The separation and rapid detection of organisms*. In: Spencer, R.C., Wright, E.P., Newsom, S.W.B. (eds.), *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*, Intercept, Andover, 107-119.
- Bille, J., Blanc, D.S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner A., Siegrist, H.H., Tritten M.L., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun, J.M., Malinverni, R., Genné, D., Erard, P.H. and Waespi, U., 2006, Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles, *European communicable disease bulletin*, 11(6), 91-93.
- Blackman, I.C. and Frank, J.F., 1996, Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces, *Journal of food protection*, 59(8), 827-831.
- Blanot, S., Joly, M.M., Vilde, F., Jaubert, F., Clement, O., Frija, G. and Berche, P., 1997, A gerbil model for rhombencephalitis due to *Listeria monocytogenes*, *Microbial pathogenesis*, 23(1), 39-48.
- Bohnert, M., Dilasser, F., Dalet, C., Mengaud, J. and Cossart, P., 1992, Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR, *Research in microbiology*, 143(3), 271-280.
- Bortolussi, R., 1990, Neonatal listeriosis, *Seminars in perinatology*, 14(4), 44-48.
- Borucki, M.K. and Call, D.R., 2003, *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR, *Journal of clinical microbiology*, 41(12), 5537-5540.
- Bosilevac, J.M., Guerini, M.N., Brichta-Harhay, D.M., Arthur, T.M. and Koohmaraie, M., 2007, Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef, *Journal of food protection*, 70(2), 440-449.
- Brenner, D.J., McWhorter, A.C., Knutson, J.K.L. and Steigerwalt, A.G., 1982, *Escherichia vulneris*: a new species of enterobacteriaceae associated with human wounds, *Journal of clinical microbiology*, 15(6), 1133-1140.
- Bruce, J.L., Hubner, R.J., Cole, E.M., McDowell, C.I. and Webster, J.A., 1995, Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*, *Proceedings of the national academy of sciences*, 92(11), 5229-5233.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. And Wagner, M., 1999, Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR, *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4688-4692.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore.

- Cady, N.C., Fusco, V., Maruccio, G., Primiceri, E. and Batt, C.A., 2017, Micro-and nanotechnology-based approaches to detect pathogenic agents in food, In *Nanobiosensors*, Academic press, 475-510.
- Camargo, A.C., de Castilho, N.P.A., da Silva, D.A.L., Vallim, D.C., Hofer, E. and Nero, L.A., 2015, Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil, *Microbial drug resistance*, 21(4), 458-462.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. and García-Fernández, M.C., 2001, Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection, *International journal of food microbiology*, 65(1-2), 75-82.
- Carrero, J.A., Calderon, B. and Unanue, E.R., 2004a, Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule, *The journal of immunology*, 172(8), 4866-4874.
- Carrero, J.A., Calderon, B. and Unanue, E.R., 2004b, Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection, *Journal of experimental medicine*, 200(4), 535-540.
- CDC, 1992, *Preventing foodborne illness: listeriosis*, <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2015.html>, [Ziyaret Tarihi: 15 Haziran 2020].
- CDC, 2017, *FoodNet 2015 surveillance report (final data)*, <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2015.html>, [Ziyaret Tarihi: 08 Mayıs 2020].
- Chae, M.S. and Schraft, H., 2000, Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *International journal of food microbiology*, 62(1-2), 103-111.
- Chao, G., Zhou, X., Jiao, X., Qian, X. and Xu, L., 2007, Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China, *Foodborne pathogens and disease*, 4(3), 277-284.
- Charpentier, E. and Courvalin, P., 1999, Antibiotic resistance in *Listeria* spp., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(9), 2103-2108.
- Charpentier, E., Gerbaud, G., Jacquet, C., Rocourt, J. and Courvalin, P., 1995, Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species, *The journal of infectious diseases*, 172(1), 277-281.
- Cho, I.H., Mauer, L., and Irudayaraj, J., 2014, In-situ fluorescent immunomagnetic multiplex detection of foodborne pathogens in very low numbers, *Biosensors and bioelectronics*, 57, 143-148.

- Chou, C.H. and Wang, C., 2006, Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR, *International journal of food microbiology*, 110(2), 135-148.
- Churchill, R.L.T., Lee, H. and Hall, J.C., 2006, Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food, *Journal of microbiological methods*, 64(2), 141-170.
- Comi, G., Frigerio, R. and Cantoni, C., 1992, *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products, *Letters in applied microbiology*, 15(4), 168-171.
- Conlan, J.W. and North, R.J., 1991, Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium, *The journal of experimental medicine*, 174(3), 741-744.
- Conlan, J.W., 1996, Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen, *Journal of medical microbiology*, 44(4), 295-302.
- Cotoni, L., 1942, A propos des bacteries denommees *Listerella* rappel d'une observation ancienne de meningite chez l'homme, *Annales de microbiologie (paris)*, 68, 92-95.
- Courvalin, P., 1994, Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(7), 1447-1451.
- Cousens, L.P. and Wing, E.J., 2000, Innate defenses in the liver during *Listeria* infection, *Immunological reviews*, 174(1), 150-159.
- Cowart, R.E. and Foster, B.G., 1985, Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition, *Journal of infectious diseases*, 151(4), 721-730.
- Cummins, A.J., Fielding, A.K. and McLauchlin, J., 1994, *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS, *Journal of infection*, 28(1), 89-91.
- Czuprynski, C.J., Faith, N.G. and Steinberg, H., 2002, Ability of the *Listeria monocytogenes* strain scott a to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route, *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 2893-2900.
- Çadırcı, Ö., Gücükoğlu, A., Terzi, G.G., Uyanık, T. and Alişarlı, M., 2018, The existence of *Listeria monocytogenes* in a cattle slaughterhouse and identification of serotypes by mPCR, *Ankara üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 65(3), 305-311.
- Çiftçioğlu, G., 1992, *Kıyma, sucuk ve tavuk etlerinde L. monocytogenes'in mevcudiyeti üzerine araştırmalar*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Dailey, R.C., Martin, K.G., Smiley, R.D., 2014, The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered *Listeria* enrichment broth, *Food microbiology*, 44, 173-179.

- Dailey, R.C., Welch, L.J., Hitchins, A.D. and Smiley, R.D., 2015, Effect of *Listeria seeligeri* or *Listeria welshimeri* on *Listeria monocytogenes* detection in and recovery from buffered *Listeria* enrichment broth, *Food microbiology*, 46, 528-534.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E. and Griffin, P.M., 1997, An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk, *New england journal of medicine*, 336(2), 100-106.
- De Simón, M., Tarragó, C. and Ferrer, M.D., 1992, Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain), *International journal of food microbiology*, 16(2), 153-156.
- Dempster, J.F., 1973, A note on the hygiene of meat mincing machines, *Epidemiology and infection*, 71(4), 739-744.
- Deneer, H.G. and Boychuk, I., 1991, Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification, *Applied and environmental microbiology*, 57(2), 606-609.
- Doğruer, Y., Telli, N., Telli, A.E. and Güner, A., 2015, Presence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in retail meat and meat products, *International journal of biological research*, 3(2), 76-81.
- Doijad, S.P., Poharkar, K.V., Kale, S.B., Kerkar, S., Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Rawool, D.B., Malik, S.V.S., Ahmad, R.Y., Hudel, M., Chaudhari, S.P., Abt, B., Overmann, J., Weigel, M., Hain, T., Barbuddhe, S.B. and Chakraborty, T., 2018, *Listeria goaensis* sp. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(10), 3285-3291.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. and Martin, P., 2004a, Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR, *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3819-3822.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P. and Buchrieser, C., 2004b, New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays, *Infection and immunity*, 72(2), 1072-1083.
- Doyle, M.P., Loneragan, G.H., Scott, H.M. and Singer, R.S., 2013, Antimicrobial resistance: challenges and perspectives, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(2), 234-248.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. and Cossart, P., 1995, Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family, *Molecular microbiology*, 16(2), 251-261.
- Drevets, D.A., 1999, Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes, *Infection and immunity*, 67(7), 3512-3517.

- Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A. and Campbell, P.A., 1995, *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms, *Infection and immunity*, 63(11), 4268-4276.
- Ennaji, H., Timinouni, M., Ennaji, M.M., Hassar, M. and Cohen, N., 2008, Characterization and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry and red meat in Morocco, *Infection and drug resistance*, 1, 45-50.
- Ericsson, H., Ekl w, A., Danielsson-Tham, M.L., Loncarevic, S., Mentzing, L.O., Persson, I., Unnerstad, H. and Tham, W., 1997, An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout, *Journal of clinical microbiology*, 35(11), 2904-2907.
- Erol, I. and Ayaz, N.D., 2011, Serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from turkey meat by multiplex PCR in Turkey, *Journal of food safety*, 31(2), 149-153.
- Erol,  ., 1999, Ankara'da tüketime sunulan kıymalarda *Salmonella*'ların varlığı ve serotip dağılımı, *Turkish journal of veterinary and animal science*, 23(4), 321-325.
- Erol,  ., 2007, *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı, Pozitif Matbaacılık, Ankara.
- Errebo Larsen, H., Seeliger, H.P.R., 1966, A mannitol fermenting *Listeria*, *Listeria grayi* sp., In proceedings of the third international symposium on listeriosis, 13-16 July 1996 Bilthoven, Netherlands, 35-39.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA) 2016, The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015, *EFSA journal*, 14(12), 4634.
- Evans, M.R., Swaminathan, B., Graves, L.M., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., Fink, R.C., Kernodle, S. and Kathariou, S., 2004, Genetic markers unique to *Listeria monocytogenes* serotype 4b differentiate epidemic clone II (hot dog outbreak strains) from other lineages, *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2383-2390.
- Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, P.E., Casolar I.P. and Fabio, U., 1991, Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*, *Lancet*, 338(8777), 1272.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I., 1991, *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *Microbiology and molecular biology reviews*, 55(3), 476-511.
- Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E., 1992, Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*, *Letters in applied microbiology*, 15(3), 103-105.
- Farber, J.M., Sanders, G.W. and Johnston, M.A., 1989, A survey of various foods for the presence of *Listeria* species, *Journal of food protection*, 52(7), 456-458.
- FDA, 1997, *HACCP principles and application guidelines*, <https://www.fda.gov/food/hazard-analysis-critical-control-point-haccp/haccp-principles-application-guidelines>, [Ziyaret Tarihi: 08 Mayıs 2020].

- Feng, P., 1998, *Salmonella*, Bacteriological Analytical Manual, In: Jackson, G.J., (ed.), Chapter 4, *Association of official analytical collaboration international*, Gaithersburg, MD.
- Fenlon, D.R., Wilson, J. and Donachie, W., 1996, The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing, *Journal of applied bacteriology*, 81(6), 641-650.
- Finney, M., 2000, Pulsed-field gel electrophoresis, *Current protocols in molecular biology*, 51(1), 2-5.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L., 1985, Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis, *New England journal of medicine*, 312(7), 404-407.
- Fluit, A.C., Torensma, R., Visser, M.J., Aarsman, C.J., Poppelier, M.J., Keller, B.H., Klapwijk, P. and Verhoef, J., 1993, Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay, *Applied and environmental microbiology*, 59(5), 1289-1293.
- Fraser, J.A. and Sperber, W.H., 1988, Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis, *Journal of food protection*, 51(10), 762-765.
- FSIS, U., 2003, Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products, *Federal register*, 68(109), 34207-34254.
- Fung, D., 2009, Rapid methods and automation in food microbiology: 25 years of development and predictions, In *Global issues in food science and technology*, Academic press, Massachusetts, ABD, 165-176.
- Gaillard, J.L., Beretti, J.L., Boulot-Tolle, M., Wilhelm, J.M., Bertrand, J.L., Herbelleau, T. and Berche, P., 1992, Serological evidence for culture-negative listeriosis of central nervous system, *Lancet (British edition)*, 340(8818), 560.
- Gaillard, J.L., Jaubert, F. and Berche, P., 1996, The inlAB locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo, *Journal of experimental medicine*, 183(2), 359-369.
- Garrec, N., Dilasser, F., Pourcher, A., Perelle, S. and Fach, P., 2003, Comparison of a cultural method with ListerScreen plus Rapid'L.mono or PCR-ELISA methods for the enumeration of *L. monocytogenes* in naturally contaminated sewage sludge, *Journal of microbiological methods*, 55(3), 763-773.
- Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P.M., 2005, Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review, *Federation of european microbiological societies microbiology reviews*, 29(5), 851-875.

- Gilot, P. and Content, J., 2002, Specific identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR assays targeting a gene encoding a fibronectin-binding protein, *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 698-703.
- Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J.J., Rota, C., Ariño, A. and Yangüela, J., 2014, Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment, *Food microbiology*, 42, 61-65.
- Gómez, D., Iguácel, L., Rota, M., Carramiñana, J., Ariño, A. and Yangüela, J., 2015, Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain, *Foods*, 4(4), 271-282.
- Gonzalez, J.M. and Saiz-Jimenez, C., 2004, A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures, *Extremophiles*, 9(1), 75-79.
- Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E. and de Valk, H., 2006, Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003, *Eurosurveillance*, 11(6), 3-4.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebière, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot, E., Stäiner, F. and Rocourt, J., 1995, Listeriosis from consumption of raw-milk cheese, *The Lancet*, 345(8964), 1581-1582.
- Gönülalan, Z. ve Köse, A., 2003, Kayseri ilinde satışa sunulan sığır kıymalarının mikrobiyolojik kalitesi, *Firat üniversitesi sağlık bilimleri dergisi*, 17(1), 49-53.
- Graves, L.M., Swaminathan, B., and Hunter, S., 1999, *Subtyping Listeria monocytogenes, Listeria, Listeriosis, and Food Safety* 2nd ed., In E.T. Ryser and E.H. Marth (ed.), 9, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 279-297
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. and Sauders, B.D., 2009, *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(6), 1280-1288.
- Graves, L.M., Swaminathan, B., Reeves, M.W., Hunter, S.B., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D. and Schuchat, A., 1994, Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates, *Journal of clinical microbiology*, 32(12), 2936-2943.
- Gray, M.L. and Killinger, A.H., 1966, *Listeria monocytogenes* and listeric infections, *Bacteriological reviews*, 30(2), 309-382.
- Gregory, S.H. and Liu, C.C., 2000, CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes, *Immunological reviews*, 174(1), 112-122.

- Gudbjörnsdottir, B., Suihko, M.L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A.M., Niclasen O. and Bredholt, S., 2004, The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries, *Food microbiology*, 21(2), 217-225.
- Guerra, M.M., Bernardo, F. and McLauchlin, J., 2002, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*, *Systematic and applied microbiology*, 25(3), 456-461.
- Güven A., 1994, *Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde Listeria türlerinin araştırılması*, Doktora, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Güven, A., Gülmez, M. ve Kamber, U., 1997, Kars ilinde tüketime sunulan kıymalarda bazı patojen mikroorganizmaların araştırılması ve kıymaların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi, *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 3(1), 57-65.
- Güven, A., ve Patır, B., 1998, Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde *Listeria* türlerinin araştırılması, *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 22, 205-212.
- Hadorn, K., Hächler, H., Schaffner, A. and Kayser, F.H., 1993, Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis, *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 12(12), 928-937.
- Halter, E., Neuhaus, K. and Scherer, S., 2013, *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 641-647.
- Hansen, C.H., Vogel, B.F. and Gram, L., 2006, Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments, *Journal of food protection*, 69(9), 2113-2122.
- Havell, E.A., 1986, Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes*, *Infection and immunity*, 54(3), 787-792.
- Heredia, N., García, S., Rojas, G. and Salazar, L., 2001, Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico, *Journal of food protection*, 64(8), 1249-1251.
- Hitchins, A.D., 1998, *Listeria monocytogenes*, *Bacteriological analytical manual*, In: Jackson, G.J., (ed.), Chapter 10, 8th ed., Revision A, Association of official analytical collaboration international, Gaithersburg, MD, 1001-1013
- Hitchins, A.D., Jinneman, K. and Chen, Y., 2017, *BAM: Detection and enumeration of Listeria monocytogenes*, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes>, [Ziyaret Tarihi: 19 Nisan 2020].
- Ho, J.L., 1986, An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals, *Archives of internal medicine*, 146(3), 520-524.
- Hof, H., 1991, Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis, *Infection*, 19(4), 229-233.

- Hof, H., 2003, Therapeutic options, *Federation of european microbiological societies immunology and medical microbiology*, 35(3), 203-205.
- Hof, H., 2004, An update on the medical management of listeriosis, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(8), 1727-1735.
- Hsih, H.Y. and Tsen, H.Y., 2001, Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples, *Journal of food protection*, 64(11), 1744-1750.
- Huss, H., 2000, Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods, *International journal of food microbiology*, 62(3), 267-274.
- Hussein, A.S. and Shafran, S.D., 2000, Acute bacterial meningitis in adults: a 12-year review, *Medicine*, 79(6), 360-368.
- Ibrahim, A. and Mac Rae, I.C., 1991, Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia, *International journal of food microbiology*, 12(2-3), 263-269.
- ISO, 2017, Microbiology of the food chain horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Part 1: detection method international standard ISO 11290-1, *International organization for standardization*, Geneva, Switzerland.
- İşleyici, Ö., Sancak, Y.C., Sağun, E. ve Ekici, K., 2004, Çiğ köftelerde *Listeria* türlerinin varlığı. *I. Ulusal Veteriner Gıda Hijyenistleri Kongresi*, Bildiri Kitabı, Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi, 139-146.
- Jallewar, P.K., Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Pande, V.V. and Barbuddhe, S.B., 2007, Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish, *International journal of food microbiology*, 114(1), 120-123.
- Jay, J.M., 1996, Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products, *Food control*, 7(4-5), 209-214.
- Jofré, A., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Pla, M., Rodríguez-Lázaro, D. and Aymerich, T., 2005, Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham, *Food microbiology*, 22(1), 109-115.
- Johnson, J.L., Doyle, M.P. and Cassens, R.G., 1990, *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products a review, *Journal of food protection*, 53(1), 81-91.
- Jones, E.M. and MacGowan, A.P., 1995, Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*, *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 14(3), 165-175.

- Junttila, J.R., Niemelä, S.I. and Hirn, J., 1988, Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*, *Journal of applied bacteriology*, 65(4), 321-327.
- Kanuganti, S.R., Wesley, I.V., Reddy, P.G., McKean, J. and Hurd, H.S., 2002, Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork, *Journal of food protection*, 65(9), 1470-1474.
- Karapınar, M. ve Gönül, Ş.A., 2003, *Gıda kaynaklı hastalıklar, Gıda Mikrobiyolojisi* In: Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (Eds), Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 22-250.
- Kerdahi, K.F. and Istafanos, P.F., 2000, Rapid determination of *Listeria monocytogenes* by automated enzyme-linked immunoassay and nonradioactive DNA probe, *Journal of association of official analytical collaboration international*, 83(1), 86-88.
- Khen, B.K., Lynch, O.A., Carroll, J., McDowell, D.A. and Duffy, G., 2015, Occurrence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* in the beef chain in the republic of Ireland, *Zoonoses and public health*, 62(1), 11-17.
- Kim, J., Demeke, T., Clear, R.M. and Patrick, S.K., 2006, Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in artificially inoculated wheat grain, *International journal of food microbiology*, 111(1), 21-25.
- Kocaman, N., and Sarımeahmetoğlu, B., 2017, Isolation of *Listeria monocytogenes* in lamb meat and determination of the antibiotic resistance, *Ankara üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 64, 273-279.
- Kohler, S., Leimeister-Wachter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F. and Goebel, W., 1990, The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*, *Infection and immunity*, 58(6), 1943-1950.
- Kornacki, J.L., Evanson, D.J., Reid, W., Rowe, K. and Flowers, R.S., 1993, Evaluation of the USDA protocol for detection of *Listeria monocytogenes*, *Journal of food protection*, 56(5), 441-443.
- Lane, D.J., 1991, *16S/23S rRNA sequencing, Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.), John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Lawrence, L.M. and Gilmour, A., 1994, 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*, 60(12), 4600-4604.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. and Allerberger, F., 2010, *Listeria rocourtiae* sp. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(9), 2210-2214.
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C. and Lecuit, M., 2019, *Listeria thailandensis* sp. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(1), 74-81.

- Lecuit, M., 2005, Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers, *Clinical microbiology and infection*, 11(6), 430-436.
- Lecuit, M., Sonnenburg, J.L., Cossart, P. and Gordon, J.I., 2007, Functional genomic studies of the intestinal response to a foodborne enteropathogen in a humanized gnotobiotic mouse model, *Journal of biological chemistry*, 282(20), 15065-15072.
- Lee, S., Cetinkaya, F. and Soyutemiz, G.E., 2007, Occurrence of *Listeria* species in the processing stages of frozen pepper, *Journal of food safety*, 27(2), 134-147.
- Lee, W.H. and McClain, D., 1986, Improved *Listeria monocytogenes* selective agar, *Applied and environmental microbiology*, 52(5), 1215-1217.
- Lessing, M.P.A., Curtis, G.D.W. and Bowler, I.C.J., 1994, *Listeria ivanovii* infection, *Journal of infection*, 29(2), 230-231.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. and Broome, C.V., 1988, Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese, *New england journal of medicine*, 319(13), 823-828.
- Liu, D., 2006, Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen, *Journal of medical microbiology*, 55(6), 645-659.
- Liu, D., 2008, *Handbook of Listeria monocytogenes*, CRC press, Boca Raton, ISBN 978-1-4200-5140-7.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J. and Austin, F.W., 2005, Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains, *Federation of european microbiological societies microbiology letters*, 243(2), 373-378.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Gorski, L., Mandrell, R.E., Ainsworth, A.J. and Austin, F.W., 2006a, *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular feature, *Journal of clinical microbiology*, 44(1), 214-217.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Wiedmann, M., Gorski, L., Mandrell, R.E., Ainsworth, A.J. and Austin, F.W., 2006b, *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential, *Journal of clinical microbiology*, 44(11), 4229-4233.
- Lorber, B., 1997, Listeriosis, *Clinical infectious diseases*, 24(1), 1-11.
- Lovett, J., 1989, *Listeria monocytogenes*, In M.P. Doyle (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker New York, USA, 283-310.
- Lovett, J., 1988, Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products, *Journal of association of official analytical collaboration international*, 71(3), 658-660.

- Low, J.C. and Donachie, W., 1997, A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis, *The veterinary journal*, 153(1), 9-29.
- Luppi, A., Bucci, G., Maini, P. and Rocourt, J., 1988, Ecological survey of *Listeria* in the Ferrara area (Northern Italy), *Zentralblatt für bakteriologie, mikrobiologie und hygiene series a: medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, 269(2), 266-275.
- MacGowan, A.P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P.M. and Reeves, D.S., 1994, The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources, *International journal of food microbiology*, 21(4), 325-334.
- MacGowan, A.P., Holt, H.A. and Reeves, D.S., 1990, In-vitro synergy testing of nine antimicrobial combinations against *Listeria monocytogenes*, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 25(4), 561-566.
- Marco, A.J., Domingo, M., Prats, M., Briones, V., Pumarola, M. and Dominguez, L., 1991, Pathogenesis of lymphoid lesions in murine experimental listeriosis, *Journal of comparative pathology*, 105(1), 1-15.
- Matar, G.M., Hayes, P.S., Bibb, W.F. and Swaminathan, B., 1997, Listeriolysin O-based latex agglutination test for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, *Journal of food protection*, 60(9), 1038-1040.
- Mazurier, S.I. and Wernars, K., 1992, Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA, *Research in microbiology*, 143(5), 499-505.
- Mcclain, D. and Lee, W.H., 1988, Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry, *Journal of association of official analytical collaboration international*, 71(3), 660-664.
- McLauchlin, J. and Jones, D., 1998, *Erysipelothrix and Listeria*, *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, In Topley and Wilson's microbiology and microbial infections Volume 2, Systematic bacteriology, 9th ed., Arnold, London, 683.
- McLauchlin, J. and Low, J.C., 1994, Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers, *Veterinary record*, 135(26), 615-617.
- McLauchlin, J., 1987, *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans, *Journal of applied bacteriology*, 63(1), 1-11.
- McLauchlin, J., Hall, S.M., Velani, S.K. and Gilbert, R.J., 1991, Human listeriosis and pate: a possible association, *British medical journal*, 303(6805), 773-775.
- Mead, P.S., Dunne, E.F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B.D., Hayes, P., Dewitt, W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L. and Swaminathan, B., 2005, Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat, *Epidemiology and infection*, 134(4), 744-751.

- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. and Tauxe, R.V., 1999, Food-related illness and death in the United States, *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607-625.
- Miettinen, M., 1999, Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis, *International journal of food microbiology*, 46(3), 187-192.
- Mueller, J.H. and Hinton, J., 1941, A Protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*, *Experimental biology and medicine*, 48(1), 330-333.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A. and Swann, M.B.R., 1926, A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.), *The journal of pathology and bacteriology*, 29(4), 407-439.
- Müller, H.E., 1988, Listeriosis in animals, *Turkish journal of infectious diseases*, 2(4), 505-519.
- Mylonakis, E., Paliou, M., Hohmann, E.L., Calderwood, S.B. and Wing, E.J., 2002, Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases, *Medicine*, 81(4), 260-269.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2010, *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard*, M31-A3, Wayne, PA, USA.
- Navas, J., Ortiz, S. and Martínez-Suárez, J.V., 2005, Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* in chicken meat enrichments by PCR and Reverse-Transcription PCR without DNA/RNA isolation, *Journal of food protection*, 68(2), 407-410.
- Nguyen, M.H. and Yu, V.L., 1994, *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients, *Digestive diseases and sciences*, 39(1), 215-218.
- Niederhauser, C., Candrian, U., Höfelein, C., Jermini, M., Bühler, H.P. and Lüthy, J., 1992, Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food, *Applied and environmental microbiology*, 58(5), 1564-1568.
- Nørnung, B., 2000, Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches, *International journal of food microbiology*, 62(3), 217-221.
- Nørnung, B., Andersen, J.K. and Schlundt, J., 1999, Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark, *International journal of food microbiology*, 53(2-3), 195-203.
- Norton, D.M., 2002, Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples, *Journal of association of official analytical collaboration international*, 85(2), 505-515.

- Norwood, D.E. and Gilmour, A., 2000, The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm, *Journal of applied microbiology*, 88(3), 512-520.
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J. and Lecuit, M., 2018, *Listeria costaricensis* sp. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(3), 844-850.
- Nyfeldt, A., 1929, Etiologie de la mononucleose infectieuse, *Comptes rendus des seances de la societe de biologie*, 101, 590-591.
- Olsen, S.J., DeBess, E.E., McGivern, T.E., Marano, N., Eby, T., Mauvais, S., Balan, V.K., Zirnstein, G., Cieslak, P.R. and Angulo, F.J., 2001, A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant *Salmonella* infection, *New england journal of medicine*, 344(21), 1572-1579.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., and Agosti, M., 1997, Differential agar medium for *Listeria monocytogenes* [foods], *Industrie alimentari (Italy)*, 36(361), 888-889.
- Öztaş, A., 2008, *Et Bilimi ve Teknolojisi*, 6. Baskı, Filiz Matbaacılık San. Tic. Ltd.Şti, Ankara.
- Öztürk, U., 2007, *Antalya'da tüketime sunulan kıyma ve kırmızı et preparatlarının mikrobiyolojik kalitesi*, Doktora, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Paillard, D., Dubois, V., Duran, R., Nathier, F., Guittet, C., Caumette, P. and Quentin, C., 2003, Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments, *Applied and environmental microbiology*, 69(11), 6386-6392.
- Palumbo, J.D., Borucki, M.K., Mandrell, R.E. and Gorski, L., 2003, Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting, *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 564-571.
- Pamuk, Ş., 2018, Investigation of the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in bovine origin foods, *Erciyes üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 15(1), 22-29.
- Park, Y.S., Lee, S.R., and Kim, Y.G., 2006, Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR), *Journal of microbiology*, 44, 92-97.
- Peel, M., Donachie, W. and Shaw, A., 1988, Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, sds-page and western blotting, *Microbiology*, 134(8), 2171-2178.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N. and Lo Nostro, A., 2010, Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods, *Food control*, 21(5), 708-713.

- Pinner, R.W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Reeves, M., Broome, C.V., Wenger, J.D., Ajello, G., Przybyszewski, V., Malcolm, G., Ransom, R., Graves, L.M., Egal, M., Pierce, R., Anderson, G., Stone, E., Krauss, K., Reingold, A., Castillon, M., Mascola, L., Harvey, C., Stull, T., Stephens, D., Farley, M., Archer, P., Strack, J., Istre, G., Rados, M., Taylor, J. and Lefkowitz, L., 1992, Role of foods in sporadic listeriosis: II. microbiologic and epidemiologic investigation, *Journal of the american medical association*, 267(15), 2046-2050.
- Pirie, J.H.H., 1940, *Listeria*: change of name for a genus bacteria, *Nature*, 145(3668), 264.
- Pivnick, H., Erdman, I.E., Collins-Thompson, D., Roberts, G., Johnston, M.A., Conley, D.R., Lachapelle, G., Purvis, U.T., Foster, R. and Milling, M., 1976, Proposed microbiological standards for ground beef based on a Canadian survey, *Journal of milk and food technology*, 39(6), 408-412.
- Pongratz, G. and Seeliger, H.P.R., 1984, Hämolysewirkungen durch *Listeria innocua* auf schäfererythrozyten, *Zentralblatt für bakteriologie, mikrobiologie und hygiene. 1. abt. originale. a, medizinische mikrobiologie, infektionskrankheiten und parasitologie*, 257(3), 296-307.
- Portnoy, D.A., 1992, Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen, *Current opinion in immunology*, 4(1), 20-24.
- Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courvalin, P., and Courtieu, A.L., 1990, Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*, *The Lancet*, 335(8703), 1422-1426.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J. and Johnson, E.A., 1991, Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology*, 57(10), 3046-3048.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F. and Gaillard, J.L., 2001, Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host, *Cellular microbiology*, 3(5), 331-340.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J.P., Berche, P. and Gaillard, J.L., 1998, Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system, *Infection and immunity*, 66(2), 747-755.
- Ralovich, B.S., Shahamat, M. and Woodbine, M., 1977, Further data on the characters of *Listeria* strains, *Medical microbiology and immunology*, 163(2), 125-139.
- Ray, B., 1997, *Fundamental Food Microbiology*, CRC press, Boca Raton, USA.
- Reiter, M.G.R., Bueno, C.M.M., Lopez, C. and Jordano, R., 2005, Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant, *Journal of food protection*, 68(9), 1903-1906.

- Renterghem, B.V., Huysman, F., Rygole, R. and Verstraete, W., 1991, Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem, *Journal of applied bacteriology*, 71(3), 211-217.
- Riedo, F.X., Pinner, R.W., Tosca, M.D.L., Cartter, M.L., Graves, L.M., Reeves, M.W., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D. and Broome, C., 1994, A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness, *Journal of infectious diseases*, 170(3), 693-696.
- Riley, L.W., 2004, *Molecular epidemiology of infectious diseases: Principles and practices*, ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Ripabelli, G., McLauchlin, J. and Threlfall, E.J., 2000, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*, *Systematic and applied microbiology*, 23(1), 132-136.
- Roberts, D., 1990, Sources of infection: food, *The Lancet*, 336(8719), 859-861.
- Roberts, M.C., Facinelli, B., Giovanetti, E. and Varaldo, P.E., 1996, Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food, *Applied and environmental microbiology*, 62(1), 269-270.
- Rocourt, J. and Grimont, P.A.D., 1983, Notes: *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov, *International journal of systematic bacteriology*, 33(4), 866-869.
- Rocourt, J., 1999, *The genus Listeria and Listeria monocytogenes phylogenetic position taxonomy, and identification*, *Listeria listeriosis and food safety*, In: Ryser, E.T., Marth E.H. (eds.), Chapter 1, Marcel Dekker, New York, USA, 9-11.
- Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Hof, H. And Espaze, E.P., 1987, New species of the genus *Listeria*: *Listeria seeligeri*, *Pathologie-biologie*, 35(7), 1075-1080.
- Rodas-Suarez, O.R., Flores-Pedroche, J.F., Betancourt-Rule, J.M., Quinones-Ramirez, E.I. and Vazquez-Salinas, C., 2006, Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water, *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7410-7412.
- Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., Scottti, M., Esteve, T., Vazquez-Boland, J.A. and Pla, M., 2004, Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and ampliFluor technology, *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1366-1377.
- Rota, C., Yangüela, J., Blanco, D., Carraminana J.J., Arino, A. and Herrera, A., 1996, High prevalence of multiple resistance to antibiotics in 144 *Listeria* isolates from Spanish dairy and meat products, *Journal of food protection*, 59(9), 938-943.
- Ryser, E.T. and Donnelly, C.W., 2001, *Listeria*, In F.P. Downes, K.A. Ito (Ed.) *Microbiological Examination of Foods* 4th ed., Sheridan Books Inc., Washington, USA, 343-356.

- Ryser, E.T. and Marth, E.H., 2007, *Listeria, listeriosis, and food safety*, CRC press, Boca Raton, USA.
- Ryu, C.H., Igimi, S., Inoue, S. and Kumagai, S., 1992, The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan, *International journal of food microbiology*, 16(2), 157-160.
- Safarik, I., Safariková, M. and Forsythe, S.J., 1995, The application of magnetic separations in applied microbiology, *Journal of applied bacteriology*, 78(6), 575-585.
- Samadpour, M., Barbour, M.W., Nguyen, T., Cao, T.M., Buck, F., Depavia, G.A., Mazengia, E., Yang, P., Alfi, D., Lopes, M. and Stopforth, J.D., 2006, Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms, *Journal of food protection*, 69(2), 441-443.
- Sancak, Y.C., Boynukara B. ve Ağaoğlu S., 1993, Van'da tüketime sunulan kıymaların mikrobiyolojik kalitesi, *Yüzüncü yıl üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 4(1), 73-86.
- Schaffter, N. and Parriaux, A., 2002, Pathogenic-bacterial water contamination in mountainous catchments, *Water research*, 36(1), 131-139.
- Schardt, J.J., 2018, *Characterization of Listeria sensu stricto specific genes involved in colonization of the gastrointestinal tract by Listeria monocytogenes*, Dissertation, Doktors der Naturwissenschaften, Technische Universität München.
- Scheu, P., Gasch, A. and Berghof, K., 1999, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA, *Letters in applied microbiology*, 29(6), 416-420.
- Schlech, W.F., 2000, *Epidemiology and clinical manifestations of Listeria monocytogenes infection*, In Fischetti V., Novick R., Ferretti J., Portnoy D., Rood J. (ed.) Gram positive pathogens, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, 601-608.
- Schlech, W.F., 1997, *Listeria* gastroenteritis-old syndrome, new pathogen, *New england journal of medicine*, 336(2), 130-132.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V., 1983, Epidemic listeriosis-evidence for transmission by Food, *New england journal of medicine*, 308(4), 203-206.
- Schmid, M., Walcher, M., Bubert, A., Wagner, M., Wagner, M. and Schleifer, K.H., 2003, Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*, *Federation of european microbiological societies immunology and medical microbiology*, 35(3), 215-225.
- Schuchat, A., 1992, Role of foods in sporadic listeriosis, *Journal of the american medical association*, 267(15), 2041.
- Schwartz, B., Broome, C., Brown, G., Hightower, A., Ciesielski, C., Gaventa, S., Gellin, B., Mascola, L. and Listeriosis Study Group, 1988, Association of sporadic listeriosis with

- consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken, *The Lancet*, 332(8614), 779-782.
- Seeliger, H.P.R. and Jones, D., 1986, *Listeria*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2,. In Sneath P.H.A., Nair N.S., Sharpe N.E. and Holt J.G., (ed.) Williams and Wilkins Baltimore, 1235-1245.
- Seeliger, H.P.R., 1981, Apathogene *Listerien*: *Listeria innocua* sp. nov., *Zentralblatt für bakteriologie parasitenkunde infektionskrankheiten und hygiene*, 249, 487-493.
- Seeliger, H.P.R., Höhne, K., 1979, Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species, *Methods in microbiology*, 13, 31-49.
- Seeliger, H.P.R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P.A.D. and Jones, D., 1984, Notes: *Listeria ivanovii* sp. nov., *International journal of systematic bacteriology*, 34(3), 336-337.
- Seo, K.H., Brackett, R.E. and Frank, J.F., 1998, Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 using immuno-magnetic flow cytometry in ground beef, apple juice, and milk, *International journal of food microbiology*, 44(1-2), 115-123.
- Sharif, A. and Tunail, N., 1995, Detection of *Listeria monocytogenes* in foods of animal origin, *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 19, 329-334.
- Sharma-Kuinkel, B.K., Rude, T.H. and Fowler, V.G., 2014, Pulse field gel electrophoresis, The genetic manipulation of staphylococci, In: Bose, J. (ed.), 1373, Humana Press, New York, USA, 117-130.
- Sheridan, J.J., Duffy, G., McDowell, D.A. and Blair, I.S., 1994, The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products, *International journal of food microbiology*, 22(2-3), 105-113.
- Siriken, B., Pamuk, Ş., Özakın, C., Gedikoglu, S. and Eyigör, M., 2006, A note on the incidences of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausage (Soudjouck), *Meat science*, 72(1), 177-181.
- Siegmán-Igra, Y., Levin, R., Weinberger, M., Golan, Y., Schwartz, D., Samra, Z., Königsberger, H., Yinnon, A., Rahav, G., Keller, N., Bisharat, N., Karpuch, J., Finkelstein, R., Alkan, M., Landau, Z., Novikov, J., Hassin, D., Rudnicki, C., Kitzes, R., Ovadia, S., Shimoni, Z., Lang, R. and Shohat, T., 2002, *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide, *Emerging infectious diseases*, 8(3), 305-310.
- Siriken, B., 2004, The presence of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species in ground beef in Aydın, Turkey, *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 28(3), 489-495.
- Skalka, B. and Smola, J., 1982, Hemolytic properties of exosubstance of serovar 5 *Listeria monocytogenes* compared with beta toxin of *Staphylococcus aureus*, *Zentralblatt für*

bakteriologie, mikrobiologie und hygiene. 1. abt. originale. a, medizinische mikrobiologie, infektionskrankheiten und parasitologie, 252(1), 17-25.

- Skalka, B., Smola, J. and Elischerová, K., 1983, Hemolytic phenomenons under the cultivation of *Listeria innocua*, *Zentralblatt für bakteriologie, mikrobiologie und hygiene. 1. abt. originale. a, medizinische mikrobiologie, infektionskrankheiten und parasitologie*, 253(4), 559-565.
- Skovgaard, N. and Morgen, C.A., 1988, Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin, *International journal of food microbiology*, 6(3), 229-242.
- Slade, P.J. and Collins-Thompson, D.L., 1990, *Listeria*, plasmids, antibiotic resistance, and food, *Lancet*, 336, 1004.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G.M. and Hill, C., 2003, A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 1-9.
- Smith, D.L., Harris, A.D., Johnson, J.A., Silbergeld, E.K. and Morris, J.G., 2002, Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria, *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(9), 6434-6439.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, N.E. and Holt, J.G., 1986, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Southwick, F.S. and Purich, D.L., 1996, Intracellular pathogenesis of listeriosis, *New england journal of medicine*, 334(12), 770-776.
- Soyutemiz, E., 2000, Et ve et ürünlerinde mikrobiyal bozulmalar, *Gıda dergisi*, 3, 52-57.
- Starbuck, M.A.B., Hill, P.J. and Stewart, G.S.A.B., 1992, Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR), *Letters in applied microbiology*, 15(6), 248-252.
- Suo, B., He, Y., Tu, S.I. and Shi, X., 2010, 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*, 7(6), 619-628.
- Şanlıbaba, P., Tezel, B.U., Çakmak, G.A., Keskin, R. and Akçelik, M., 2020, Occurrence of *Listeria* spp. and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* from raw meat products in Turkey, *Italian journal of food science*, 32(1), 234-250.
- Şireli U.T., 1994, *Hazır kıymalarda Listeria türlerinin araştırılması*, Doktora, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Şireli, U.T., ve Erol, İ., 1999, Hazır kıymalarda *Listeria* türlerinin araştırılması, *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 23, 373-380.

- Taskanal, N., 1993, *Ankara'daki askeri mutfakların ve mutfak personelinin hijyenik kontrolü üzerine araştırmalar*, Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tekinsen, O.C., Yurtyeri, A., ve Mutluer, B., 1980, Ankara'da satılan hazır kıymaların bakteriyolojik kalitesi, *Ankara üniversitesi veteriner fakültesi dergisi* 1(2), 45-63.
- Teuber, M., 1999, Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens, *Cellular and molecular life sciences*, 56(9-10), 755-763.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S. and Vernozzy-Rozand, C., 2005, Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products, *International journal of food microbiology*, 102(1), 85-94.
- Tiwari, N.P. and Aldenrath, S.G., 1990, Occurrence of *Listeria* species in food and environmental samples in Alberta, *Canadian institute of food science and technology journal*, 23(2-3), 109-113.
- Truscott, R.B. and McNab, W.B., 1988, Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef, *Journal of food protection*, 51(8), 626-628.
- Tunçel, G. ve Tiryaki, G., 2001, Çiğ köftelerin gıda güvenliği açısından değerlendirilmesi, *Dünya gıda dergisi*, 12, 56-61.
- Türk Gıda Kodeksi, 2000, *Türk gıda kodeksi taze et, hazırlanmış et ve hazırlanmış et karışımları tebliği* (tebliğ no:2000/5), http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/mev/mev_teb/tebl_temel_saglik/teb_et_taze.pdf, [Ziyaret Tarihi: 08 Mayıs 2020].
- Türk Gıda Kodeksi, 2001, *Türk gıda kodeksi taze et, hazırlanmış et ve hazırlanmış et karışımları tebliği* (tebliğ no 2001/7), http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/mev/mev_teb/tebl_temel_saglik/teb_et_taze.pdf, [Ziyaret Tarihi: 08 Mayıs 2020].
- Türk Gıda Kodeksi, 2009, *Türk gıda kodeksi mikrobiyolojik kriterler tebliği*, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090206.htm>, [Ziyaret Tarihi: 08 Mayıs 2020].
- USDA, 2013, *Isolation and identification of Listeria monocytogenes from red meat poultry and egg products and environmental samples*, <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, [Ziyaret tarihi: 08 Mayıs 2020].
- Uyttendaele, M., De Troy, P. and Debevere, J., 1999, Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market, *International journal of food microbiology*, 53(1), 75-80.
- Ünlütürk, A. ve Turantas, F., 1999, *Gıda Mikrobiyolojisi*, Mengi Tan Basımevi, Çınarlı izmir.

- Van Coillie, E., Werbrueck, H., Heyndrickx, M., Herman, L. and Rijkens, N., 2004, Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market, *Journal of food protection*, 67(11), 2480-2487.
- Van Der Kelen, D. and Lindsay, J.A., 1990, Differential hemolytic response of *Listeria monocytogenes* strains on various blood agars, *Journal of food safety* 11(1), 9-12.
- Varabioff, Y., 1992, Incidence of *Listeria* in smallgoods, *Letters in applied microbiology*, 14(4), 167-169.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J., 2001, *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584-640.
- Vicente, M.F., Berenguer, J., de Pedro, M.A., Pérez-Díaz, J.C. and Baquero, F., 1990, Penicillin binding proteins in *Listeria monocytogenes*, *Acta microbiologica hungarica*, 37(2), 227-231.
- Vlaemynck, G., Lafarge, V. and Scotter, S., 2000, Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium, *Journal of applied microbiology*, 88(3), 430-441.
- Vogel, B.F., Fussing, V., Ojeniyi, B., Gram, L. and Ahrens, P., 2004, High-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis compared to pulsed-field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, *Journal of food protection*, 67, 1656-1665.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.H., Bubert, A., Goebel, W. and Schleifer, K.H., 1998, In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*, *Federation of european microbiological societies microbiology letters*, 160(1), 159-168.
- Walker, S.J. and Stringer, M.F., 1987, Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures, *Campden food preservation research association technical memorandum*, Campden food preservation research association, Chipping Campden, United Kingdom, 462.
- Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G., 1990, Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures, *Journal of applied bacteriology*, 68(2), 157-162.
- Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A., 2001, Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes* in retail foods, *Journal of applied microbiology*, 90(4), 517-522.

- Wang, X.M., Lü, X.F., Yin, L., Liu, H.F., Zhang, W.J., Si, W., Yu, S.Y., Shao, M.L. and Liu, S.G., 2013, Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods, *Food control*, 32(1), 153-158.
- Warburton, D.W., Farber, J.M., Armstrong, A., Caldeira, R., Tiwari, N.P., Babiuk, T., Lacesse, P. and Read, S., 1991, A Canadian comparative study of modified versions of the “FDA” and “USDA” methods for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Journal of food protection*, 54(9), 669-676.
- Watson, G.W., 1978, *Listeria cerebritis*, *Archives of internal medicine*, 138(1), 83.
- Weis, J. and Seeliger, H.P.R., 1975, Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature, *Applied microbiology*, 30(1), 29-32.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M. and den Bakker, H.C., 2015, *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(1), 286-292.
- Welshimer, H.J., 1963, Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*, *Journal of bacteriology*, 85(5), 1156-1159.
- Wenger, J.D., Hightower, A.W., Facklam, R.R., Gaventa, S. and Broome, C.V., 1990, Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study, *Journal of infectious diseases*, 162(6), 1316-1323.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L. and Batt, C.A., 1997, Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential, *Infection and immunity*, 65(7), 2707-2716.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Yang, D., Wu, X., Yu, X., He, L., Shah, N.P. and Xu, F., 2017, Mutual growth-promoting effect between *Bifidobacterium bifidum* WBB103 and *Listeria monocytogenes* CMCC 54001, *Journal of dairy science*, 100(5), 3448-3462.
- Yu, L.S.L. and Fung, D.Y.C., 1991, Evaluation of FDA and USDA procedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef, *Food microbiology*, 8(1), 69-74.
- Yu, L.S.L., Prasai, R.K. and Fung, D.Y.C., 1995, Most probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective motility enrichment, *Journal of food protection*, 58(9), 943-945.
- Yücel, N., Çıtak, S. and Önder, M., 2005, Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey, *Food microbiology*, 22(2-3), 241-245.
- Zhou, X. and Jiao, X., 2006, Prevalence and lineages of *Listeria monocytogenes* in Chinese food products, *Letters in applied microbiology*, 43(5), 554-559.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Arda Alara Uludağ
 Doğum Yeri Keçiören
 Doğum Tarihi 25.08.1994
 Uyruğu ☒ T.C. ☐ Diğer:
 Telefon 05414916740
 E-Posta Adresi alara94uludag@gmail.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Biyoloji
 Mezuniyet Yılı 2017

Yüksek Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Biyoloji
 Programı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji