



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



Yüksek Lisans Tezi

**İSTANBUL İLİNDE SATILAN TAVUK ETLİ DÖNER ve
BURGERLERDE *Listeria monocytogenes* VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Sabina MURSALOVA

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU**

Haziran, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.06.2021 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN
AYDOĞDU(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Ünitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31548 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

İstanbul Üniversitesinde Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanım olmayı kabul eden, her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, mesleğinde edindiği deneyimleri benimle paylaşan, samimiyetiyle sevgisini hissettiren, benim için bir tez danışmanından daha fazlası olan canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya,

Yüksek lisans tez konumun seçiminde bana yardımcı olan, tavsiyeler veren Sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Yüksek lisans tezimin uygulanması sırasında teknik ekipmanlarla destek sağlayan Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR'e,

Tez deneylerimde kullandığım standart *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* suşlarıyla edindindikleri deneyimleri benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Seza ARSLAN ve Arş. Gör. Dr. Fatma ÖZDEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca keyifli zaman geçirip, deneyimler kazandığım Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji laboratuvar ekibine (çalışan öğrencilere),

Bana güvenerek, başaracağıma inanan ve yurtdışında eğitim alma kararımı destekleyen canım anneme, babama ve biricik canım kardeşime, her zaman yanımda oldukları için, benim başarıyı kendi başarıları gibi gören diğer ailem HACIOĞLU ailesine en içten sevgilerimle teşekkür ediyorum.

Yapmış olduğumuz bilimsel çalışmanın benden sonraki araştırmacılara ilham vereceğine inanıyor, çalışmalarında yardımcı olacağı için de ayrıca çok mutluluk ve gurur duyuyorum.

Haziran 2021

Sabina MURSALOVA

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.....	3
2.1 LISTERIA CİNSİ BAKTERİLER.....	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Listeria cinsi bakteri türleri	4
2.2 LISTERIA MONOCYTOGENES BAKTERİLERİNİN GENEL VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	6
2.3 LISTERIA MONOCYTOGENES BAKTERİLERİNİN EKOLOJİSİ	8
2.4 LISTERIA MONOCYTOGENES BAKTERİLERİNİN SEROTİPLERİ	8
2.5 LISTERIA MONOCYTOGENES BAKTERİLERİNİN PATOGENEZİ	10
2.5.1. L. monocytogenes enfeksiyonu - Listeriyoz	10
2.5.2. L. monocytogenes' in konakçı hücreye girişi ve çoğalması	12
2.5.3. Listeriyoz vakaları	13
2.5.4. Listeriyoz tedavisi	16
2.6 GIDALARDA LISTERIA MONOCYTOGENES.....	17
2.6.1. Tavuk etinden hazırlanan dönerlerde L. monocytogenes.....	18
2.6.2. Tavuk etinden hazırlanan burgerlerde L. monocytogenes	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1 DENEYDE KULLANILAN SUŞLAR	23
3.2 LISTERIA MONOCYTOGENES' İN DÖNER VE BURGERLERDEN ISO 11290-1 YÖNTEMİYLE İZOLASYONU.....	23
3.3 İZOLE EDİLEN LISTERIA MONOCYTOGENES ŞÜPHELİ SUŞLARININ TANIMLANMASI.....	25

3.3.1.	Gram boyama	26
3.3.2.	Katalaz testi	26
3.3.3.	Oksidaz testi	27
3.3.4.	Nitrat redüksiyon testi	27
3.3.5.	Sulfide, Indole, Motility (SIM) Test.....	28
3.3.6.	Karbonhidrat fermentasyon testleri	28
3.3.7.	Metil kırmızısı - MR testi	29
3.3.8.	Voges Proskauer-VP testi.....	29
3.3.9.	Christie, Atkins and Munch - Peterson - CAMP testi	30
3.3.10.	Hemoliz testi.....	30
3.4	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> AÇISINDAN ŞÜPHELİ DEĞERLENDİRİLEN SUŞLARIN ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ	30
3.4.1.	Kullanılan antibiyotikler.....	30
3.4.2.	Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması	31
3.4.3.	Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi	31
3.5	İZOLE EDİLEN <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TESTLERLE TESPİTİ VE KARAKTERİZASYONU	32
3.5.1.	DNA izolasyonu	32
3.5.2.	İzole edilen DNA' ların Agaroze Jel Elektroforezi ile incelenmesi.....	33
3.5.3.	Şüpheli suşların PZR ile doğrulanması	33
3.5.4.	<i>L. monocytogenes</i> izolatlarının serotiplendirilmesi	34
3.6	ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....	36
3.6.1.	Besiyerler.....	36
3.6.1.1.	<i>Listeria Fraser Broth Base</i>	36
3.6.1.2.	<i>Fraser Broth Base</i>	36
3.6.1.3.	<i>Listeria Chromogenic Agar Base</i>	37
3.6.1.4.	<i>Listeria Oxford Agar Base</i>	38
3.6.1.5.	<i>Tryptone Soya Yeast Extract Agar</i>	38
3.6.1.6.	<i>Nitrat Besiyeri</i>	38
3.6.1.7.	<i>Sulfate Indole Motility (SIM) Besiyeri</i>	39
3.6.1.8.	<i>Peptonlu Su (Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri)</i>	39
3.6.1.9.	<i>Clark-Lubs Besiyeri</i>	39
3.6.1.10.	<i>% 5' lik Koyun kanlı agar besiyeri</i>	40
3.6.1.11.	<i>Muller Hinton Agar</i>	40

3.6.2.	Supplementler.....	40
3.6.2.1.	<i>Ferric Amonium III Citrate Supplement</i>	40
3.6.2.2.	<i>Fraser Half Selective supplement</i>	41
3.6.2.3.	<i>Listeria Chromogenic Selective supplement</i>	41
3.6.2.4.	<i>Listeria Chromogenic Lipase C supplement</i>	41
3.6.2.5.	<i>Listeria Oxford Antimicrobic supplement</i>	41
3.6.3.	Boyalar	42
3.6.3.1.	<i>Kristal Viyole Çözeltisi</i>	42
3.6.3.2.	<i>Lugol Çözeltisi</i>	42
3.6.3.3.	<i>% 96'lık Etil Alkol</i>	42
3.6.3.4.	<i>Sulu Fuksin Çözeltisi</i>	42
3.6.4.	Ayıraç ve Tamponlar	43
3.6.4.1.	<i>% 0.85' lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)</i>	43
3.6.4.2.	<i>Katalaz Testi Ayıracı</i>	43
3.6.4.3.	<i>Oksidaz Testi Ayıracı</i>	43
3.6.4.4.	<i>Nitrat Testi Ayıracı</i>	43
3.6.4.5.	<i>% 5'lik şeker solüsyonu</i>	43
3.6.4.6.	<i>Metil Kırmızısı Ayıracı</i>	43
3.6.4.7.	<i>Voges Proskauer Ayıracı</i>	44
3.6.4.8.	<i>10 M NaOH</i>	44
3.6.4.9.	<i>1 M HCl</i>	44
3.6.4.10.	<i>10X TBE</i>	44
3.6.4.11.	<i>1X TBE</i>	44
3.6.4.12.	<i>Agaroz Jel</i>	44
4.	BULGULAR	46
4.1	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES' İN DÖNER VE BURGERLERDEN ISO 11290-1 YÖNTEMİYLE İZOLASYONU</i>	47
4.2	<i>İZOLE EDİLEN LISTERIA MONOCYTOGENES ŞÜPHELİ SUŞLARININ BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI</i>	50
4.3	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ</i>	54
4.4	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ</i>	56
4.4.1.	<i>Elde edilen bakterilerden DNA izolasyonu</i>	56
4.4.2.	<i>Listeria spp. izolatlarının PZR Uygulaması ile Doğrulanması</i>	56
4.4.3.	<i>L. monocytogenes izolatlarının multipleks PZR ile serotiplendirilmesi</i>	57

5. TARTIşMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR.....	72
EKLER	85
ÖZGEÇMİş	87



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>L. monocytogenes</i> bakterisinin mikroskopik görüntüsü [x1000] (http://microbe-canvas.com).....	6
Şekil 2.2: <i>L. monocytogenes</i> ' in in-vivo enfeksiyon süreci (Cossart ve Lebreton, 2014).....	11
Şekil 2.3: <i>L. monocytogenes</i> ' in hücre içi yaşam döngüsü (Cossart ve Lebreton, 2014). [A: Elektron mikroskopunda görüntü; B: Şematik anlatım]	13
Şekil 3.1: Döner örneklerinden <i>L. monocytogenes</i> ön ve seçici zenginleştirilmesi aşamaları [a: Tavuk etli döner örneğinin laboratuvar ortamında kesilerek parçalara ayrılması; b: Stomacher sonrası H. Fraser ilaveli örnek karışımı; c: solda, H. Fraser brothlu örnek karışımı, sağda, steril H. Fraser broth; d: solda, steril Fraser broth, sağda, 24 saat 37°C'de bekletilmiş Fraser broth karışımı].....	24
Şekil 3.2: ISO 11290-1 metodu şeması.....	25
Şekil 3.3: Nitrat redüksiyon testi.....	28
Şekil 4.1: ALOA besiyerinde üreyen <i>Listeria</i> cinsi bakteri kolonileri.	47
Şekil 4.2: MOX besiyerinde üreyen <i>Listeria</i> cinsi bakteri kolonileri.	48
Şekil 4.3: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının Nitrat redüksiyon testi [solda: pozitif sonuç sağda: negatif sonuç].	51
Şekil 4.4: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının MR/VP testi [solda: MR/VP test pozitif, sağda: MR/VP test negatif].	51
Şekil 4.5: SIM besiyerinde <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının şemsiye şeklinde hareketi.....	52
Şekil 4.6: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının şeker fermentasyon testi [1: Riboz; 2: Mannitol; 3: Ksiloz; 4: Ramnoz; 5: α -metil-D-mannosit].....	52
Şekil 4.7: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının CAMP testi.	53
Şekil 4.8: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının Hemoliz testi.....	53
Şekil 4.9: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılığı testi.....	54
Şekil 4.10: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının antibiyotiklerin zon çapları diagramı.....	55
Şekil 4.11: Tavuk etli dönerlerden izole edilen suşlara ait DNA bantları.	56

Şekil 4.12: <i>iap</i> ve <i>hlyA</i> gen bölgelerine sahip bakterilere ait je elektroforezi görüntüleri [A: <i>iap</i> ve B: <i>hlyA</i> gen bölgeleri; Lad:100 bç ladder, R: RSK 475, 39 ve 44: izolat kodları]	56
Şekil 4.13: İzolatlarda multiplex PZR sonucu [Lad:100 bç ladder (nokta ile işaretli bantların bç cinsinden değerleri yanlarına yazılmıştır), R: RSK 475, 39 ve 44: izolat kodları].....	57



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>Listeria</i> cinsi bakterilerin sınıflandırılması ve türlerinin bulunma yerleri (Orsi ve Wiedmann, 2016).	5
Tablo 2.2: <i>Listeria</i> cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri (Orsi ve Wiedmann, 2016).	7
Tablo 2.3: <i>L. monocytogenes</i> serogrupları (Chen ve diğ., 2017).	9
Tablo 2.4: <i>L. monocytogenes</i> serogruplarının gen bölgeleri (Doumith ve diğ., 2004).	10
Tablo 2.5: AB ülkelerinde 2012–2016 yıllarında onaylanmış Listeriyoz vakalarının ve 100.000 nüfus başına oran dağılımı (ECDC\ EFSA; 2018).	14
Tablo 2.6: Gıda kaynaklı salgınlarla ilişkili 2017 yılı insan listeriyozu olguları (ECDC ve EFSA 2018).	15
Tablo 2.7: Standart metodlar ve kullanılan alanlar (Gasnov ve diğ., 2005)	18
Tablo 3.1: Döner ve hamburger örneklerinin toplanma yerleri ve tarihleri.	22
Tablo 3.2: Deneyde kullanılan antibiyotik diskleri.	31
Tablo 3.3: PZR yönteminde kullanılan primerler.	33
Tablo 3.4: PZR karışımı.	34
Tablo 3.5: <i>iap</i> ve <i>hlyA</i> gen bölgelerinin tespiti için uygulanan PZR koşulları.	34
Tablo 3.6: Multipleks PZRde kullanılan primerler.	35
Tablo 3.7: Multipleks PZR karışımı.	35
Tablo 3.8: Multipleks PZR aşamaları.	35
Tablo 4.1: Tez kapsamında toplanan örnekler.	46
Tablo 4.2: İzolatların izolasyon kaynakları ve suş kodları.	49
Tablo 4.3: <i>L. monocytogenes</i> açısından şüpheli suşların biyokimyasal test sonuçları.	50
Tablo 4.4: <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları.	55

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
-	: Negatif
%	: Yüzde
*	: teyit edilmemiştir
+	: Pozitif
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
atm	: Atmosfer basıncı
a _w	: Su aktivitesi
BaCl ₂	: Baryum klorür
bç	: Baz çifti
cm	: Santimetre
D	: Değişken
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
H ₂ SO ₄	: Sülfirik asit
HCl	: Hidroklorik asit
kb	: Kilo baz
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
M	: Molar
M	: Mikromolar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
N	: Normal
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
pH	: Hidrojen gücü
rpm	: round per minute (dakikadaki devir sayısı)
s	: Saniye
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
<i>actA</i>	: Actin assembly-inducing protein
ALOA	: Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CAMP	: Christie, Atkins and Munch-Peterseon
CDC	: Center for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
FAO	: Food and Agriculture Organization
FDA-BAM	: Gıda ve İlaç Dairesi- Bakteriyolojik Analitik El Kitabı
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
H. FRASER	: Half Fraser
<i>hly</i>	: Hemolizin
ISO	: Uluslararası Standartlar Teşkilatı
<i>iap</i>	: Invasion associated protein
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Listeria spp.</i>	: Listeria cinsi
<i>lmo</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i> geni
MET	: Mezenkimal-Epitelyal Dönüşüm
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MOX	: Modified Oxford Agar
MR	: Metil Kırmızısı
<i>orf</i>	: Open reading frame
PALCAM	: Polymyxin-Acriflavin-Lityum klorür-Seftazidim-Eskulin-Mannitol
<i>prs</i>	: Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RSKK	: Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SIM	: Sulfate Indole Motility
TBE	: Tris borate EDTA
Tris HCl	: Tris Hidroklorik asit

TSA-YE	: Triptik Soy Agar with Yeast Extract
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
VP	: Voges–Proskauer
WHO	: World Health Organization



ÖZET

İSTANBUL İLİNDE SATILAN TAVUK ETLİ DÖNER ve BURGERLERDE *Listeria monocytogenes* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabina MURSALOVA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

Listeria cinsinin 17 türünden biri olan *Listeria monocytogenes*, Gram pozitif çomak şekilli, geniş sıcaklık, pH ve tuzluluk aralığında gelişebilen bir bakteridir. Toprakta, suda, hayvanlarda ve gıdalarda bulunmaktadır. Patojenitesi yüksek olan bu bakteri insanlarda ve hayvanlarda ölümle sonuçlanan ve Listeriyozis olarak adlandırılan enfeksiyon etkenidir. İnsanlarda da oluşan enfeksiyonların büyük çoğunluğu gıda kaynaklıdır. Bakteri, süt ve süt ürünlerinde, çiğ kıymada, kırmızı ve kanatlı etlerinde, hazır ve dondurulmuş yemeklerde, meyve ve sebzelerde bulunmaktadır.

Tez çalışmamızda İstanbul ilinde satışa sunulan (kafe, restoranlar ve marketlerde) tavuk etli döner ve burgerler toplanmış ve laboratuvar ortamında incelenmiştir. ISO 11290-1 (2017) metodu uygulanarak elde edilen *Listeria* cinsi şüpheli suşların Gram boyama, katalaz, oksidaz, SIM besiyerinde hareket, Metil Kırmızısı ve Voges Proskauer, nitrat redüksiyon, şeker (ksiloz, ramnoz, riboz, mannitol ve α -metil-D-mannosit) fermentasyonu, %5' lik koyun

kanlı agar üzerinde CAMP ve β hemoliz testleri yapılmıştır. Biyokimyasal testlerle *Listeria* spp. olarak tanımlanan izolatların *L. monocytogenes* olarak adlandırılmaları için *iap* ve *hlyA* gen bölgeleri incelenmiştir. *L. monocytogenes* olarak tanımlanan izolatların serotiplendirilmesi multipleks PZR yöntemiyle yapılmış ve *lmo 1118*, *lmo 0737*, *orf 2110*, *orf 2819* ve *prs* gen bölgelerine bakılmıştır. Moleküler yöntemlerle doğrulanmış suşların antibiyotiklere direnç profilleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle tespit edilmiştir.

Araştırma sonucunda 100 adet gıda örneğinin 30'undan (biri tavuk etli burger örneğinden) *L. monocytogenes* şüpheli bakteri izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen 51 adet bakterinin % 7.8' nin (D017, D039, D042 ve D044 numaralı suşlar) *Listeria* spp. olduğu biyokimyasal testlerle tespit edilmiştir. Bu suşların ise sadece % 50' sinin (D039 ve D044) *iap* ve *hlyA* gen bölgelerine sahip olduğu belirlenmiştir. *L. monocytogenes* olarak tanımlanan bu iki suşun antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde izolatların her ikisinin sefaklorlara karşı yarı duyarlı; ampicilin, amikasin, amoksisilin/klavulanik asit, gentamisin, sefaklor, trimetoprim-sulfametoksazol, tetrasiklin, kloramfenikol, vankomisin ve klaritromisine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzolatlardan sadece D044'ün rifampine yarı duyarlı olduğu görülmüştür. Her iki izolat da 30 numaralı döner örneğinden izole edilmesine rağmen gerek antibiyotiklere karşı oluşturdıkları zon çapları gerekse rifampine karşı gösterdikleri direnç özellikleri nedeniyle ayrı bakteri suşları olarak değerlendirilmiştir.

L. monocytogenes izolatlarının multipleks PZR yöntemi ile serotipleri incelendiğinde iki izolatın da *prs* ve *lmo 0737* gen bölgelerine sahip 1/2a serotipine ait olduğu doğrulanmıştır.

Bu tez çalışması ile İstanbul ilinin farklı noktalarından toplanan tavuk etli dönerlerin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu ve bakterinin görülme oranının her ne kadar düşük de olsa (% 2) insan sağlığı için tehdit oluşturduğu tespit edilmiştir. Kontaminasyon sebebi olarak çalışılan ortamların hijyen açısından yeterli olmaması, pişirilme sırasında iç kısımların iyi pişmemesi ve bulunan satış noktasında sirkülasyonun çok olması düşünülmektedir.

Haziran 2021, 105 sayfa.

Anahtar kelimeler: Tavuk etli döner, tavuk burger, *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *Listeria monocytogenes* IN CHICKEN MEAT DÖNERS AND BURGERS SOLD IN ISTANBUL PROVINCE

M.Sc. THESIS

Sabina MURSALOVA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

Listeria monocytogenes, is one of the 17 species of the *Listeria* genus, is a Gram-positive rod-shaped bacterium that can grow in wide temperature, pH, and salinity range. It is found in the soil, water, animals, and foods. This bacterium, which has high pathogenicity, is an infection agent called Listeriosis which results in death in humans and animals. The majority of human infections are foodborne. Bacteria are found in milk and cheeses, raw ground beef, red and poultry meats, ready and frozen meals, fruits, and vegetables.

In our thesis, chicken meat doner and burgers which were sold in Istanbul providence (cafes, restaurants, and grocery stores) were collected and examined in the laboratory. Gram staining, catalase and oxidase, movement in SIM medium, methyl red and Voges Proskauer, nitrate reduction, sugar fermentation (xylose, rhamnose, ribose, mannitol, and α -methyl-D-mannocyte), CAMP and β hemolysis tests on 5% sheep blood agar were performed of

suspected strains of *Listeria* obtained using ISO 11290-1 method. The *iap* and *hlyA* gene regions were examined for the identification of *L. monocytogenes* of *Listeria* strains identified by biochemical tests. The serotyping of isolates, identified as *L. monocytogenes*, was performed by multiplex PCR method and *lmo* 1118, *lmo* 0737, *orf* 2110, *orf* 2819 and *prs* gene regions were examined. Antibiotic resistance profiles of strains confirmed by molecular techniques were determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method.

As a result of the research, *L. monocytogenes* suspicious bacteria were isolated in 30 of 100 food samples (one from a chicken meat burger sample). It was defined by biochemical tests that 7.8% of 51 isolated bacteria (strains D017, D039, D042, and D044) were *Listeria* spp. Only 50 % of these strains (D039 and D044) were determined to have *iap* and *hlyA* gene regions. When the antibiotic resistance profiles of these two strains identified as *L. monocytogenes* were examined, both isolates were semi-sensitive to cefaclor; have been found to be sensitive to ampicillin, amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, cefaclor, trimethoprim- sulfamethoxazole, tetracycline, chloramphenicol, vancomycin and clarithromycin. One of the isolates, only D044 was found to be semi-sensitive to rifampin. Although both isolates were isolated from doner sample number 30, they were evaluated as separate bacterial strains due to their zone diameters against antibiotics and their resistance to rifampin.

When the serotypes of *L. monocytogenes* isolates were examined by multiplex PCR method, it was confirmed that two isolates belonged to serovar 1/2a, which had *prs* and *lmo* 0737 gene regions.

By the thesis study, it was determined that chicken meat doners collected from different parts of Istanbul are contaminated with *L. monocytogenes*, and the incidence of bacteria, although low (2%), poses a threat to human health. It is thought that the reason of contamination is working environments are not sufficient in terms of hygiene, the interior parts are not cooked well during cooking and the circulation at the sales point is high as the cause of contamination.

June 2021, 105 pages.

Keywords: Chicken meat Döner, Chicken Burger, *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp.

1. GİRİŞ

Dünyada ve aynı zamanda Türkiye'de nüfusun artmasıyla gıdaya olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda elde edilen istatistiksel sonuçlar insanların yemek yemeye çok zaman harcamadığını ve çabuk hazırlanan gıdaların tercih edildiğini göstermektedir (Onurlubaş ve diğ., 2015). Gıda sektöründe de özellikle hazır yiyeceklerin üretimi böylece her geçen gün artmaktadır.

Hazır yiyecekleri yaş sınırı olmadan küçükten büyüğe, öğrenciden çalışana, herkes tercih etmektedir. Tüm dünyada bu yiyecekler ekonomik olması, çabuk hazırlanması ve doyurucu olmasıyla bilinmektedir. Hazır yiyeceklerin tercih edilmesi, gıda kaynaklı zehirlenmelerin de artmasına sebep olmaktadır.

Günümüzde hazır gıdalarla bulaşan ve besin zehirlenmesine sebep olan bakterilerin başında yüksek patojiniteleriyle bilinen *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* türleri gelmektedir (Gürel ve Aslan, 2019). Türk Gıda kodeksinde (6/2/2009 tarihli) de *Salmonella*, *E. coli* ve *L. monocytogenes*'in gıdaların 25 gramında bulunmaması gerektiği belirtilmektedir.

L. monocytogenes 17 bakteri türünü içeren *Listeria* cinsine ait bir bakteridir. Bu cinse ait türlerden sadece *L. monocytogenes* ve *L. innocua* insanlarda ve hayvanlarda hastalığa sebep olmaktadır. *L. monocytogenes*, birçok farklı ortamda (toprakta, suda ve gıdada) ve ökaryotik hücre içinde hayatta kalma kabiliyetine sahiptir. Bakteri 0.5-2 µm uzunluğa ve 0.5 µm enine sahip küçük basil şekilli, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, aerob veya fakültatif anaerob özelliğe sahiptir. 20-25 °C' de peritrik flagellasıyla hareket etmektedir (Beaufort ve diğ., 2014). Yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 10) ve düşük sıcaklıklarda (-0.5–9.3 °C), ayrıca geniş bir pH aralığında (4.7-9.2) da hayatta kalarak çoğalabilmektedir (Paduroa ve diğ., 2020). Biyokimyasal testlerden Metil kırmızısı, Voges-Proskauer, Katalaz testlerine pozitif, oksidaz, nitrat redüksiyon testlerine negatif sonuç vermektedir (Weller ve diğ., 2015).

Çevresel bakteri olan *L. monocytogenes*, aynı zamanda birçok gıdada da bulunabilmektedir. Yapılan araştırmalar bakterinin çiğ ve pişmiş ette (kırmızı ve kanatlı etinde), kıymada, meyve ve sebzelerde, peynirlerde, kaymaklarda ve dondurmalarda, hazır tüketilen salatalarda

bulunabildiğini ortaya koymaktadır. Bakteri, gıdalara hazırlanma işlemleri sırasında veya ortam koşullarının uygun olmaması durumunda bulaşmaktadır (Tomar ve Akarca, 2018).

Türkiye'de de yaygın olarak bulunduğu ve hastalığa sebep olduğunu kanıtlanan (Nur ve diğ., 2017; Altun ve Atasever, 2018; Arslan ve Baytur, 2018; Tomar ve Akarca, 2018) *L. monocytogenes*, ağır klinik hastalıklara ve % 46' a kadar yüksek ölüm oranına sebep olan önemli bir patojendir (Dickstein ve diğ., 2019). Bakterinin yaratmış olduğu hastalık Listeriyoz olarak bilinmektedir ve ağır invaziv (menenjit, sepsis, endokardit, bakteriyemi) ve non invazif (febril gastroenterit) enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Chen ve diğ., 2017). Hastalık açısından risk gruplarını yenidoğanlar, yaşlılar, bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler ve hamile kadınlar oluşturmaktadır (Muchaamba ve diğ., 2019).

L. monocytogenes, geniş yaşam alanı ve psikrotrofik karakterinden dolayı işlem görmüş veya soğutulmuş gıda ürünleri için kontaminant olarak önemli bir tehlike arz etmektedir (Lianou ve diğ., 2021). Bu gıdalar içerisinde yer alan tavuk etli dönerler ve hamburgerlerin *L. monocytogenes* dahil olmak üzere bir çok gıda patojeni bakteri ile kontamine olabildiği bilinmektedir (Osaili ve diğ., 2011; Gökmen ve diğ., 2016). Bu sebeple bulaş riskinin yüksek olduğu döner ve hamburgerlerin bu bakteri açısından incelenmesi toplum sağlığı için önemlidir. Belirtilen sebeplerden dolayı planlanan tez çalışmasının amacı, İstanbul ilinin farklı noktalarında pişirilmiş ve dondurulmuş olarak satılan tavuk etli döner ve burger köftelerin *L. monocytogenes* açısından halk sağlığı için ne kadar riskli olduğunu teyit etmektir. Tez çalışması kapsamında İstanbul ilinin farklı lokasyonlarında bulunan satış noktalarından, marketlerden ve alışveriş merkezlerinden hazır pişirilmiş ve dondurulmuş halde satılan tavuk etli döner ve hamburgerler satın alınmış ve soğuk zincir altında uygun saklama koşulları sağlanarak laboratuvar ortamına getirilerek mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Tez çalışmasında 2017 yılında yayınlanan ISO 11290-1 standart metodu uygulanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 *LISTERIA* CİNSİ BAKTERİLER

2.1.1. Tarihçe

Listeria monocytogenes bakterisinin ilk olarak tanımlanması 1891-1893 yıllarında Fransa ve Almanya'da araştırmacıların (Hayem ve Henli) hasta bireylerde enfeksiyona sebep olan mikroorganizmanın bulmasına dayanmaktadır (Gray ve Killinger, 1966). Ardından patojen bakteri 1911 yılında İsveç'te tavşan ciğerinde, 1917-1920 yıllarında menenjitli hastaların omuriliğinde, 1925 yılında Almanya'da koyunlarda bulunmuştur. Ancak 1926 yılına kadar bakterinin tam olarak tanısı yapılamamıştır (Halkman, 2013).

Murray ve diğ. 1926 yılında laboratuvar tavşanları ve bir kobay türü olan guinepig (*Cavia porcellus*) üzerinde epizootik salgına neden olan bir bakteri izole etmişler (Murry ve diğ., 1926). Monositozla karakterize edilen ve hastalığa sebep olan bakteri “*Bacterium monocytogenes*” olarak adlandırılmıştır. Bu bakteri, 1927 yılında Johannesburg, Güney Afrika yakınlarındaki gerbillerde görülen olağandışı ölümlerin araştırılması sırasında Pirie tarafından keşfedilmiş ve “Tiger River” olarak adlandırdığı hastalığa sebep olan bakterinin henüz literatüre girmemiş Gram pozitif bir basil olduğu açıklanmıştır. Bu yeni ajanın isimlendirilmesi için bakteriyoloji biliminin en meşhur araştırmacılarından biri olan Lord Lister'in anısına cins ismi olarak “*Listerella*” ve en çarpıcı patojenik etkisinden (hepatolitik etkisi) dolayı tür adı olarak da “*hepatolitica*” yani *Listerella hepatolitica* adı ortaya atılmıştır.

Murray ve Pirie keşfettikleri suşları birbirilerinden habersiz Londra'da bulunan Lister Enstitüsü'ndeki Ulusal Tip Koleksiyonuna (National Type Collection) göndermişler, enstitüyü yöneten Dr. Leningham, iki mikroorganizmanın benzerliğinden etkilenmiş ve Murray ile Pirie'yi tanıştırmıştır. Araştırmacılar, özellikleri aynı olduğu için keşfedilen bu mikroorganizmanın *Listerella monocytogenes* olarak adlandırmasına karar vermiştir.

Bununla birlikte, 1939'da Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi'nin Adli Komisyonu, “*Listerella*” cins ismi daha önce 1906 yılında bir mycetozoan türünde (*Listerella paradoxa*) Arthur Lister (Lord Lister'in küçük kardeşi) anısına ve 1933 yılında foraminifer türünde (*Listerella cushman*) Joseph Jackson Lister (Lord Lister'in babası) anısına kullanıldığı

için, *Listerella* adını reddetmiştir. Gibbons 1972 yılında bir babanın ve iki oğlunun katkılarını onurlandırmak için aynı adın üç farklı mikroorganizma grubu için seçilmesinin kesinlikle tesadüf olduğunu belirtmiştir (Gibbons, 1972). 1940 yılında Pirie, *Listeria* ismini önermiş ve bu tarihten itibaren bakteri *Listeria monocytogenes* olarak adlandırılmıştır (Rocourt ve Buchrieser, 2007).

2.1.2. *Listeria* cinsi bakteri türleri

Listeria cinsi bakteriler, Gram pozitif, spor oluşturmayan, kapsülsüz, çomak şeklinde bakterilerdir. Cins 1-45 °C arasındaki sıcaklıkta yaşayabilen, katalaz pozitif, nitratı nitrite redükte eden, Metil kırmızısı (MR) ve Voges Proskauer (VP) testine pozitif sonuç veren türler içermektedir (Orsi ve Wiedmann, 2016; Martinez-Rios ve diğ., 2019).

17 farklı türü bulunan *Listeria* cinsi içerisinde sadece *L. monocytogenes* (insanlarda ve hayvanlarda) ve *L. ivanovii* (sadece hayvanlarda) patojen olarak kabul edilmektedir (Mishra ve diğ., 2011). Bu cinste yer alan diğer türler ise *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* ve *Listeria booriae* dir (Nayak ve diğ., 2015). Tür sınıflandırmaları taksonomik kriterler (DNA-DNA hibridizasyon verileri) ile desteklenmektedir. Tüm bu *Listeria* türleri Uluslararası Sistematik ve Evrimsel Mikrobiyoloji Dergisi' ndeki (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) farklı yayınlarda tanımlanmıştır (Orsi ve Wiedmann, 2016).

Listeria türleri *Listeria sensu lato* ve *Listeria sensu stricto* olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır (Tablo 2.1). İnsan ve hayvan patojeni *L. monocytogenes* ve hayvan patojeni *L. ivanovii*, semptomsuz hayvanlardan izole edilen diğer dört türle (*L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. welshimeri*, ve *L. innocua*) birlikte, “*Listeria sensu stricto*” grubunu oluşturmaktadır. Bu türlerden *L. marthii* dışında, diğerleri 1985 yılından önce tanımlanmıştır. *L. marthii* 2010 yılında ilk defa keşfedilmiştir (Graves ve diğ., 2010). “*Listeria sensu lato*” grubuna ait türlerin, memeli konaklarında kolonileşme yeteneği olmayan çevresel bakteriler olduğuna inanılmaktadır (Scharadt ve diğ. 2017) ve bu gruba ait türler 2009 yılından sonra keşfedilmiştir. Grup, 11 *Listeria* türünü – *L. rocourtiae* (Leclercq, 2010), *L. grayi* (Rocourt ve diğ., 1992), *L. fleischmannii* (Bertsch ve diğ., 2013), *L. weihenstephanensis* (Halter ve diğ., 2013), *L. floridensis* (Bakker ve diğ., 2014), *L. aquatica* (Bakker ve diğ., 2014), *L. newyorkensis*

(Weller ve diğ., 2015), *L. cornellensis* (Bakker ve diğ., 2014), *L. grandensis* (Bakker ve diğ., 2014), *L. riparia* (Bakker ve diğ., 2014) ve *L. booriae* (Weller ve diğ., 2015) – içermektedir (Orsi ve Wiedmann, 2016).

Tablo 2.1: *Listeria* cinsi bakterilerin sınıflandırılması ve türlerinin bulunma yerleri (Orsi ve Wiedmann, 2016).

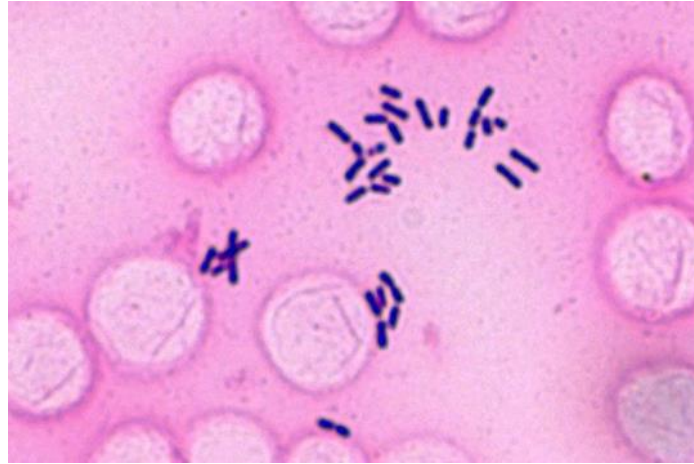
	Listeria türleri	İzolasyon kaynağı	Bulunduğu ülke	Bulunma yılı	Referans
<i>Listeria sensu stricto</i>	<i>L. seeligeri</i>	-	-	1983	Rocourt ve Grimont
	<i>L. marthii</i>	Doğal çevre	Nyu York, ABD	2010	Graves ve diğ.
	<i>L. monocytogenes</i>	İnsan	-	1929	Nyfeldt
	<i>L. ivanovii</i>	Doğal çevre	-	1984	Seeliger ve Schoofs;
	<i>L. welshimeri</i>	Doğal çevre	-	1983	Rocourt ve Grimont
	<i>L. innocua</i>	Doğal çevre	-	1981	Seeliger ve Schoofs
<i>Listeria sensu lato</i>				1994	Bernagozzi ve diğ.
	<i>L. grayi</i>	Çeşitli yerler	Dünya çapında	2000	Hofer ve diğ.;
				2005	Schlech ve diğ.;
				2007	Jallewar ve diğ.;
				2015	Bouayad ve diğ.;
		Peynir ve olgunlaşma mahzenleri;	İsviçre	2013	Bertsch ve diğ.;
	<i>L. fleischmannii</i>	Peynir;	Güney İtalya	2014	Bakker ve diğ.;
		Çevresel örnekler, sığır çiftliği	Kolorado, ABD		
	<i>L. floridensis</i>	Akar su	Florida, ABD	2014	Bakker ve diğ.
	<i>L. aquatica</i>	Akar su	Florida, ABD	2014	Bakker ve diğ.
		Gıda ile temasta olmayan su ürünleri	Kuzeydoğu ABD		
	<i>L. newyorkensis</i>	işleme tesisleri yüzeyi;		2015	Weller ve diğ.
		Çiğ sütler	Güney İtalya		
	<i>L. cornellensis</i>	Su	Kolorado, ABD	2014	Bakker ve diğ.
	<i>L. rocourtiae</i>	Kesilip bekletilmiş marul	Salzburg, Avusturya	2010	Leclercq
	<i>L. weihenstephanensis</i>	Havuzun bitki örtüsü	Almanya	2013	Halter ve diğ.
	<i>L. grandensis</i>	Su	Kolorado, ABD	2014	Bakker ve diğ.
	<i>L. riparia</i>	Akar su	Florida, ABD	2014	Bakker ve diğ.
		Gıda ile temasta olmayan süt işleme tesisleri yüzeyi	Kuzeydoğu ABD	2015	Weller ve diğ.

Son birkaç yılda yapılan araştırmalar sonucunda yeni *Listeria* benzeri türler izole edilmiştir. *L. costaricensis* 2018 yılında Kosta Rika' daki bir gıda işleme drenaj sisteminden izole edilmiştir. Bu bakteri *L. floridensis*'le % 98.7 benzerlik göstermektedir. Bulunan yeni suş *Listeria* cinsi bakterilerden katalaz reaksiyonunun olmaması, potasyum 5-ketoglukonattan asit üretmesi ve BHI besiyeri üzerinde sarı bir pigment üretmesiyle fark yaratmaktadır (Montero ve diğ., 2018).

L. goaensis Hindistan' da Goa eyaletinde bulunan bataklıktan izole edilmiştir. *L. fleischmannii*' ye filogenetik olarak daha yakındır (Doijad ve diğ., 2018). Tayland' daki gıda örneklerinde *Listeria* türlerinin taranması sırasında, kızartılmış tavuktan *Listeria* benzeri bir bakteri izole edilmiş ve bilinen hiçbir türe ait olmadığı tespit edilmiştir. Tür *L. thailandensis* olarak adlandırılmıştır (Leclercq ve diğ., 2019).

2.2 *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN GENEL VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

L. monocytogenes Gram pozitif, fakültatif anaerop, kapsülsüz, psikrotrof, spor oluşturmayan, hücre içi patojen bir bakteridir (Warriner ve Namvar, 2009; McLauchlin ve diğ., 2014; Milian ve Cifre, 2014).



Şekil 2.1: *L. monocytogenes* bakterisinin mikroskopik görüntüsü [x1000] (<http://microbe-canvas.com>).

Bakteri kısa, kenarları yuvarlak, çubuk veya kokobasil şeklinde olup, 0.4-0.5 µm çapında ve 0.5-2.0 µm uzunluktadır (Şekil 2.1). Patojen 1-45 °C, pH 4.1-9.6 aralığında hayatta kalmaktadır. Optimum ortam koşulları ise 30-35 °C ve pH 5.0-9.6 değerlerine sahip olmalıdır (George ve diğ., 1988; Martinez-Rios ve diğ., 2019). Yüksek tuz oranı koşullarında, oksidatif

streste, ozmotik strese ve karbon açlığı gibi kötü koşullarda da hayatta kalmaktadır. Ayrıca UV radyasyonuna, γ ışınlarına ve röntgen ışınlarına karşı dirençli olabilirler (Chen ve diğ., 2017).

30 °C'in altında, özellikle 22-28 °C arasındaki sıcaklıklarda peritritik flagellasıyla (hücre başına 4 - 6 arası) "yuvarlanma" şeklinde hareket etmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Khademi ve Sahebkar, 2019).

Tablo 2.2: *Listeria* cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri (Orsi ve Wiedmann, 2016).

Biyokimyasal Özellikler	<i>Listeria türleri</i>																
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. marthii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. rocourtiae</i>	<i>L. weihenstephanensis</i>	<i>L. cornellensis</i>	<i>L. riparia</i>	<i>L. grandensis</i>	<i>L. fleischmannii</i>	<i>L. aquatica</i>	<i>L. floridensis</i>	<i>L. newyorkensis</i>	<i>L. booriae</i>
Katalaz	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	?	+	-	+	-	-	-
Oksidaz	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	?	+	-	+	-	-	-
4 °C' de gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Metil kırmızısı	+	+	+	+	+	+	+	?	?	?	+	?	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-
Nitrat	-	-	-	-	-	-	?	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β hemoliz	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMP (S. aureus)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Metil-D-mannosit	+	-	*	-	*	-	+	-	-	-	?	-	?	-	-	-	-
Sukroz	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-
L-Ramnoz	+	?	-	-	?	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-Riboz	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	?	+	+	+	-	+	?
Laktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+	-	+	-	+	+	+
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	?	-	?	-	-	+	+
D-Galaktoz	?	-	-	?	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-glükoz	V	V	-	V	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorboz	V	V	-	V	-	V	V	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-
L-Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	+	-	-	+	+	+	+
Gliserol	?	+	+	+	+	-	?	+	+	?	?	-	+	?	-	+	+
+: pozitif	?: değışkendir																
- :negatif	*: tespit edilmemiştir																
	V: farklı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir																

Sitokromlar ve glikozun homofermentatif aerobik katabolizması sonucunda L (+) - laktik asit, asetik asit ve diğer son ürünler üretmektedir. Glukoz dışında diğer şekerlerden gaz üretmemektedir (Liu, 2008). *L. monocytogenes* bakterileri su aktivitesi (a_w) 0.87-0.97 aralığında olan ortamlarda canlılığını sürdürmektedir. Bakteri halotolerant olup yüksek NaCl (% 10-12) konsantrasyonuna sahip ortamlarda üreyebilmektedir (Vos ve diğ., 2009). *L.*

monocytogenes ve diğer *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir (Weller ve diğ., 2015; Barre ve diğ., 2016; Orsi ve Wiedmann, 2016).

2.3 *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN EKOLOJİSİ

L. monocytogenes, çevrede (tarımsal bölgelerde ve suda), hayvanlarda ve gıdalarda yaygın olarak bulunan patojen bir bakteridir. Yapılan araştırmalarda *L. monocytogenes*'in çayirlara ve suya daha yakın, daha fazla neme sahip (ekili, sulanmış veya yağmur yağmış) topraklarda daha yüksek bir yaygınlıkla bulunmakta olduğu gösterilmiştir (Buchanan ve diğ., 2017).

Birçok çalışmada *L. monocytogenes*'in gıda işleme ortamlarında da yaygın olduğu gösterilmiştir. Bu bakteriler gıda işleme ortamlarına ham maddelerden, insan veya çalışılan ekipmanlardan çapraz kontaminasyon yoluyla bulaşmaktadır. Çalışılan ortamlarda hijyenin göz ardı edilmesi patojen bakterinin hayatta kalmasına neden olmaktadır (Carpentier ve Cerf, 2011; Ferreira ve diğ., 2014; Buchanan ve diğ., 2017).

Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan polistiren, cam, kauçuk ve paslanmaz çelik gibi malzemelerin yüzeyinde biyofilm oluşabilmektedir (Ripolles-Avila ve diğ., 2019). Biyofilm oluşturma, bakterinin yüksek konsantrasyonlu dezenfektanlar ve antimikrobiyallere karşı dayanıklılığını arttırmaktadır. Bu da gıda ile temas eden yüzeylerin sürekli kirlenmesine neden olabilmektedir (Valimaa ve diğ., 2015).

L. monocytogenes'in oldukça geniş bir sıcaklık aralığında hayatta kalabildiği farklı araştırmalarla ortaya konulmuştur. Buzdolabı sıcaklığında yaşayabilen bakteri, ısıl işlem gören gıdalarda da hayatta kalmaktadır. Araştırmalar sırasında süt ve süt ürünlerinde, dondurulmuş gıdalarda, tavuk ve kırmızı et ürünlerinde, deniz hayvanları, tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Jami ve diğ., 2014; Lokerse ve diğ., 2016; Campagnollo ve diğ., 2018; Ziegler ve diğ., 2019).

2.4 *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN SEROTİPLERİ

Serotiplendirme, *Listeria* cinsi bakterilerin özellikle izole edilen suşların epidemiyolojik amaçla gruplandırılmasında faydalı bir yöntemdir. *Listeria* suşları somatik (O) ve flagellar (H) antiijenlerine göre serotiplere ayrılmaktadır. *L. monocytogenes* için bilinen 15 serotip: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e 5, 6a, 6b ve 7 vardır (Chen ve diğ., 2017). Bu antiijenler *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* arasında paylaşılmıştır

(Tablo 2.3). Bu serotipler Sınıf I (1 / 2b, 3b, 4b, 4d ve 4e), Sınıf II (1 / 2a, 1 / 2c, 3a ve 3c), Sınıf III serotipleri (4a ve 4c) ve daha az bulunan Sınıf IV (4a, 4c ve atipik 4b) olmak üzere 4 sınıfta gruplandırılmıştır (Allerberger, 2003; Chen ve diğ., 2017).

Tablo 2.3: *L. monocytogenes* serogrupları (Chen ve diğ., 2017).

Serovar	O antijeni	H antijeni
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
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
5 ^a	(III), V, VI, (VIII), X	A, B, C
6a ^a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
6b ^a	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C

^a:Serovarlar, *L. monocytogenes* olmayan türlerde de (*L. innocua*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri*) ortaya çıkmaktadır.

Serotiplerin fazlalığına rağmen, sadece üç serotip (1/2a, 1/2b ve 4b) gıdalarda daha sık rastlanmakta ve insanlarda klinik vakaların çoğuna neden olmaktadır (Datta, 2003; Paduro ve diğ., 2020). 1/2a serotipi gıdalardan en sık izole edilen olsa da 4b serotipi, insan salgınlarının çoğuna neden olmaktadır (Gilot ve diğ., 1996). Aynı zamanda insanlarda listeriosis vakalarının %95-96' sı bu 3 serotipten kaynaklanmaktadır (Swaminathan ve Gerner-Smidt, 2007; Kramarenko ve diğ., 2013). 4b serotipi epidemik listeriyoza, 1/2a ve 1/2b serotipleri ise sporadik enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Chen ve diğ., 2017).

L. monocytogenes bakterisinde virulans üzerinde etkisi olan çok fazla gen bölgesi mevcuttur (Şahin ve diğ., 2020). Bu gen bölgeleri aynı zamanda bakterinin çevresel koşullara hızlı adaptasyonunda da etkilidirler. Bu gen bölgelerinden biri *lmo* (*Listeria monocytogenes*) gen bölgesidir. *lmo* lokusunda farklı proteinleri sentezleyen çeşitli sayıda gen bulunmaktadır. Bu proteinlerin bir kısmının işlevi bilinmekle birlikte bir kısmı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Örneğin *lmo 0551* hücre dışı proteinleri, *lmo 0105* kitinaz proteinini sentezlemektedir. *lmo 1118* ve *0737* ise görevleri bilinmemekle birlikte *L. monocytogenes*

serotipleri ile ilişkili olduğu kanıtlanmış genlerdir. *lmo* 1118 gen bölgesi 1/2 c ve 3c, *lmo* 0737 1/ 2a, 1/2 c, 3a ve 3c serotiplerinde görülmektedirler (Guariglia-Oropeza, 2018).

Hem virülans hem de serotipendirme ile ilgili gen bölgesi ise *orf* (Open Reading Frames)dir. Bu genler hücre metabolizması, hücre çoğalması ve hücre içi taşıma olaylarında rol oynayan proteinleri sentezler. Aynı zamanda bu genlerden *orf* 2819 kodlu geni 1/2b, 3b, 4b, 4d ve 4e, *orf* 2110 4b, 4d ve 4e serotiplerinde görülmektedir (Palumbo, 2005).

prs (Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase) geni, tüm *Listeria* türlerinde bulunan fosforibosil pirofosfat sentetaz enzimini kodlamaktadır (Rosa-Zariñana, 2018). Moleküler ağırlığı düşük maddelerden purin ve pirimidin nükleotidlerini De novo biyosentetik yolu ile sentezlemesinde rol alan bu enzimin tüm *Listeria* türlerinde olması normaldir. Bu nedenle serotiplendirmede ayırt edici olmasa da kontrol amacıyla multipleks PCR' da kullanılır.

Tablo 2.4: *L. monocytogenes* serogruplarının gen bölgeleri (Doumith ve diğ., 2004).

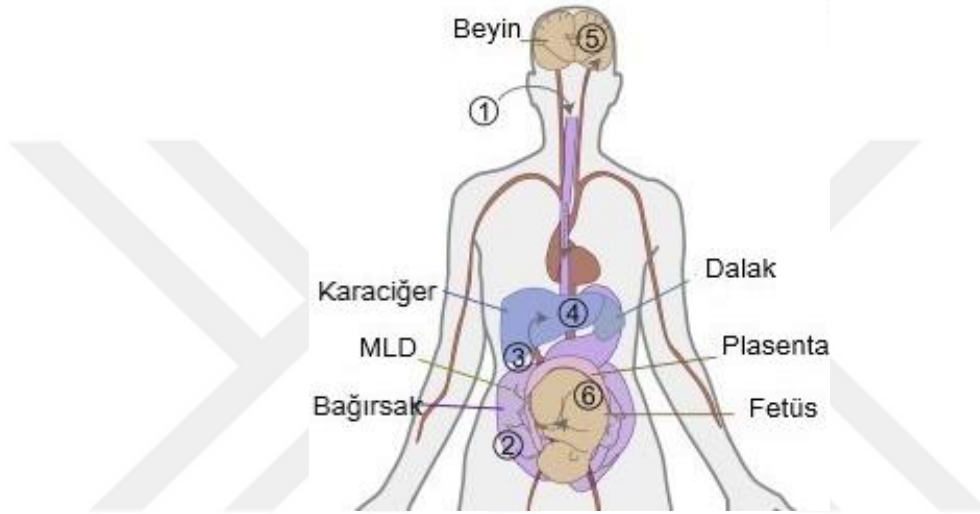
Serovar	<i>lmo</i> 1118 (906 bç)	<i>lmo</i> 0737 (691 bç)	<i>orf</i> 2110 (597 bç)	<i>orf</i> 2819 (471 bç)	<i>prs</i> (370 bç)
1/2a	-	+	-	-	+
1/2b	-	-	-	+	+
1/2c	+	+	-	-	+
3a	-	+	-	-	+
3b	-	-	-	+	+
3c	+	+	-	-	+
4a	-	-	-	-	+
4b	-	-	+	+	+
4c	-	-	-	-	+
7	-	-	-	+	+

2.5 LISTERIA MONOCYTOGENES BAKTERİLERİNİN PATOGENEZİ

2.5.1. *L. monocytogenes* enfeksiyonu - Listeriyoz

1929 yılında Nyfeldt, mononukleozlu bir hastanın kanından *L. monocytogenes* bakterisini izole etmeyi başararak ilk insan listeriyoz vakasını raporlamıştır (Nyfeldt, 1929). Günümüzde patojen % 46 ölüm oranıyla karakterize edilen ciddi bir enfeksiyona (Listeriyoz) sebep olmaya devam etmektedir (Dickstein ve diğ., 2019). Enfeksiyon insanlarda ve hayvanlarda

görülmektedir. Patojenin neden olduğu insan listeriyozu, invazif ve non-invazif enfeksiyonlar şeklinde görülmektedir. Ağır invaziv enfeksiyonlar menenjit, sepsis, endokardit, birincil bakteriyemi, grip benzeri hastalık, menenjit dışı merkezi sinir sistemi enfeksiyonu şeklinde tanımlanırken invazif olmayan enfeksiyonlar febril gastroenterite neden olmaktadır (Chen ve diğ., 2017). Yapılan araştırmalar sonucunda ateşli gastroenteritin, sağlıklı kişilerde ortaya çıktığı ve ateş, baş ağrısı, mide bulantısı, ishal, eklem ve kaslardaki ağrılar şeklinde semptomların görüldüğü bildirilmiştir (Craig ve diğ., 2019).



Şekil 2.2: *L. monocytogenes*’ in in-vivo enfeksiyon süreci (Cossart ve Lebreton, 2014).

Vücuda ağız yoluyla girdikten sonra sindirim sistemi boyunca canlı kalarak bağırsağa geçen *L. monocytogenes* bakterisi, buradan dolaşım sistemi yoluyla farklı organlara yayılarak değişik şiddette seyreden enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Şekil 2.2’de şematize edilen bu enfeksiyonları aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz:

1. Kontamine gıda yutulduktan sonra, bakteriler sindirim kanalında kolonize olabilir,
2. Bağırsak bariyerini geçebilir,
3. Mezenterik lenf düğümlerine (MLN) ulaştıktan sonra sistemik dolaşıma erişebilirler.
4. Enfeksiyonun birincil hedef organları karaciğer ve dalaktır. Bu durum bakterinin konak immun sistemine karşı korunabilmek için bu organları kullandığı ve bu sebeple immun sistemin enfeksiyonu engelleyemediği anlamına gelmektedir.
5. *L. monocytogenes* kan-beyin bariyerini geçerek beyne ulaşabilir, bu da *menenjit* veya *ensefalit* ile sonuçlanmaktadır.
6. Gebe kadınlarda, plasental bariyerinin aşılması, düşük veya neonatal enfeksiyona neden olabilir.

Keşfedildiği zamandan günümüze kadar *L. monocytogenes*'e bağlı febril gastroenterit salgınları farklı kıtalarda bildirilmiş ve bildirilmeye devam etmektedir (Jackson ve diğ., 2012; Maurella ve diğ., 2018). Aynı zamanda enfeksiyon yaşlıları, hamileleri, yeni doğanları, bağışıklık sistemi baskılanmış kişileri, organ nakli veya çeşitli kanser türlerine sahip hastalar dahil olmak üzere, hassas bireyleri etkilemektedir. Listeriyoz hamile annelerde, sıklıkla hafif ateşli bir hastalık olarak ortaya çıkmakta ve düşüğe sebep olmaktadır (Schlech ve Achenson, 2000; Schlech ve diğ., 2005; Mohammed, 2019).

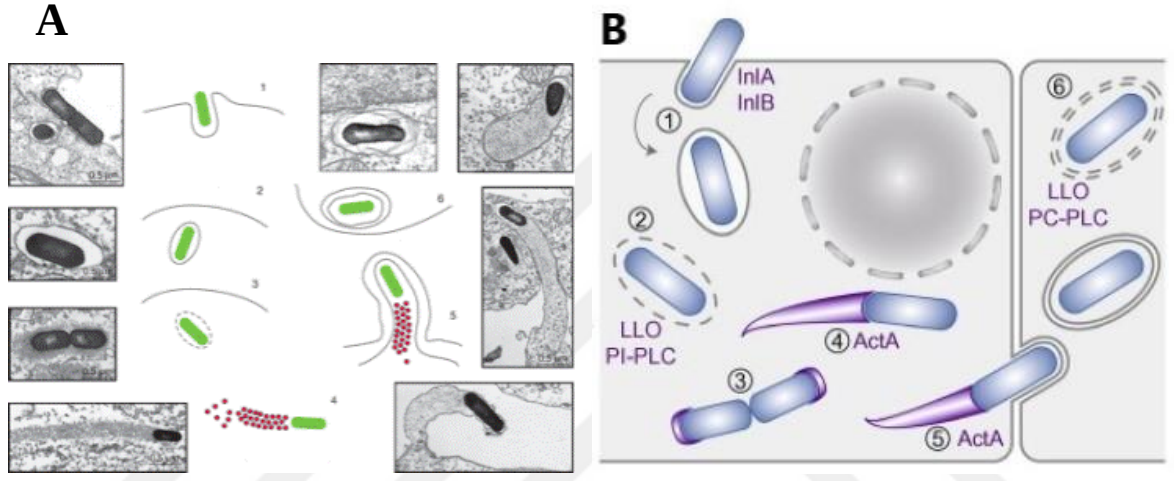
Listeriyozis bebeklerde (100.000 popülasyonda 10 vaka) ve yaşlılarda (100.000 popülasyonda 1.4 vaka) daha sık görülmektedir. Bebekler enfeksiyonu iki şekilde almaktadırlar. Gebelerde, kontamine gıda tüketimi ile gastrointestinal kanalda kolonize olan bakteri, korioamniyonit ve septik bir bebek doğumu ile sonuçlanan gizli sepsis gelişimine sebep olabilir. Alternatif olarak bu bakteri, gastrointestinal kanalda ve perianal bölgede *Listeria* taşıyan annelerden de doğum sırasında bebeğin cildine ve solunum yoluna bulaşmaktadır. Bu bulaşmaya maruz kalan bebeklerde doğumdan 2 veya 3 hafta sonra bakteriyel menenjit gelişmektedir (Schlech ve Achenson, 2000).

Patojen bakteri sadece insanlarda değil aynı zamanda hayvanlar için de sağlık açısından tehdit oluşturmaktadır. Ruminantlarda epidemik düşüklere ve ensefalite neden olup veterinerlikte problem yaratmaktadır. Bu ensefalit, arka beyinde enfeksiyon oluşması sonucunda ölümden önce hayvanları etkileyen ataksiye yol açtığı için *L. monocytogenes*' in yaratmış olduğu enfeksiyon “çember hastalığı” olarak adlandırılmıştır (Schlech ve Achenson, 2000). Dünya genelinde hayvan listeriyozu vakaları Afrika’da, Güney ve Kuzey Amerika’da, Asya’ da ve Avrupa’ da birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Orsi ve Wiedmann, 2016).

2.5.2. *L. monocytogenes*' in konakçı hücreye girişi ve çoğalması

L. monocytogenes' in birden fazla konakçı bariyerini geçme kapasitesi, bakterinin, konakçı hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girerek epitel hücreleri gibi non-fagositik hücreleri istila etme kabiliyetine dayanır. Bakteri konakçı hücre yüzey internalinleri olan InlA ve InlB aracılığı ile yapışır (Şekil 2.3). Bu yapışmada konak hücre yüzeyindeki E-kaderin ve Met (mezenkimal-epitelyal dönüşüm) reseptörleri rol oynamaktadır. Bu bağlanma, bakterinin fagositik bir vakuol ile hücre içine alımını sağlar (1). *hly A* geni tarafından sentezlenen listeriolisin O (LLO) ve *plc* genleri tarafından sentezlenen fosfatidilinositid fosfolipaz C' nin (PI-PLC) etkisiyle (2) vakuol parçalanır. Bakteri, sitosolik kaynakları kullanarak (3) hücre

içinde çoğalır. Bakteriyel yüzey proteini ActA, Arp2/3 kompleksinin oluşumunu stimüle ederek hücrel aktin polimerizasyonunu uyarır. Bu sayede bakteri hücre içinde hareket edebildiği(4) gibi bir konak hücreden diğerine de geçebilir (5). Bu sayede komşu hücreye taşınan bakteri iki hücrenin membranlarını da içeren özel bir vakuol ile sarılmış olur. Çift membranlı bu vakuol bakterinin konaklar arasında güvenli geçişini sağlar. İkinci konağa girişi tamamlanan bakteri tarafından salgılanan LLO ve PC-PLC etkisiyle çift membranlı vakuol yırtılır ve böylelikle ikinci bir hücrenin istilası tamamlanmış olur (6).



Şekil 2.3: *L. monocytogenes*' in hücre içi yaşam döngüsü (Cossart ve Lebreton, 2014). [A: Elektron mikroskopunda görüntü; B: Şematik anlatım]

2.5.3. Listeriyoz vakaları

İnsan listeriyozu özellikle Avrupa ve ABD'de gıda kaynaklı hastalıkların neden olduğu vakalar arasında en sık rastlanan enfeksiyondur. Yüksek ölüm oranı (yaklaşık % 20-46) ve hastanede yatış oranı (>%95) insan listeriyozunu en ölümcül gıda kaynaklı hastalıklardan biri yapmaktadır. ABD' de, yılda yaklaşık 1600 listeriyoz vakası bildirilmektedir. Bu vakalardan % 15-20'si ölümlle sonuçlanmaktadır (Datta ve Bural, 2018).

Scallan ve diğ. (2011), *L. monocytogenes* enfeksiyonuna yakalanmış hastaların hastanelik olma oranının yaklaşık % 99 olduğunu bildirmiştir. Noordhout ve diğ. (2014), birçok ülkede incelenen vakaları göz önünde bulundurarak hastalıktan ölme oranını % 24'e yakın olduğunu rapor etmiştir. 2019 yılında Maia ve diğ. tarafından sunulan çalışmada ise Avrupa'da kontamine gıda tüketimine bağlı Listeriyozis enfeksiyonundan ölüm oranının % 16.2 olduğu bildirilmiştir. ECDC 2012-2016 yıllarında Avrupa ülkelerinden toplam 2520 Listeriyoz vakası

bildirmiştir (Tablo 2.5). Raporda listeriyoz vakalarının ülkelere ve yıllara göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (ECDC, 2018).

Tablo 2.5: AB ülkelerinde 2012–2016 yıllarında onaylanmış Listeriyoz vakalarının ve 100.000 nüfus başına oran dağılımı (ECDC\ EFSA; 2018).

Ülkeler	2012		2013		2014		2015			2016		2017
	N	O	N	O	N	O	N	O	O.V	O	R.V	N
Avusturya	36	0,43	36	0,43	49	0,58	38	0,44	46	0,53	46	32
Belçika	83	1,36	66	0,85	84	1,07	83	0,92	104	1,15	104	73
Bulgaristan	10	0,14	3	0,04	10	0,14	5	0,07	5	0,07	5	13
Hırvatistan	0	0	0	0	4	0,09	2	0,05	4	0,10	4	8
Kıbrıs	1	0,12	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0
Çek Cumhuriyeti	32	0,30	36	0,34	38	0,36	36	0,34	47	0,45	47	30
Danimarka	50	0,90	51	0,91	92	1,63	44	0,78	40	0,70	40	58
Estonya	3	0,23	2	0,15	1	0,08	11	0,84	9	0,68	9	4
Finlandiya	61	1,13	61	1,12	65	1,19	46	0,84	67	1,22	67	90
Fransa	346	0,53	369	0,56	373	0,57	412	0,62	375	0,56	375	370
Almanya	414	0,52	463	0,57	598	0,74	580	0,71	697	0,85	707	739
Yunanistan	11	0,10	10	0,09	10	0,09	31	0,29	20	0,19	20	20
Macaristan	13	0,13	24	0,24	39	0,39	37	0,38	25	0,25	25	36
İzlanda	4	1,25	1	0,31	4	1,23	0	0,00	0	0,00	0	6
İrlanda	11	0,24	8	0,17	15	0,33	19	0,41	13	0,28	13	14
İtalya	112	0,19	143	0,24	132	0,22	153	0,25	179	0,30	179	165
Letonya	6	0,29	5	0,25	3	0,15	8	0,40	6	0,30	6	3
Litvanya	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lüksemburg	8	0,27	6	0,20	7	0,24	5	0,17	10	0,35	10	9
Malta	2	0,38	2	0,37	5	0,91	0	0,00	2	0,35	5	5
Hollanda	1	0,24	1	0,24	1	0,24	4	0,93	1	0,23	1	0
Norveç	73	0,44	72	0,43	90	0,53	71	0,42	89	0,52	89	108
Polonya	30	0,60	21	0,42	29	0,57	18	0,35	19	0,36	19	16
Portekiz	54	0,14	58	0,15	87	0,23	70	0,18	101	0,27	101	116
Romanya	-	-	-	-	-	-	28	0,27	31	0,30	32	42
Slovakya	11	0,05	9	0,04	5	0,03	12	0,06	9	0,05	9	10
Slovenya	11	0,20	16	0,30	29	0,54	18	0,33	10	0,18	10	12
İspanya	7	0,34	16	0,78	18	0,87	13	0,63	15	0,73	15	13
İsveç	109	-	140	-	161	-	206	-	362	-	363	287
İngiltere	72	0,76	93	0,97	125	1,30	88	0,90	68	0,69	68	81
AB/AEA	1754	0,38	1905	0,40	2275	0,47	2224	0,44	2555	0,47	2570	2.520

N- sayı

O- oran

O.V – onaylanmış vakalar

R.V – rapor edilmiş vakalar

AB – Avrupa Birliği

AEA – Avrupa Ekonomik Alanı

Tablo 2.6: Gıda kaynaklı salgınlarla ilişkili 2017 yılı insan listeriyozu olguları (ECDC ve EFSA 2018).

ÜLKELER	ECDC				EFSA	
	İnsanlarda onaylanmış				Gıda kaynaklı salgınlar	
	Toplam	Seyahatle İlgili	Ülke içi kaynaklı	Bilinmeyen veya eksik	İnsan vakaları (hastalıklar)	Gıda kaynaklı salgınlar
Avusturalya	32	1	30	1	9 ^a	2
Belçika	73	1	72	0	-(**)	-
Bulgaristan	13	(-)*	-	13	-	-
Hırvatistan	8	0	1	7	-	-
Kıbrıs	0	0	0	0	-	-
Çek Cumhuriyeti	30	0	30	0	-	-
Danimarka	58	-	-	58	18	4
Estonya	4	0	4	0	-	-
Finlandiya	89	3	57	29	-	-
Fransa	370	0	370	0	-	-
Almanya	726	5	324	397	2	1
Yunanistan	20	3	14	3	-	-
Macaristan	36	0	36	0	-	-
İrlanda	14	1	9	4	2	1
İtalya	164	-	-	164	5	1
Letonya	3	0	3	0	-	-
Lüksemburg	9	0	9	0	-	-
Malta	5	0	0	5	-	-
Hollanda	0	-	-	-	-	-
Norveç	108	5	100	3	-	-
Polonya	116	0	116	0	-	-
Portekiz	42	1	37	4	-	-
Romanya	10	-	-	10	-	-
Slovakya	12	0	12	0	-	-
Slovenya	13	0	2	11	-	-
İspanya	284	0	218	66	-	-
İsveç	81	3	77	1	3	1
İngiltere	160	10	101	49	-	-
EU Total	2480	33	1,622	812	39	10
İzlanda	6	1	2	3	-	-
Norveç	16	2	12	2	-	-
İsviçre	45	-	-	45	2	1

N: Sayı

(*): Veriler rapor edilmemiştir

^a: Dokuz vakadan 7'si Austurya'da 2015-2016 yıllarında meydana gelmiştir, ancak gıda kaynaklı olması 2017 yılında belli olmuştur ve 2017 vakaları sırasına ilave edilmiştir.

(*): Önemli vaka rapor edilmemiştir.

(**): Hiçbir gıda kaynaklı insan listeriyozu salgını bildirilmemiştir

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) ve Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) her yıl Avrupa'daki Listeriyoz vakalarına dair rapor vermektedir. EFSA ve ECDC' nin 2018 yılı için yaptığı yayında 2013-2017 yıllarında görülen Listeriyoz vakalarının her yıl arttığı bildirilmiştir. 2013 yılında invazif *L. monocytogenes* enfeksiyon vaka sayısı 1883 iken, 2017 yılında bu rakam 2480'e ulaşmıştır. Hastalığın bulaşmasında seyahat esnasında düşen bağışıklık sistemi etkili de olsa yerel halkta görülen listeriozis vakalarının enfeksiyon raporlarında (Tablo 2.5) yüksek bir yüzdeye sahip olduğu (% 65.40) görülmektedir (ECDC/EFSA, 2018 ve 2019).

ECDC' nin yayınladığı raporlara göre (Tablo 2.5) 2016 yılında AB ve AEA da listeriyo vakalarında hastaların % 97.7' si hastaneye kaldırılmış ve 247 vaka ölümle sonuçlanmıştır. Hastaların çoğunun erkekler olduğu ve ortalama 64 yaş ve üzeri oldukları bildirilmiştir. 2017 yılında yaş aralığının 84' e kadar çıktığı bildirilmiştir. Kadınlarda son yıllarda 75 yaş ve üzeri bireylerde Listeriyoz vakalarının artmakta olduğu ve özellikle 25-44 yaşlar arasında (hamileliğe bağlı olarak) daha sık vakalar rastlandığı rapor edilmiştir. Yaşlı bireylerde, sağlık problemlerinin artması ile orantılı olarak septisemi ve meningoensefalit ile seyreden Listeriyoz'a sebep olmaktadır (Ariza-Miguel ve diğ., 2015; ECDC, 2018).

Avrupa' da Listeriyoz vakalarının başlıca bulaşma sebeplerinden biri gıda tüketimi ile ilişkilidir. ECDC 2017 yılına ait raporunda (Tablo 2.6) gıda kaynaklı Listeriyoz vakalarının % 58.8' i et ve et ürünlerinden, % 22.7' si farklı çeşitlerde peynirlerden, % 5.36' sı meyve ve sebzelerden ve % 13' ü balık ve deniz ürünlerinin tüketiminden kaynaklı olduğu bildirilmiştir (ECDC, 2018).

2.5.4. Listeriyoz tedavisi

L. monocytogenes bakterisinden kaynaklı enfeksiyonlara karşı yapılan tedavi yöntemlerinde en yaygın kullanılan metod antibiyotik tedavisidir. Kullanılan çeşitli antibiyotikler tek başına veya kombinasyonlar halinde enfeksiyona karşı etki göstermektedir. Aminopenisilin grubu bir antibiyotik olan ampisilin tek başına veya gentamisin ile birlikte tercih edilen tedavi olmaya devam etmektedir. Aminopenisilin kullanımı klinik tedavilerde başarıyla, gentamisin ilavesi (kombinasyon tedavisi) iki antibiyotik arasında sinerjizm gösteren in vitro çalışmalara dayanmaktadır (Dickstein ve diğ., 2019). Hastaların bazılarında görülen alerji ve bakteriyle

ilişkili olmayan hastalıklarda ikinci dereceli antibiyotikler olarak trimetoprim/sülfametoksazol, vankomisin ve eritromisin kullanılmaktadır. Sefalosporinler *L. monocytogenes*' in sebep olduğu enfeksiyona karşı etkili değildirler (Temple ve Nahata, 2000).

2.6 GIDALARDA LISTERIA MONOCYTOGENES

L. monocytogenes, birçok gıdada (süt ve süt ürünlerinde, et ve et ürünlerinde, balık ve deniz ürünlerinde, meyve ve sebzelerde) tespit edilmiştir (Campagnollo ve diğ., 2018; Rios ve Dalgaard, 2018; Thamnopoulos ve diğ., 2018).

L. monocytogenes' in sebep olduğu hastalık vakaları birçok farklı kıtada (Asya, Avrupa, Amerika, Afrika ve Avustralya) rapor edilmiştir (Jackson ve diğ., 2012; Huang ve diğ., 2015; Vu ve diğ., 2018; Kozak ve diğ., 2018) ve bu vakaların büyük çoğunluğu gıda kaynaklı olmuştur (Orsi ve Wiedmann, 2016).

Avrupa ülkelerinde gıda kaynaklı listeriyoz vakaları her geçen yıl artış göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda 2017 yılında vakaların % 58.8' i et ve et ürünlerinin tüketiminden, % 22.7' si ise farklı sertlikte yapılan peynirlerin tüketiminden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Tablo 2.6).

L. monocytogenes, gıda işleme ortamlarına getirilen hammaddeler ile çalışan personel ve ekipmanların hareket halinde olmasıyla bulaşarak gıda işleme ekipmanlarında ve gıdalla temas eden yüzeylerde kolonileşebilen çevresel bir bakteridir. Bu bakteri yüzeylerde biyofilm oluşturarak, özellikle işleme aşamasında, çok çeşitli gıda maddelerini kirleterek yiyecek işleme ortamlarında uzun süre kalabilmektedir (ECDC, 2019).

Çalışılan ortamların hijyen açısından yeterli olmaması ve iyi temizlenmemesi de bakterinin gelişmesi açısından uygun koşulların sağlanmasına ve üretilen gıdaların bakterilerle kontamine olmasına sebep olmaktadır (Liu ve diğ., 2020).

Diğer bakteriyel gıda kaynaklı patojenlerin aksine, *L. monocytogenes*, sütte soğutma sıcaklıklarında büyüebilmekte ve olgunlaştırılmış peynirlerde enfeksiyöz seviyelere ulaşabilmektedir. *L. monocytogenes*'in süt ortamlarında hayatta kalması ve çoğalması, tesisin üretim, olgunlaşma ve depolama koşullarına bağlıdır (Melero ve diğ., 2019). *L.*

monocytogenes' in buzdolabı ve derin dondurucu sıcaklığında yaşayabilmesi bakterinin dondurmalarda da bulunma olasılığını arttırmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi 6/2/2009 tarihli ve 27133 sayılı Resmî Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe girmiş Türk Gıda Kodeksi – Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde *Salmonella* ve *E. coli* gibi *L. monocytogenes*’in de gıdaların en az 25 gramında bulunmaması gerektiği belirtilmekte ve sıfır tolerans politikası uygulanmaktadır.

Gıdaların çeşitlerine göre *L. monocytogenes* tayini için önerilen ve yaygın olarak kullanılan farklı standart metotlar (Tablo 2.7) vardır (Gasarov ve diğ., 2005).Yöntemler gıda türü, işlenme şeklisaklama koşulları ve tüketim şekli gibi koşullar göz önünde bulundurularak önerilmektedir.

Tablo 2.7: Standart metodlar ve kullanılan alanlar (Gasarov ve diğ., 2005)

Standart metod	Araştırılan örnekler
FDA BAM	Tüm gıdalar
ISO 11290	Tüm gıdalar
USDA	Et, yumurta, kümes hayvanları ve çevresel örnekler
AOAC/IDF 993.12	Süt ve süt ürünleri

2.6.1. Tavuk etinden hazırlanan dönerlerde *L. monocytogenes*

Türkiye’de yılda 420.000 ton kırmızı et tüketilmektedir ve tüketilen etin yaklaşık olarak 84.000 tonunun döner olduğu tahmin edilmektedir. Bu rakamlardan yola çıkarak her gün ortalama olarak 230 ton döner tüketildiği söylenebilir. Almanya’da ise günde 300 ton dönerin üretildiği ve 150.000 satış noktasında servis edildiği bilinmektedir (Cebirbay ve Aktaş, 2008).

Döner, Türkiye de dahil olmak üzere Almanya, Yunanistan, ABD, Kanada, Suudi Arabistan gibi birçok ülkede sıklıkla tüketilen gıdalar arasındadır. Türkiye’de Döner olarak adlandırılan bu yiyecek, diğer ülkelerde farklı şekilde (dona kebabs, döner kebabs, shawarma, sovliki, gyros, durno kebabs, donah vb) adlandırılmaktadır (Ayaz ve diğ., 1985, Todd ve diğ., 1986; Pexara ve diğ., 2006).

Döner kebabın tarihçesi 1867 yılına Bursa’nın Kayhan semtinde Mehmet oğlu İskender efendinin geliştirdiği tekniğe dayanmaktadır. Kuzu kebaptan herkesin eşit oranda dağılımıyla aynı lezzeti alması için, İskender efendi kuzu etini sinir ve kemiklerinden ayırmış, dikey şişe kat kat dizmiş ve mangalda döndürerek pişirmiştir (Acar, 1996; Anonim).

Döner tüketicilere yaprak, kıyma ve karışık halde sunulmaktadır. Dönerin hammaddesini kırmızı et (dana, koyu, keçi) veya kanatlı (tavuk, hindi) eti oluşturmaktadır. Kanatlı eti, dünyada hızlı nüfus artışı ve Türkiye' de son on yılda sığır yetiştiriciliği sorunları nedeniyle kırmızı et sıkıntısı için bir çözüm olarak öne çıkmaktadır (Elmalı ve diğ., 2015).

Tavuk etinden yapılan hem geleneksel, hem de son yıllarda gençlerin damak zevkine uygun hazır yiyecekler bulunmaktadır. Türkiye' de de tavuk etinden yapılan hazır yiyeceklerin çeşitleri her geçen gün artmaktadır. Bunlar arasında tavuk etinden hazırlanan dönerin yeri önemlidir. Kanatlı etinden yapılan dönerlerde etle beraber derisi de kullanılmaktadır. Yaprak halindeki kanatlı eti dönerinde sadece çiğ kanatlı eti, karışık kanatlı etinde % 60 oranında çiğ kanatlı eti ve % 40 kanatlı kıyması kullanılmaktadır. Çeşitli katkı maddeleri ve baharatlarla bekletilen etler dikey şişe takılarak pişirilmektedir (Turp ve Yıldırım, 2019).

Gençer ve Kaya, 2004 yılında Erzurum ilinde satılan tavuk etli dönerleri mikrobiyolojik açıdan incelediklerinde 32 örnekten 6'sının (% 18.75) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu tespit etmiştir. Yapılan çalışmalarda sadece döner değil diğer tavuk etli ürünlerin de bu bakteri ile sık sık kontamine olduğu belirlenmiştir. Mısır' da perakende satılan hazır pişmiş gıda örneklerinin (kırmızı et, kanatlı eti ve deniz ürünleri) incelenmesi sonucunda kanatlı etinden yapılan shawırma ve tavukların da *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (El-Shenawy ve diğ., 2011). Bir başka çalışmada Goh ve diğ. (2012) Malezya market ve hipermarketlerinde satışa sunulan çiğ tavuk eti (tavukgöğsü, bütün ve alt but kısımları) örneklerinde *L. monocytogenes* kontaminasyonunu teyit etmiştir.

Yapılan araştırmalar sonucunda kırmızı et ve kanatlı etinden hazırlanan dönerlerde birçok patojen bakteriye rastlanmıştır. Bostan ve arkadaşları (2011) İstanbul ilinin Avcılar ilçesinde satışa sunulan tavuk ve kırmızı etli döner örneklerinin mikrobiyolojik kalitesi ve mikroorganizmaların bu örnekler üzerinde yaşama yetenekleri üzerinde yapmış oldukları çalışma sonucunda her iki türden alınan numunelerde *Enterobacteriaceae*, *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerin zaman geçtikçe sayılarının arttığı ve 18.saatte sayının başlangıç seviyesinin çok daha üstünde olduğu tespit edilmiştir.

Öksüztepe ve Beyazgül 2014 yılında Elazığ ilinde yaptıkları araştırmalar sırasında döner örneklerinde *E. coli* sayının fazla olduğu tespit edilmiştir (Öksüztepe ve Beyazgül, 2014). Karakeçili ve arkadaşları tarafından (2017) tavuk etli dönerden kaynaklanan gıda salgını vakası rapor edilmiştir. Mikrobiyolojik incelemeler salgın sebebinin *Salmonella*

Typhimurium kaynaklı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar birçok farklı patojenin yaşamasına ve bulaşmasına imkan sağlayan döner etinin mikrobiyolojik açıdan sıklıkla kontrol edilmesinin önemli olduğunu kanıtlamaktadır.

Yapılan birçok araştırmada tavuk eti bazlı gıdaların mikrobiyolojik bozulmaların birden fazla sebebinin olduğu ileri sürülmüştür. En tutarlı sebeplerden biri döner pişerken ateşe yakın kısımların pişmesine rağmen iç kısımların yeterli ısı işlem görmemesidir. İç kısımlarda bakterilerin hayatta kalması ve kesim sırasında kullanılan bıçağın ve kesilen dış kısımların bakterilerle kontamine olmasına sebep olmaktadır.

Kafe ve restoranlarda, genel bir tabirle döner satış noktalarında tezgahların ve mekanların hijyen açısından yetersiz olması, bulaşan patojen bakterinin gelişmesine ve uzun bir süre hayatta kalmasına neden olmaktadır. Temizleme sırasında kullanılan malzemeler ve özellikle de bezler sürekli değiştirilmediği için bulaşma bir yerden diğer yerlere yayılmaktadır.

2.6.2. Tavuk etinden hazırlanan burgerlerde *L. monocytogenes*

Tavuk burgerler, "Fast Food" olarak adlandırılan hazır yiyeceklerin en meşurlarından ve çok tüketilenlerinden biridir. Piyasada farklı markaların sunduğu çok çeşitte tavuk burgerler satılmaktadır. Bunlar, ekmek, garnitür ve şnitzel, nugget veya yaprak halinde kesilmiş tavuk göğsü gibi çeşitli tavuk etinden hazırlanmaktadır.

Yapılan araştırmalar tavuk etli burgerlerde % 20 oranında kavrulmuş yağsız fıstık ununun kullanıldığı ve burgerlerde yağ ve protein oranını da arttırdığını göstermiştir. Aynı zamanda fıstık ununun birçok bakterinin burgerde barınmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Buyck ve Seideman, 1982).

Türkiye’de de çok sevilerek tüketilen bu hazır yiyeceklerin halk sağlığı için tehlike oluşturduğu da bir süre gündemde olmuştur. Prof. Dr. Halkmanın (2013) ders notlarında da 2010 yılında çiğ hamburgerlerde *L. monocytogenes*'e rastlandığı belirtilmiştir.

Burgerlerde *L. monocytogenes*, *E. coli*, *C. jejuni* gibi patojen bakterilerle kontamine olabildiği belirtilmiştir (Melero ve diğ., 2012). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda pişmiş burger köftelerinde bu bakterinin genelde tespit edilemediği görülmektedir. Kaynaklar incelendiğinde bunun temelde iki sebebi vardır. Bunlardan ilki burger köftelerinin hazırlanma süresinin kısaltılabilmesi için yüksek sıcaklıkta (140 °C’ ye kadar) pişirme işlemidir. Yapılan bir çalışmada *L. monocytogenes*’ in bu sıcaklığa 0-4 dk arasında dayanabildiği bildirilmiştir

(Wong ve diğ., 2011). Diğ er sebepten tavuk etinden hazırlanmış hamburgerlerde sodyum laktat, sodyum nitrat gibi ilavelerin antilisterial etkisinin olması hatta % 2.5 sodyum laktat eklenmesinin *L. monocytogenes* gelişimini tamamen engellemesidir (Halkman, 2013).



3. MALZEME VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında İstanbul ilinin farklı ilçelerinden tavuk etli dönerler ve burgerler alınarak incelenmiştir. Deney örnekleri farklı zamanlarda ve farklı noktalardan alınarak soğuk zincirde laboratuvar ortamına getirilmiş ve *L. monocytogenes* açısından ISO 11290-1 standart metodu uygulanarak incelenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Döner ve hamburger örneklerinin toplanma yerleri ve tarihleri.

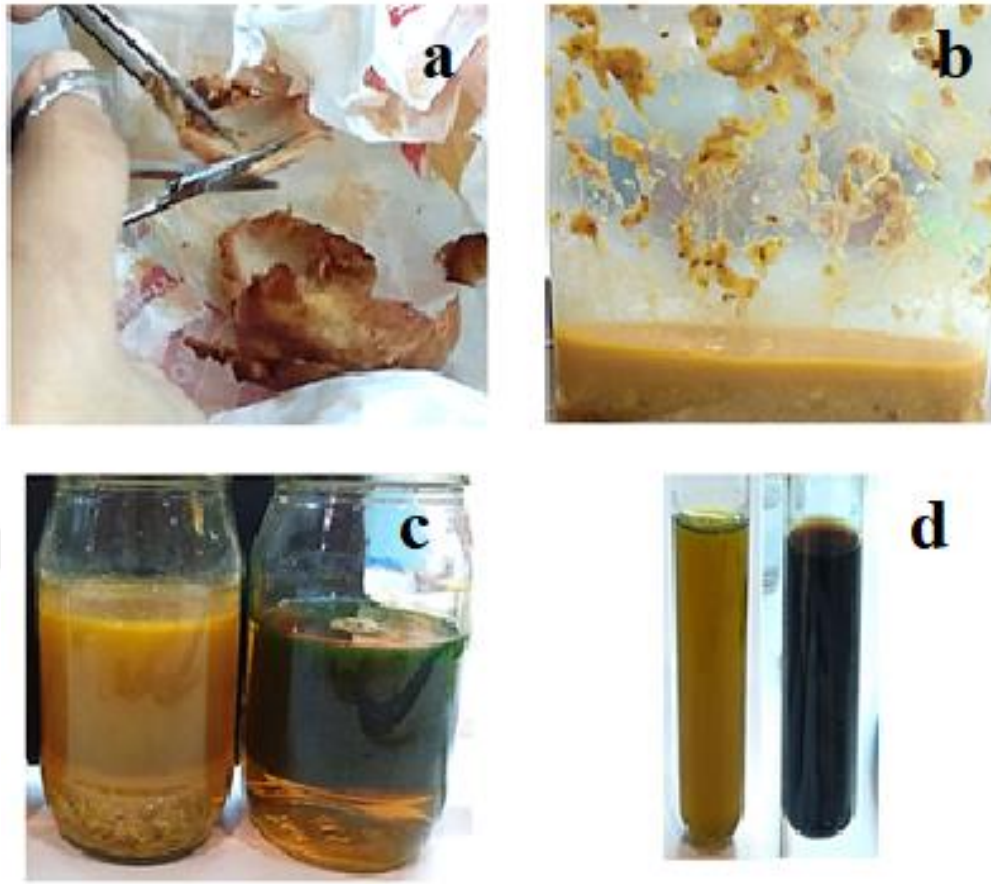
ÖRNEK ÇEŞİDİ	ALINDIĞI YER	ALINDIĞI TARİH	ÖRNEK No
DÖNER	Vezneciler	05.11.2018	1-5
	Çemberlitaş	03.12.2018	6-7
	Yenibosna	24.12.2018	8-12
	Kartal	07.01.2019	13-14
	Bakırköy	08.01.2019	15
	Şirinevler	14.01.2019	17-22
	Zeytinburnu	15.01.2019	23-27
	Eminönü	29.01.2019	29-31
	Cennet mahallesi	30.01.2019	34-35
	Balat	30.01.2019	28, 32-33
	Karagümrük	30.01.2019	36-39
	Avcılar	04.02.2019	40-42
	Soğanlı	04.02.2019	43-46
	Beşiktaş	06.05.2019	47-51
	Taksim	06.05.2019	52-56
HAMBURGER	Yenibosna	15.05.2019	56-60
	Beyazıt	16.05.2019	61-64
	Bakırköy	02.06.2019	65-68
	Şirinevler	08.06.2019	69-71
	Zeytinburnu	08.06.2019	72-74
	Eminönü	16.06.2019	75-78
	Avcılar	18.06.2019	79-81
	Mecidiyeköy	20.06.2019	82-86
	Beşiktaş	18.06.2019	87-90
	Taksim	22.06.2019	91-95
	Bahçelievler	18.07.2019	96-98
	Avcılar	22.09.2019	99-100

3.1 DENEYDE KULLANILAN SUŞLAR

Tez kapsamında yapılan deneylerde *L. monocytogenes* RSKK 475 (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu, Ankara), LMKVII, LMTT15, (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı, Bolu), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD), *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterileri kontrol olarak kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm bakteriler, tez çalışması öncesinde uygun besiyerlerinde üretilen taze kültürleri %20' lik gliserol çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra, -86 °C' de saklanmıştır.

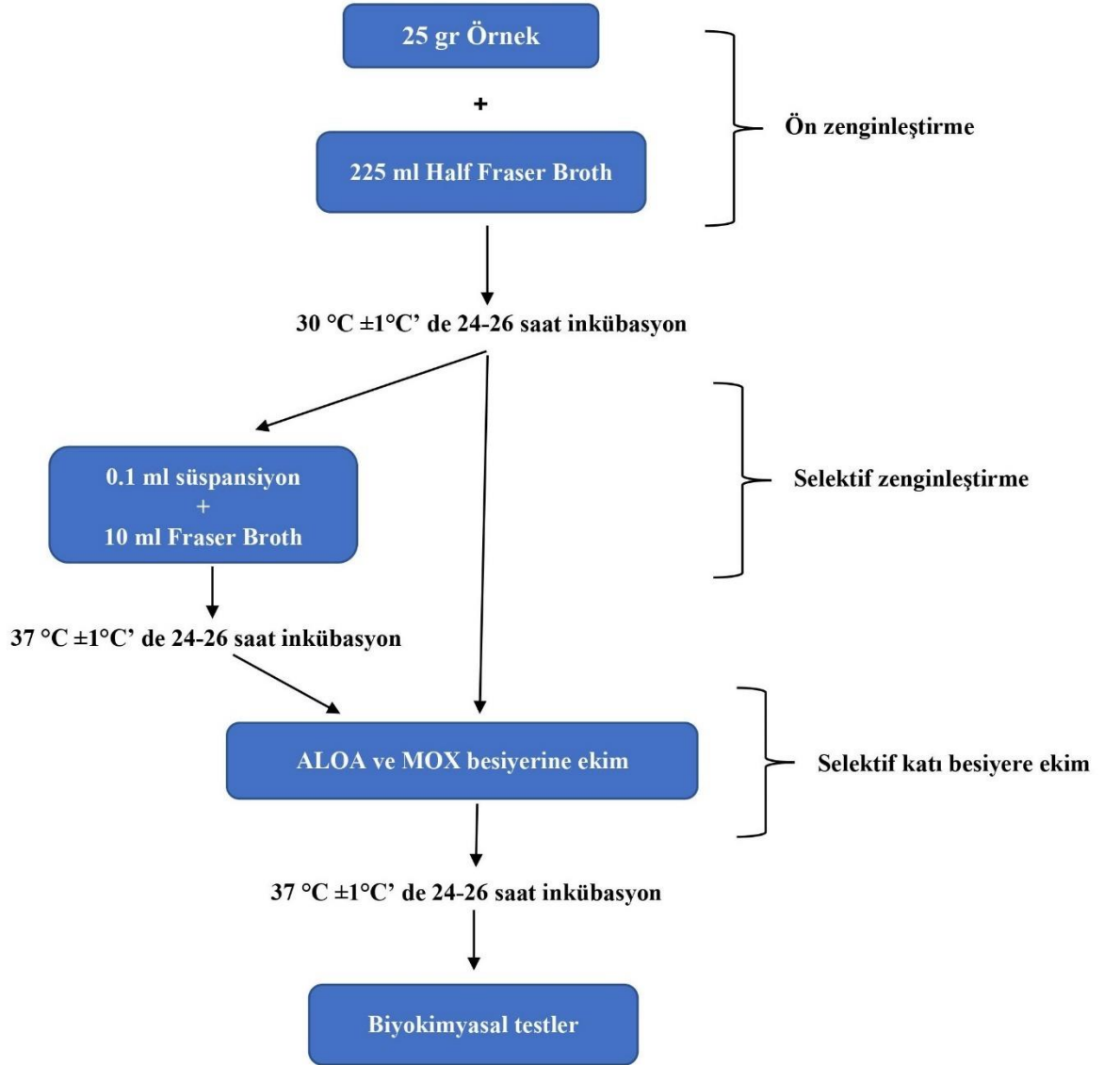
3.2 *LISTERIA MONOCYTOGENES*' İN DÖNER VE BURGERLERDEN ISO 11290-1 YÖNTEMİYLE İZOLASYONU

Tez deneyleri kapsamında, farklı zamanlarda toplanan örnekler soğuk zincirde 1.5-2 saat içinde laboratuvar ortamına getirilmiş ve incelenmiştir. İlk aşama olan ön zenginleştirme için 25 gram tavuk örneği (döner veya hamburger) aseptik olarak tartılmış ve 225 ml Half Fraser Broth içerisinde steril örnek torbalarına aktarılmıştır. 2 dakika pedallı homojenizatör (IUL Instruments, Masticator) ile parçalanmış örnekler 24 ± 2 saat 30 ± 1 °C' de inkübasyona tabi tutulmuş, besiyerinde siyahlaşma görülen örnekler bir sonraki aşamaya alınmıştır. Siyahlaşma görülen örnekten 100 µL alınarak 10 ml' lik Fraser Broth tüplerine aktarılmıştır. Aynı zamanda bu kültürlerden bir öze dolusu alınarak ALOA (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti) ve MOX (Modified Oxford Agar) besiyerleri üzerine azaltma yöntemiyle ekilmiştir. Fraser broth tüpleri 37 ± 1 °C' de 24 ± 2 saat çalkalamalı inkübatörde ve ALOA ile MOX besiyerleri 24 ± 2 saat 37 ± 1 °C' lik etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler etüvden çıkarılarak incelenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Döner örneklerinden *L. monocytogenes* ön ve seçici zenginleştirilmesi aşamaları [a: Tavuk etli döner örneğinin laboratuvar ortamında kesilerek parçalara ayrılması; b: Stomacher sonrası H. Fraser ilaveli örnek karışımı; c: solda, H. Fraser brothlu örnek karışımı, sağda, steril H. Fraser broth; d: solda, steril Fraser broth, sağda, 24 saat 37°C'de bekletilmiş Fraser broth karışımı].

İnkübasyon sonunda siyahlaşma görülen Fraser Broth tüplerinden bir öze dolusu alınarak ALOA ve MOX besiyerleri üzerine azaltma yöntemi ile ekilmiş ve bu besiyerleri 30 ± 1 °C 'de 24 ± 2 saat bekletilmiştir. ALOA besiyeri üzerinde gri renkte zon oluşturan, 1-2 mm çaplı mavi-yeşil koloniler, MOX besiyerinde ise siyahlaşma yapan 1-2 mm çaplı koloniler *L. monocytogenes* açısından şüpheli olarak kabul edilmiş ve TSA-YE (Triptik Soy Agar with Yeast Extract) besiyerine pasajları yapılarak saf kültürleri elde edilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen bu saf kültürler %20'lik gliserol çözeltisi içerisinde -86 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2: ISO 11290-1 metodu şeması.

3.3 İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* ŞÜPHELİ SUŞLARININ TANIMLANMASI

TSA-YE besiyerinde saflaştırılan kültürler *L. monocytogenes* şüpheli olarak tanımlanmış ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Şüpheli bakteri kolonilerine Gram boyama, katalaz, oksidaz, nitrat reduksiyonu, SIM (Sulfate, İndole, Motility) besiyerinde hareket özelliği, karbonhidrat fermentasyon yeteneği, MR (metil kırmızısı) testi, VP (Voges-Proskauer) testi, CAMP (Christie, Atkins and Munch-Peterseon) testi ve koyun kanlı agarda hemoliz özelliği açısından incelenmiştir (Arslan ve Baytur, 2018).

3.3.1. Gram boyama

Gram boyama testi için TSA-YE besiyeri üzerinde üreyen taze kültürler kullanılmıştır. Cam lamalar alkolde birkaç dakika bekletildikten sonra yüzeyi alevden geçirilmiş, daha sonra üzerine 1 damla FTS (Fizyolojik tuzlu su) konulmuştur. Steril bir öze yardımıyla taze kültürden bir miktar alınarak FTS ile homojenize olacak şekilde lam üzerinde yayma preparat hazırlanmıştır. Birkaç dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılan lamaların alt yüzeyi tespit işlemi için 3 defa alevden geçirdikten sonra boyama aşamasına geçilmiştir.

Hazırlanmış preparat üzerine birkaç damla Kristal Viole çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletilmiştir. Ardından preparat çeşme suyu yardımıyla yıkanmış ve fazla boya akıtılmıştır. Daha sonra Lugol çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletildikten sonra preparat çeşme suyu ile yeniden yıkanmıştır. Dekolorizasyon aşamasına geçildiğinde preparat üzerine %96' lık etil alkol ilave edilmiş ve 10-15 sn bekletildikten sonra çeşme suyuyla yıkanmıştır. Son olarak preparatı kaplayacak şekilde Sulu Fuksin çözeltisi damlatılmış ve 30 sn bekletilerek çeşme suyuyla yıkanmış ve kırmızı boyanın fazlası uzaklaştırılmıştır. Boyamanın ardından lamaların kuruması için bir süre oda sıcaklığında bekletilen preparatlar immersion yağı yardımıyla ışık mikroskobu kullanılarak 1000x büyütme ile incelenmiştir. Gram (+) kokobasil, kısa çomak mikroskopik görünümüne sahip sporsuz bakteriler *L. monocytogenes* şüpheli olarak değerlendirilmiş, oksidaz ve katalaz özellikleri açısından incelenmiştir (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.3.2. Katalaz testi

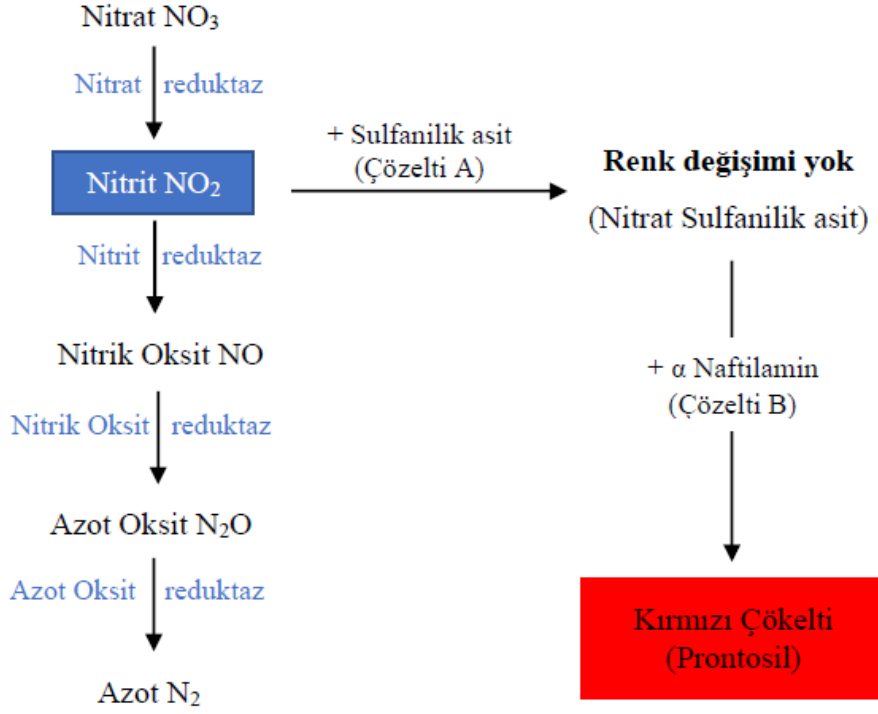
Gram reaksiyonları ve mikroskopik görüntüsü uygun olan izolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıkları % 3'lük H_2O_2 i (hidrojen peroksit) H_2O ve O_2 e parçalama yeteneğine bakılarak belirlenmiştir. Oksijen çıkışı kabarcıkların oluşmasına neden olmaktadır. Taze bakteri kültüründen bir miktar platin öze yardımıyla alınıp, cam lam üzerine konulmuştur. Ardından üzerine 1 damla % 3' lük H_2O_2 damlatılmış ve kabarcık oluşturan izolatlar pozitif, kabarcık oluşmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak *S. aureus* suşu kullanılmıştır (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.3.3. Oksidaz testi

Sitokrom C oksidaz enziminin varlığını araştırmak için oksidaz testi yapılmıştır. Oksidaz testi için taze % 1'lik Kovacs ayırıcı hazırlanmıştır. Platin öze yardımıyla TSA-YE agardan alınmış bakteri kültürü filtre kağıdı üzerine konulmuş ve üzerine 1-2 damla oksidaz ayırıcı damlatılıp 10-15 saniye beklenilmiştir. Mor renk oluşumu görülen kültürler pozitif, renk değişimi olmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir. *L. monocytogenes* bakterileri oksidaz testinde negatif sonuç vermektedir. Deneyde pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır (UMS, 2015).

3.3.4. Nitrat redüksiyon testi

L. monocytogenes açısından şüpheli kabul edilen bakterilerin nitratı indirgeme yetenekleri Nitrat redüksiyon testi ile incelenmiştir. Bazı bakteriler nitratı nitrite daha sonra amonyağa ve gaz nitrojene indirgemektedir. Taze *L. monocytogenes* şüpheli bakteri kültürleri öze yardımıyla Nitrat Broth bulunan tüplere aktarılmıştır. Ardından 35°C'de 2-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler ekimin ikinci ve beşinci gününde kontrol edilmiştir. Inkübasyon sonrası tüplere 0.2 ml A çözelti ve 0.2 ml B çözelti ilave edilmiştir. Çözeltiler ilave edildikten sonra pembe renk oluşumu nitratın nitrite indirgendiği ve test sonucunun pozitif olduğunu göstermektedir (Şekil 3.3 ve 4.3). Pembeleşme olmaması nitratın indirgenmediği veya nitrit oksit, amonyak ve nitrojene kadar indirgendiği anlamına gelmektedir. Bu tüplere çinko tozu ilave edilip 5 dk bekletilmiştir. Çinko tozu nitratı nitrite indirgeyerek kırmızı renk oluşumuna sebep olan bir maddedir. Bu sebeple çinko tozu eklendiğinde renk değişimi olması halinde nitrat redüksiyonu negatif olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte çinko tozu ilavesinden sonra renk değişiminin olmaması nitratın bakteri tarafından nitrojene kadar indirgendiği ve sonucun pozitif olduğu anlamına gelmektedir. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa*, negatif kontrol için *L. monocytogenes* RSKK 475 suşu kullanılmıştır.



Şekil 3.3: Nitrat redüksiyon testi.

3.3.5. Sulfide, Indole, Motility (SIM) Test

Tavuk etli örneklerden izole edilen *L. monocytogenes* şüpheli bakterilerin hareketliliğini tespit etmek için SIM agarlı tüplere iğne öze yardımıyla batırma ekim yapılmıştır. 24 saat 27 °C’ de inkübe edilen besiyerlerinde şemsiye şeklinde üreme (Şekil 4.5) oluşturanlar izolatlar şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 suşu , negatif kontrol olarak *E. coli* kullanılmıştır (Kaya, 2019).

3.3.6. Karbonhidrat fermentasyon testleri

Karbonhidrat fermentasyon testleri, ortamda bulunan bakterinin karbonhidratı kullanarak asit veya gazı kadar parçalamasının saptamaya dayanmaktadır. Bu parçalama sonucu besiyeri pH değeri nötrden asidiğe doğru değişir. Besiyerine katılan indikatör boyaların renk değişimi bu asitleşmenin kanıtıdır.

Tez kapsamında bakterilerin karbonhidratı fermente edip etmemesi bromkresol moru ile teyit edilmiştir. 1’ er ml % 5’lik steril karbonhidrat (mannitol, ramnoz, riboz, ksiloz ve α-metil-D-mannosit) çözeltileri 9 ml’lik karbonhidrat besiyerleri bulunan tüplere ilave edilmiştir.

Tüplere taze şüpheli bakteri kültüründen bir öze dolusu eklenmiş ve 35 °C' de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrasında tüplerde sarı renk değişiminin olması şüpheli bakterilerin karbonhidratları parçalayarak organik asitleri meydana getirdiğini göstermektedir. Tüplerin mor renkte kalması negatif, morumsu kalması nötr, sarı renk alması pozitif (Şekil 4.6) sonuç olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 suşu kullanılmıştır (Kaya, 2019).

3.3.7. Metil kırmızısı - MR testi

İzole edilen bakterilerin glikozu kullanarak organik asitler oluşturmasını tespit etmek için MR testi yapılmıştır. Bakterilerin karışık asit fermentasyonu yapması ortamın pH' sını değiştirmektedir. Metil kırmızısı testi için glikoz içeren besiyerinde oluşan kültürler üzerine metil kırmızısı ayıracı eklenir. Ayıraç, ortam pH' sı 4.4'ün üzerinde olduğu zaman sarı, pH 4.4' den aşağı olursa kırmızı renk almaktadır.

Tez çalışmamızda *L. monocytogenes* şüpheli bakteri kolonilerinden öze yardımıyla alınarak Clark Lups besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C' de 2 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonrası üreyen bakterilerin asit oluşturmasını teyit etmek için 3-4 damla MR ayıracı damlatılmıştır. Kırmızı renk oluşumu MR pozitif (Şekil 4.4), sarı rengin oluşumu MR negatif olarak değerlendirilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak *E. coli*, negatif kontrol olarak *K. pneumoniae* kullanılmıştır (Kaya, 2019).

3.3.8. Voges Proskauer-VP testi

Şüpheli bakterilerin glikozu fermente ederek, nötral bir ürün olan asetil metil karbinolü meydana getirme yeteneğini tayininde kullanılır. Şüpheli bakteri kolonisinden bir miktar alınara Clark Lups besiyeri bulunan tüplere ekim yapılmıştır. 37 °C' de 2 gün inkube edilen kültür tüplerine VP ayıracı olarak 0.2 ml KOH ve 0.6 ml α -naftol çözeltileri damlatılmıştır. 10-15 dk bekledikten sonra renk değişimine göre değerlendirme yapılmıştır. Test sonucunda tüplerde pembe renk oluşumu pozitif (Şekil 4.4), sarı veya kahverengimsi renk oluşumu negatif olarak değerlendirilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* negatif kontrol olarak *E. coli* kullanılmıştır (Kaya, 2019).

3.3.9. Christie, Atkins and Munch - Peterson - CAMP testi

CAMP testi için % 5' lik koyun kanı karıştırılmış TSA besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri yüzeyine *S. aureus* bakterisi ince bir çizgi halinde ekilmiştir. *L. monocytogenes* şüpheli bakteri kültüründen de özeyle alınarak *S. aureus* çizgisine değmeyecek şekilde dik iki çizgi halinde ekilmiştir. 35 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda izolat ekim çizgisinin *S. aureus* ekim çizgisine bakan kısmında ok başı şeklindeki hemoliz görüntüsü (Şekil 4.7) oluşması durumunda CAMP reaksiyonu pozitif olarak kabul edilmiştir (Gasnov ve diğ., 2005). Kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 suşu kullanılmıştır (Kaya, 2019).

3.3.10. Hemoliz testi

Hemoliz testi için % 5' lik koyun kanı karıştırılmış TSA besiyeri kullanılmıştır. İğne öze yardımıyla izolatların taze kültürlerinden alınan bakteri kolonisi, agar üzerine batırma yöntemiyle ekilmiştir. Petri kutuları 37 °C' de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kültürler kontrol edilmiştir. Ekim alanı çevresinde şeffaf zon oluşturan bakteriler (Şekil 4.8) β-hemoliz yapmaktadır ve sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmektedir. Kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 suşu kullanılmıştır (Kaya, 2019).

3.4 *LISTERIA MONOCYTOGENES* AÇISINDAN ŞÜPHELİ DEĞERLENDİRİLEN SUŞLARIN ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

3.4.1. Kullanılan antibiyotikler

L. monocytogenes açısından şüpheli olarak değerlendirilen bakteriler Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle (Hudzicki, 2009) antibiyotiklere karşı dirençliliği açısından incelenmiştir. Antibiyogram testi sırasında kullanılan antibiyotik diskler Tablo 3.2'de listelenmiştir.

Tablo 3.2: Deneyde kullanılan antibiyotik diskleri.

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

3.4.2. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Tez çalışması kapsamında izole edilen suşların antibiyotik direnç profillerinin tespit edilmesi için TSA-YE besiyeri üzerinde üretilen taze bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürler steril fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland No 0.5 bulanıklığına göre sulandırılarak kullanılmıştır.

3.4.3. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi

Tez kapsamında izole edilen ve biyokimyasal özellikleri bakımından *L. monocytogenes* profiline sahip suşların taze kültürlerinden hazırlanan süspansiyonlar Mueller Hinton besiyeri üzerine 100 µL/Petri olacak şekilde yayılmıştır (Hudzicki, 2009). Petri kutuları 10-15 dk oda ısısında bekletildikten sonra antibiyotik diskler ince uçlu steril pensle besiyeri üzerine eşit uzaklıkta belirlenen noktalara konulmuş ve 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Elde edilen değerler Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) tarafından belirlenen sınırlara göre incelenmiş ve izolatların direnç profilleri tespit edilmiştir (Tablo 4.9).

3.5 İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER TESTLERLE TESPİTİ VE KARAKTERİZASYONU

3.5.1. DNA izolasyonu

Tavuk etli döner ve hamburgerlerden geleneksel kültür yöntemlerle izole edilen *L. monocytogenes* şüpheli bakterilerinin DNA izolasyonunda GeneALL® Exgene™ Blood/Clinic/Cell SV mini kiti kullanılmıştır. İzole edilen şüpheli bakteriler TSA-YE besiyerlerine ekilmiş, 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra şüpheli suşlardan McFarland No. 1 bulanık tüpüne göre ($\sim 3 \times 10^9$ hücre) bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Mikrotüpler 2 dk 14.000 rpm' de santrifüj edilmiş, üst sıvısı atılmıştır. Mikrotüplerde yer alan pelete 180 µl lizozim solüsyonu ilave edilmiş ve vorteksleyerek çözülmesi sağlanmıştır. Bu işlemin ardından mikrotüpler kuru blok ısıtıcısının yardımıyla 37 °C' de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası mikrotüplere 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ve 200 µl BL yıkama tamponu ilave edilerek vortekslenmiştir. İşlemin ardından 56 °C' de 30 dk bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda tüplere 200 µl saf etanol ilave edilerek mikropipet yardımıyla pipetaj yapılmış ve kit setinde olan 2ml' lik toplama kolonlu tüplere aktarılmıştır. 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra alt toplama tüpü atılmış, yeni toplama tüpü takılmıştır. Yıkamış peletin üzerine 600 µl BW yıkama tamponu ilave edilen tüpler 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılarak yenisi takılmıştır.

Kolon içerisine 700 µl TW yıkama tamponu ilave edilmiş ve 14.000 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamada kolonlar steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Kolon içerisine toplanan DNA' ları geri kazanmak amacıyla 100 µl AE tamponu ilave ederek oda sıcaklığında 15 dk beklenilmiştir. Ardından 14.000 rpm' de 2 dk santrifüj edilerek *L. monocytogenes* şüpheli bakterilerin DNA' ları izole edilmiştir.

İzolasyon sonrası DNA miktarları ve saflık dereceleri (230/260 nm absorbans oranları ile) spektrofotometrik olarak (Thermo-scientific, Multiskan Go) değerlendirilmiş ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için hazır hale gelmiştir. İzole edilen DNA' lar PZR yapılarına kadar -20 °C' de tutulmuştur.

3.5.2. İzole edilen DNA' ların Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi

İzolasyon sonrasında Multiskan GO (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak DNA' ların saflık oranları ölçülmüştür. Saf olarak tespit edilmiş DNA ların agaroz jelde elektroforezi 1x TBE (Tris borate EDTA) solüsyonu kullanılarak % 0.8' lik agaroz jel hazırlanmıştır. Sıcaklığı 45 °C'ye inmiş jele %1 oranında GelRed (Biotium) floresan boya eklenmiş ve taraklı jel kalıbına aktarılmıştır. Agaroz jel donduktan sonra kalıba takılan taraklar çıkarılmış ve jel üzeri geçene kadar 1xTBE buffer ilave edilmiş ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelde ilk kuyucuğa 1 kb DNA Ladder (Bioline), diğer kuyucuklara 5 µl DNA, 1 µl 6x jel yükleme boyası (Biomatik) karışımı yüklenmiştir. Ardından 90 volt'da 30 dakika yürütülmüş ve elde edilen bantlar UV görüntüleme sistemi (UVITEC Cambridge, İngiltere) ile görüntülenmiştir.

3.5.3. Şüpheli suşların PZR ile doğrulanması

Tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz *L. monocytogenes* şüpheli suşların kromozomal DNA' larında *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin varlığı PZR yöntemi ile incelenmiştir. *Listeria* spp. doğrulanması için *iap*, *L. monocytogenes* doğrulanması için *hlyA* gen bölgesi incelenmiştir. Deney sırasında pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla standart RSKK 475 bakteri DNA'sı ve steril su kullanılmıştır. Deneyde kullanılan primerler Tablo 3.3' de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: PZR yönteminde kullanılan primerler.

Primer adı	Primer dizisi (5' → 3')	Ürün uzunluğu (bp)	Referans
<i>iap</i>	IAP₁: ACA AGC TGC ACC TGT TGC AG	131	Kohler ve diğ., 1990; Jallewar ve diğ., 2007
	IAP₂: TGA CAG CGT GTG TAG TAG CA		
<i>hlyA</i>	PCRGO: GAA TGT AAA CTT CGG CGC AAT CAG	388	Bohnert ve diğ., 1992
	PCRDO: GCC GTC GAT GAT TTG AAC TTC ATC		

PZR karışımı Bioline markasına ait MyTaq™ Mix'te önerildiği şekilde hazırlanmıştır (Tablo 3.4). Bu karışım 200 µm hacimli mikrotüplere 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan tüpler T100 model (Bio-Rad, ABD) PZR cihazında Tablo 3.5' de belirtilen koşullarda çalışılmıştır.

Tablo 3.4: PZR karışımı.

PZR karışımı	25 µl
<i>MyTaq</i> Reaction Buffer	5
<i>MyTaq</i> DNA polimeraz	0.25
Primer (reverse ve forward) (10 µM)	
<i>iap</i>	1
<i>hlyA</i>	1
Kalıp DNA (10 ng/mol)	1
Ultra saf su (ddH ₂ O)	16.75

PZR sonunda elde edilen ürünlerin incelenmesi amacıyla jel elektroforezi uygulanmıştır. % 1.5' lik agaroz jele yüklenen örnekler 80 Volt'ta 1 saat yürütülmüştür. Bant uzunluklarını saptamak için 100 bp' lik DNA Ladder (Bioline, Singapur) kullanılmıştır. Elektroforez işlem sonucunda elde edilen PZR ürünleri, UV görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, İngiltere) incelenmiştir.

Tablo 3.5: *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin tespiti için uygulanan PZR koşulları.

Döngü	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	95 °C	1 dk
Denatürasyon	95°C	15 s
Bağlanma	62°C	15 s
Uzama	72°C	10 s
Son Uzama (1 döngü)	72°C	5 dk

3.5.4. *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirilmesi

Şüpheli suşlar *iap* ve *hlyA* gen bölgelerinin tespitinden sonra *L. monocytogenes* olarak kabul edilmiştir. *L. monocytogenes* serotiplendirilmesi için Multipleks PZR yöntemiyle *lmo 1118*, *lmo 0737*, *orf 2110*, *orf 2819* ve *prs* gen bölgelerinin varlığı teyit edilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: Multipleks PZRde kullanılan primerler.

Primer adı	Primer dizisi (5' → 3')	Primer boyu (bp)	Referans
<i>lmo 1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA	691	Doumith ve diğ., 2004
<i>lmo 0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	906	Doumith ve diğ., 2004
<i>orf 2110</i>	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	471	Doumith ve diğ., 2004
<i>orf 2819</i>	F: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTC	597	Doumith ve diğ., 2004
<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	Doumith ve diğ., 2004

F – forward, R – reverse

Multipleks PZR karışımı Tablo 3.7' de belirtildiği gibi hazırlanarak, 200 µL' lik mikrotüplere 24 µl olacak şekilde dağıtılmış ve kalıp DNA'lar eklenmiştir.

Tablo 3.7: Multipleks PZR karışımı.

Multipleks PZR karışımı	25 µl
<i>MyTaq</i> DNA polimeraz	0.25
<i>MyTaq</i> Reaction Buffer	5
Primer (reverse ve forward) (10 µM)	
<i>lmo 1118</i>	3
<i>lmo 0737</i>	2
<i>orf 2110</i>	2
<i>orf 2819</i>	2
<i>prs</i>	2
Kalıp DNA (10 ng/mol)	1
Ultra saf su	7.75

Hazırlanan multiplex PZR karışımı mikrotüpler T100 model (Bio-Rad) PZR cihazında Tablo 3.8' de belirtilen koşullarda çalışılmıştır.

Tablo 3.8: Multipleks PZR aşamaları.

Döngü	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu (1 döngü)	95 °C	1 dk
Denatürasyon	95°C	15 s
Bağlanma	62°C	15 s
Uzama	72°C	10 s
Son Uzama (1 döngü)	72°C	5 dk

Multiplex PZR sonrası elde edilen ürünler % 1.5 'lik agaroz jelde 80 Volt' ta 1 saat yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda elde edilen ürünler UV görüntüleme sistemi (Wisedoc, Güney Kore) yardımıyla görüntülenmiştir. Bant uzunlukları, 100 bç' lik DNA Ladder (Bioline, Singapur) kullanılarak incelenmiştir.

3.6 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.6.1. Besiyerler

3.6.1.1. *Listeria Fraser Broth Base*

Madde	Miktar (g/500 ml)
Proteaz pepton	5
Trypton	5
Sığır özütü	5
Maya özütü	5
NaCl	20
Na ₂ HPO ₄ anhidrit	9.5
KH ₂ PO ₄	1.35
Eskulin	1
LiCl	3
Akriflavin HCl	0.025
Nalidiksik asit	0.02

pH: 7.2±0.2

Ticari olarak satılan *Listeria Fraser Broth*' dan 27.4 g tartılmış ve 500 ml soğuk distille suda çözülmüştür. Cam tüplere 10' ar ml besiyeri dağıtıldıktan sonra 121 °C' de 1.2 Atm basınçlı otoklavda 20 dk steril edilmiştir. Soğutulan besiyerlerine Ferric Amonyum III Sitrata Supplement (Biolife, 4240056) eklenmiş ve 24 saat 30 °C'de sterilite kontrolü için bekletilmiştir.

3.6.1.2. *Fraser Broth Base*

Ticari olarak satılan *Fraser Broth Base* besiyerinden 28.7 g tartıldıktan sonra 225 ml soğuk distille suda çözülmüştür. 121 °C'de 1.2 atm'de 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. *Fraser Half Selective* supplement eklenerek 24 saat 30 °C'de sterilite kontrolüne bırakılmıştır.

Madde	Miktar (g/225 ml)
Proteaz pepton	5
Trypton	5
Sığır özütü	5
Maya özütü	5
NaCl	20
NA ₂ HPO ₄ anhidriti	12
KH ₂ PO ₄	1.35
Eskulin	1
LiCl	3

pH: 7.2±0.2

3.6.1.3. *Listeria Chromogenic Agar Base*

Madde	Miktar (g/500 ml)
Kazeinin enzimatik özeti	6
Bakteriyolojik agar	13.5
Glükoz	2
MgSO ₄	0.5
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2.5
C ₃ H ₅ NaO ₂	2
Maya özü	10
Enzimatik hayvansal dokuların özeti	18
LiCl	10
Magnezyum gliserofosfat	1
5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-glukopiranozid	0.05

pH: 7.2 ± 0.2

Ticari olarak satılan *Listeria Chromogenic Agar Base* hazır besiyerinden 35.28 g tartılmış ve 500 ml sıcak distile suda çözülmüştür. Şeffaflaşan karışım 121 °C' de 1.2 atm basınçlı otoklavda 20 dk steril edilmiştir. 45 °C' ye soğutulan besiyerine *Listeria Chromogenic Lipase C* supplement ve *Listeria Chromogenic Selective* supplement ilave edilerek Petri kutularına yaklaşık 15'er ml dağıtılmıştır. Besiyerleri 24 saat 30 °C' de sterilit kontrolüne bırakılmıştır.

3.6.1.4. *Listeria Oxford Agar Base*

Madde	Miktar (g/500 ml)
Columbia Agar	41
LiCl	15
Eskülin	1
Ferrik Amonyum III Sitrat	0.5

pH: 7.0 ± 0.1

Ticari olarak satılan *Listeria Oxford Agar Base* besiyerinden 28.7 g tartılmış, 500 ml sıcak distile suda çözülmüştür. 121 °C'de 1.2 atm basınç altında otoklavda 20 dk steril edilmiştir. *Listeria Oxford Antimicrobial Supplement* ilave edildikten sonra Petri kutularına yaklaşık 15'er ml dağıtılmıştır. Petriler 24 saat 30 °C'de sterilite kontrolüne bırakılmıştır.

3.6.1.5. *Tryptone Soya Yeast Extract Agar*

Madde	Miktar (g/1000 ml)
Kazeinin enzimatik özütü	17
Bakteriyolojik agar	15
Glükoz	2.5
Maya özütü	6
K ₂ HPO ₄	2.5
NaCl	5
Papaic soya fasulyesi özütü	3

pH: 7.3 ± 0.2

Ticari olarak satılan TSA-YE besiyerinden 46 g tartılarak 1000 ml sıcak distile suda iyice çözülmüştür. 121 °C'de 1.2 atm' de 20 dk otoklavda steril edilmiştir. 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri, Petri kutularına yaklaşık 15' er ml dağıtılmış ve 30 °C'de 24 saat sterilite kontrolüne bırakılmıştır.

3.6.1.6. *Nitrat Besiyeri*

0.2 g KNO₃ ve 5 g Baktopepton tartılmış ve güzerine erimesi için 1000 ml sıcak distile su eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra 10'ar ml olacak şekilde steril cam tüplere dağıtılmıştır. Besiyerleri 37 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır.

Madde	Miktar (g/1000 ml)
KNO ₃	0.2
Baktopepton	5

pH: 7.4 ± 0.2

3.6.1.7. *Sulfate Indole Motility (SIM) Besiyeri*

Madde	Miktar (g/1000 ml)
Kazein pepton	20
Et pepton	6.6
Amonium demir II sitrat	0.2
Sodyum tiyoSulfat	0.2
Agar	3

pH: 7.3 ± 0.2

Ticari olarak satılan SIM besiyerinden 30 g tartılarak 1000 ml sıcak distile su eklenerek iyice erimesi için karıştırılmıştır. Çözülmüş besiyer 10'ar ml olarak cam tüplere dağıtılmıştır. 121 °C'de 20 dakika 1.2 atm'de otoklavda steril edilmiştir. Besiyerler 25 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır.

3.6.1.8. *Peptonlu Su (Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri)*

Madde	Miktar (g/500 ml)
Proteaz pepton	5
NaCl	2.5
Sığır özü	0.5
Bromkrezol moru (% 25 etil alkol içerisinde)	5 ml

pH: 7.4 ± 0.2

Hazırlanan besiyeri üzerine 500 ml distile su eklenmiş ve iyice karıştırılarak eritilmiştir. Sonra 4'er ml olarak cam tüplere dağıtılmıştır. 121 °C'de 1.2 atm'de otoklavda 20 dk steril edilmiştir. Besiyerleri 37 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır. Bu besiyeri +4 °C'de 30 gün saklanabilmektedir.

3.6.1.9. *Clark-Lubs Besiyeri*

Hazırlanan besiyeri üzerine erimesi için 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra 5'er ml olarak cam tüplere dağıtılmıştır. Otoklavda 121 °C'de 1.2 atm'de 20 dk steril edilmiştir. Besiyerleri 37 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır.

Madde	Miktar (g/1000 ml)
Polipepton	7
Glükoz	5
K ₂ HPO ₄	5

pH: 6.9 ± 0.2

3.6.1.10. % 5' lik Koyun kanlı agar besiyeri

TSA-YE bölüm 3.6.1.5'de belirtildiği şekilde hazırlanıp steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri 45 °C' ye ulaşana kadar soğutulmuş ve sonrasında içerisine dikkatlice % 5 oranında koyun kanı ilave edilmiştir. Besiyeri köpürmesine izin verilmeyecek şekilde dikkatlice karıştırılmış ve Petri kutularına yaklaşık 10' ar ml olacak şekilde dağıtılmış ve sterilite kontrolü için oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

3.6.1.11. Muller Hinton Agar

Madde	Miktar (g/1000 ml)
Sığır infüzyon ekstarktı	2.0
Nişasta	1.5
Agar	17.5
Kazein hidrolizat	17.0

pH: 7.3±0.2

Ticari olarak satılan Muller Hinton Agar (MHA) besiyerinden 38 g tartıldıktan sonra üzerine 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice çözülmüştür. 121 °C'de 1.2atm'de basınçlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. İyice karıştırılıp steril Petri kutularına dökülen besiyerleri 30 °C'de 24 saat sterilite kontrolü için bekletilmiştir.

3.6.2. Supplementler

3.6.2.1. Ferric Amonium III Citrate Supplement

0.25 g Ferric Aminium III Sitrar Supplementinin bulunduğu şişesine aseptik koşullar altında 5 ml steril distille su ilave edilerek karıştırılmıştır. İyice çözüldükten sonra otoklavlanmış Listeria Fraser Broth (0.1 ml/10 ml) besiyerine ilave edilmiştir.

3.6.2.2. *Fraser Half Selective supplement*

Madde	Miktar (mg/3 ml)
Ferrik Amonyum III Sitrata	112.5
Akriflavin HCl	2.25
Nalidiksik asit	2.8125

Ticari olarak satılan Fraser Half Selective supplement şişesine 3 ml % 50' lik Etanol eklenerek iyice çözülene kadar karıştırılmıştır. Karışım 225 ml'lik Half Fraser Broth besiyerine ilave edilmiştir.

3.6.2.3. *Listeria Chromogenic Selective supplement*

Madde	Miktar (mg/6 ml)
Nalidiksik asit sodyum tuzu	10
Ceftazidime	10
Sikloheksimid	25
Polimiksin B Sülfat	38500 IU

Ticari olarak satılan Listeria Chromogenic Selective supplement şişesine 6 ml sıcak steril distille su ilave edilerek iyice çözülmüştür ve 500 ml ALOA besiyerine aseptik olarak ilave edilerek karıştırılmıştır.

3.6.2.4. *Listeria Chromogenic Lipase C supplement*

10 ml'lik Listeria Chromogenic Lipase C supplement 500 ml ALOA besiyerine ilave edilerek karıştırılmıştır.

3.6.2.5. *Listeria Oxford Antimicrobial supplement*

Madde	Miktar (mg/500 ml)
Sikloheksimid	200
Solistin sülfat	10
Sefotetan	1
Fosfomisin	5
Akriflavin	2.5

Ticari olarak satılan Listeria Oxford Antimicrobial supplement 5 ml % 50' lik etanol ile çözüldükten sonra 500 ml MOX besiyerine ilave edilmiştir.

3.6.3. Boyalar

Gram Boyama ayıraçları aşağıda listelenmiştir:

3.6.3.1. *Kristal Viyole Çözeltisi*

A Çözeltisi : 2 g Kristal viyole tartılarak 20 ml etil alkol' de (% 96'lık) iyice çözülmüştür.

B Çözeltisi : 0.8 g Amonyum oksalat tartılarak 80 ml distile suda iyice çözülmüştür.

A ve B çözeltileri karıştırılıp 24 saat bekletilmiştir. Kullanılmadan önce süzölmüştür.

3.6.3.2. *Lugol Çözeltisi*

Madde	Miktar g/300 ml
İyot	1
Potasyum İyodür	2

Beher içerisinde Potasyum iyodür ve İyot 20 ml distile su ilave edilerek eritilmiştir. Geri kalan distile su da eklenerek 300 ml 'e tamamlanmıştır. Süzölen çözelti koyu renkli şişeye konularak saklanmıştır.

3.6.3.3. *% 96'lık Etil Alkol*

4 ml distille su üzerine 96 ml saf etil alkol eklenerek iyice karıştırılarak elde edilmiştir.

3.6.3.4. *Sulu Fuksin Çözeltisi*

Bazik fuksin stoğu için A ve B hazırlanmış ve karıştırılmıştır.

A solüsyonu: 0.3 g Bazik fuksin (% 90) 10 ml etil alkolda (% 95) çözülmüştür.

B solüsyonu: 5 g Fenol 95 ml distile suyla karıştırılmıştır.

10 ml Bazik fuksin stoğu 100 ml distille suda iyice karıştırılmıştır. Çözünmüş karışım filtre kağıdından süzölmüştür.

3.6.4. Ayıraç ve Tamponlar

3.6.4.1. % 0.85' lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

8.5 gram NaCl 1000 ml distille suda çözülmüştür. Hazırlanan çözelti iyice karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 1.2 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. Ve genel amaçlar için kullanılmıştır.

3.6.4.2. Katalaz Testi Ayıracı

% 3'lük H₂O₂ karışımı distile su içerisine hazırlanmıştır.

3.6.4.3. Oksidaz Testi Ayıracı

0.1 g N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride tartılarak 10 ml distille suda çözülmüştür. Kullanıldığı süre boyunca ayıraç tüpü ışık almayacak şekilde alüminyum folyoya sarılarak saklanmıştır.

3.6.4.4. Nitrat Testi Ayıracı

A çözeltisi: Çeker ocakta 5 g α -naftilamin 1000 ml 5N, % 30'luk asetik asit eklenerek karıştırılmıştır.

B çözeltisi: Çeker icak içerisinde 8 g sülfanilik asit üzerine 1000 ml 5N, % 30'luk asetik asit eklenip karıştırılmıştır.

3.6.4.5. % 5'lik şeker solüsyonu

Ramnoz, ksiloz, mannitol, riboz, methyl α -D-mannopiranosit şekerlerinin her birinden 5'er g tartılmış ve 100 ml su içinde çözdürülmüştür. Solüsyonlar 0.45 μ m por çapındaki enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Daha sonra bu solüsyonların 1 ml alınarak, 9 ml peptonlu su içerisine eklenmiştir.

3.6.4.6. Metil Kırmızısı Ayıracı

Madde	Miktar
Metil kırmızısı	0.1 g
Saf etil alkol	300 ml
Distile su	200 ml

Metil kırmızısı üzerine önce etil alkol eklenip karıştırılmış daha sonra distile su eklenmiştir.

Hazırlanan çözelti serin ve kuru bir yerde saklanmıştır.

3.6.4.7. *Voges Proskauer Ayıracı*

Karışım 1: 5 g α -naftol üzerine 100 ml % 96'lık etil alkol eklenip iyice karıştırılmıştır.

Karışım 2: 40 g KOH üstüne 100 ml distile su eklenip iyice karıştırılmıştır.

Ardında karışım 1 ve 2 karıştırılmıştır.

3.6.4.8. *10 M NaOH*

10 g NaOH 25 ml distille suda karıştırılmıştır. Elde edilen karışım daha sonra 0.22 μ m por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

3.6.4.9. *1 M HCl*

8.4 g %37' lik HCl ile 100 ml distille suda karıştırılmıştır.

3.6.4.10. *10X TBE*

Madde	Miktar (mM)
Tris	89
Borik asit	89
EDTA (pH 8)	2
Bidistile su	1000

108 g Trisma base ve 55 g Borik asit tartılıp 800 ml bidistile su içinde çözüldükten sonra pH değeri 8.0' a ayarlanmıştır. Bu karışımın üzerine 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Son hacmi distile su ile 1000 ml' ye ayarlanan tampon çözelti vida kapaklı cam şişeye aktarılmış ve 121°C' de 1.2 atm' de 20 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.6.4.11. *1X TBE*

10x TBE stok solüsyonundan 100 ml alınarak 900 ml steril bidistile su bulunan vida kapaklı 1000 ml'lik cam şişeler içerisine steril şartlar altında konulmuş ve iyice karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan 1X TBE karışımı deneylerde kullanılmıştır.

3.6.4.12. *Agaroz Jel*

Deneylerde kullanılmak üzere 0.8, 1.2 ve 1.5 g agaroz tartılıp üzerine 100 ml 1xTBE eklenerek iyice şeffaflaşana kadar mikrodalgada eritildiğinde uygun olarak % 0.8, 1.2 ve

1.5'lik karışım hazırlanmıştır. Şeffaflaşan karışım 50 °C'ye kadar kabarcıklar oluşmadan karıştırılarak soğutulmuş ve içerisine 0.2 µl Gelred (Biotium marka) ilave edilmiştir. Ardından elektroforez kalıplarına dökülerek katılaşması beklenmiştir.



4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında Kasım 2018 – Eylül 2019 ayları arasında İstanbul ilinin farklı semtlerinden satışa sunulan pişmiş veya dondurulmuş tüketime hazır 100 adet tavuk etli döner ve burger örnekleri toplanmış ve *L. monocytogenes* açısından incelenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Tez kapsamında toplanan örnekler.

Semtler	Örnek No	İzol. Tarihi
Vezneciler	D1-5, D16	03.12.2018
Beyazıt	D6	03.12.2018
	B91-97	06.07.2019
Çemberlitaş	D7	03.12.2018
Yenibosna	D8-12	24.12.2018
	B78-80	06.07.2019
Kartal	D13-14	07.01.2019
Bakırköy	D15	07.01.2019
	B64-68	05.07.2019
İncirli	B69-74	06.07.2019
Bahçelievler	B75-77	06.07.2019
Şirinevler	D17-22	14.01.2019
Zeytinburnu	D23-27	15.01.2019
Balat	D28, D32-33	29.01.2019
Eminönü	D29-31	29.01.2019
Cennet Mahallesi	D34	30.01.2019
Fatih	D35-39	30.01.2019
Avcılar	D40-42	04.02.2019
	B89-100	10.10.2019
Soğanlı	D43-46	04.02.2019
Beşiktaş	D47-51	06.05.2019
Taksim	D52-56	06.05.2019
	B51-58	24.06.2019
Şişli	B59-63	02.07.2019
Mecidiyeköy	B81-88	06.07.2019

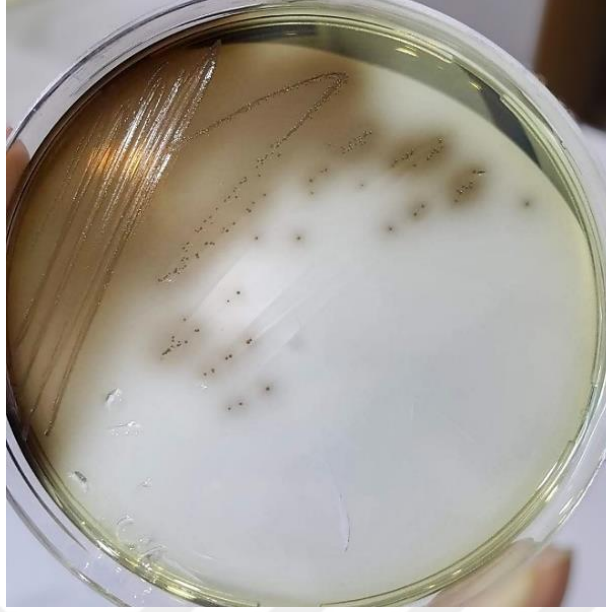
D ile başlayan kodlar döner; **B** ile başlayanlar burger örneklerine aitti.

4.1 *LISTERIA MONOCYTOGENES*' İN DÖNER VE BURGERLERDEN ISO 11290-1 YÖNTEMİYLE İZOLASYONU

Tez çalışmasında 100 adet tavuk etli döner ve burgerler 2017 yılında güncellenen ISO 11290-1 standart metodu uygulanarak incelenmiştir (Şekil 3.1). Ön ve selektif zenginleştirmede siyahlaşma görülen numunelerden ALOA ve MOX besiyerlerine ekim yapılmıştır. 24 saat 37 °C' de ALOA ve MOX besiyerli petrilere üreyen spesifik koloniler (Şekil 4.1 ve 4.2) TSA-YE besiyerli petrilere azaltma ekim yöntemi ile aktarılmıştır. Tez kapsamında 56 adet döner örneğinden 156 adet ve 50 adet burger örneğinden 17 adet şüpheli koloni seçilerek oksidaz ve katalaz testlerine tabi tutulmuştur. Döner örneklerinden elde edilen şüpheli kolonilerden 50, burger örneklerinden biri oksidaz negatif, katalaz pozitif sonuç vermiş ve TSA-YE besiyerine aktarılmıştır (Tablo Ek A). 24 saat 37 °C' de inkubasyonu tamamlandıktan sonra besiyeri üzerinde üreyen tek düşmüş şüpheli kolonilerin Gram, katalaz, oksidaz testleri yapılmıştır.



Şekil 4.1: ALOA besiyerinde üreyen *Listeria* cinsi bakteri kolonileri.



Şekil 4.2: MOX besiyerinde üreyen *Listeria* cinsi bakteri kolonileri.

Tez deneyleri kapsamında 56 döner örneğinin 29' undan 50 ve 44 burger örneğinden 1 olmakla toplamda 51 şüpheli bakteri izole edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: İzolatların izolasyon kaynakları ve suş kodları.

İzolat No	İzole edildiği selektif besiyeri	İzolasyon kaynağı	İzolat No	İzole edildiği selektif besiyeri	İzolasyon kaynağı
D004	H.FRASER-ALOA	Vezneciler 4. Dönerci	D033	H.FRASER-ALOA	Eminönü 2.dönerci
D005	H.FRASER-ALOA	Vezneciler 4. Dönerci	D034	FRASER-ALOA	Balat 2.dönerci
D008	FRASER-ALOA	Çemberlitaş 1.dönerci	D035	FRASER-ALOA	Zeytinburnu 3.dönerci
D010	FRASER-ALOA	Beyazıt 2.dönerci	D036	FRASER-ALOA	Zeytinburnu 3.dönerci
D011	H.FRASER-ALOA	Yenibosna 3.dönerci	D037	FRASER-MOX	Zeytinburnu 3.dönerci
D012	H.FRASER-ALOA	Yenibosna 2.dönerci	D038	FRASER-ALOA	Eminönü 2.dönerci
D013	H.FRASER-ALOA	Kartal 1.dönerci	D039	FRASER-MOX	Eminönü 2.dönerci
D014	H.FRASER-ALOA	Vezneciler 5.dönerci	D040	FRASER-MOX	Balat 1.dönerci
D015	FRASER BROTH	Kartal 1.dönerci	D041	FRASER-ALOA	Eminönü 3.dönerci
D016	FRASER-ALOA	Kartal 1.dönerci	D042	FRASER-ALOA	Eminönü 3.dönerci
D017	FRASER-ALOA	Kartal 2.dönerci	D043	FRASER-MOX	Eminönü 3.dönerci
D018	FRASER-ALOA	Kartal 2.dönerci	D044	FRASER-ALOA	Eminönü 2.dönerci
D019	H.FRASER-MOX	Şirinevler 4.dönerci	D045	FRASER-ALOA	Balat 1.dönerci
D020	FRASER-ALOA	Şirinevler 1.dönerci	D046	H.FRASER-ALOA	Avcılar 1.dönerci
D021	FRASER-MOX	Şirinevler 3.dönerci	D047	H.FRASER-ALOA	Avcılar 1.dönerci
D022	FRASER-ALOA	Şirinevler 5.dönerci	D048	H.FRASER-ALOA	Soğanlı 1.dönerci
D023	FRASER-ALOA	Şirinevler 5.dönerci	D049	FRASER-ALOA	Soğanlı 2.dönerci
D024	H.FRASER-ALOA	Zeytinburnu 1.dönerci	D050	H.FRASER-ALOA	Soğanlı 1.dönerci
D025	H.FRASER-ALOA	Zeytinburnu 1.dönerci	D051	H.FRASER-ALOA	Soğanlı 1.dönerci
D026	H.FRASER-MOX	Zeytinburnu 1.dönerci	D052	FRASER-MOX	Beşiktaş 1.dönerci
D027	H.FRASER-MOX	Zeytinburnu 4.dönerci	D053	H.FRASER-ALOA	Soğanlı 3.dönerci
D028	H.FRASER-MOX	Zeytinburnu 5.dönerci	D054	H.FRASER-ALOA	Beşiktaş 4.dönerci
D029	H.FRASER-ALOA	Şirinevler 4.dönerci	D055	H.FRASER-ALOA	Beşiktaş 4.dönerci
D030	H.FRASER-ALOA	Şirinevler 4.dönerci	D056	FRASER ALOA	Taksim 3.dönerci
D031	H.FRASER-ALOA	Karagümrük 2.dönerci	H057	FRASER-ALOA	Taksim 6.burgerci
D032	H.FRASER-MOX	Balat 1.dönerci			

4.2 İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* ŞÜPHELİ SUŞLARININ BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI

ISO 11290-1 yöntemiyle izole edilen 51 suş *Listeria* spp. açısından şüpheli olarak değerlendirilmiş ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. İzolatlar Metil kırmızısı, Voges-Proskauer, Nitrat redüksiyon ve Sim besiyerinde hareket, karbonhidrat fermentasyonu, % 5' lik Koyun kanlı agarda β hemoliz ve CAMP oluşturma özellikleri açısından incelenmiştir. Çalışma sonucunda izole edilen 51 suştan 4' ünün (D017, D039, D042 ve D044) *L. monocytogenes*' e ait biyokimyasal test profiline uyduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3 ve EK-A).

Tablo 4.3: *L. monocytogenes* açısından şüpheli suşların biyokimyasal test sonuçları.

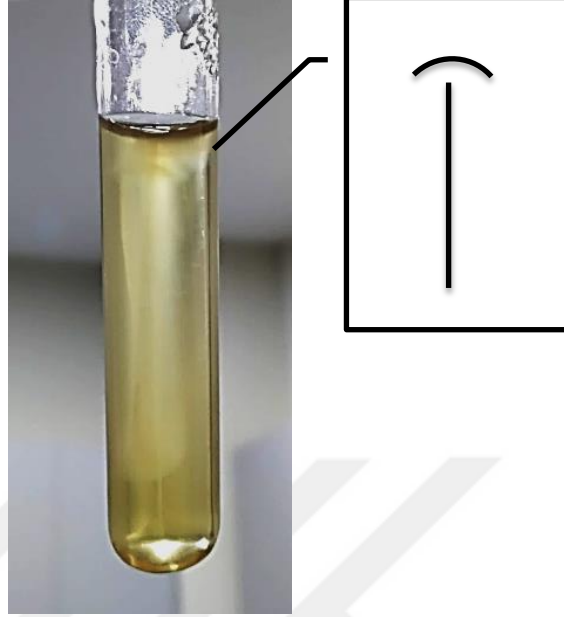
Bakteri No	Biyokimyasal testler										
	SIM	MR	VP	Nitrat redüksiyonu	Mannitol	α -metilD-mannosit	Ksiloz	Ramnoz	Riboz	CAMP	Hemoliz
D017	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
D039	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
D042	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
D044	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
RSKK 475	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+



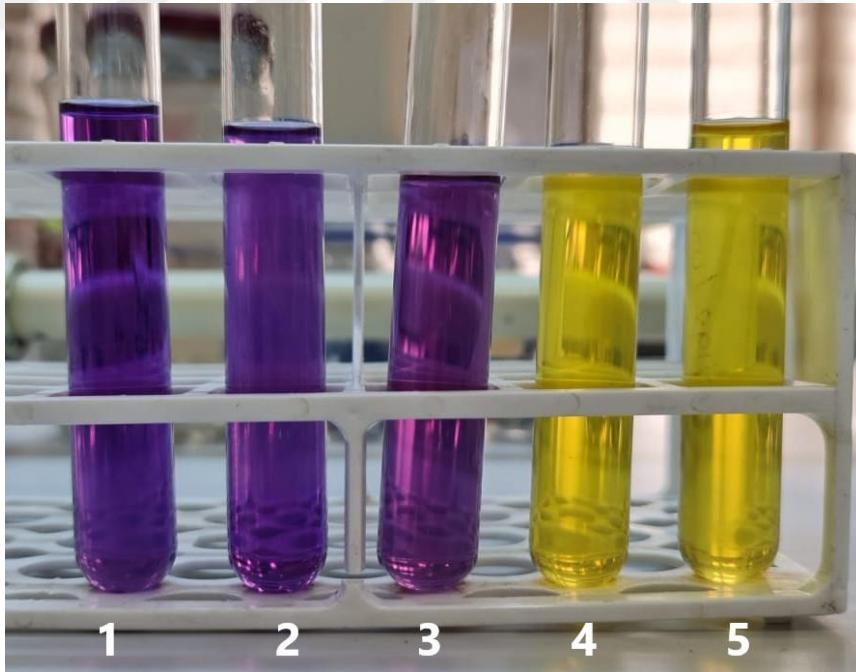
Şekil 4.3: *L. monocytogenes* izolatlarının Nitrat redüksiyon testi [solda: pozitif sonuç sağda: negatif sonuç].



Şekil 4.4: *L. monocytogenes* izolatlarının MR/VP testi [solda: MR/VP test pozitif, sağda: MR/VP test negatif].



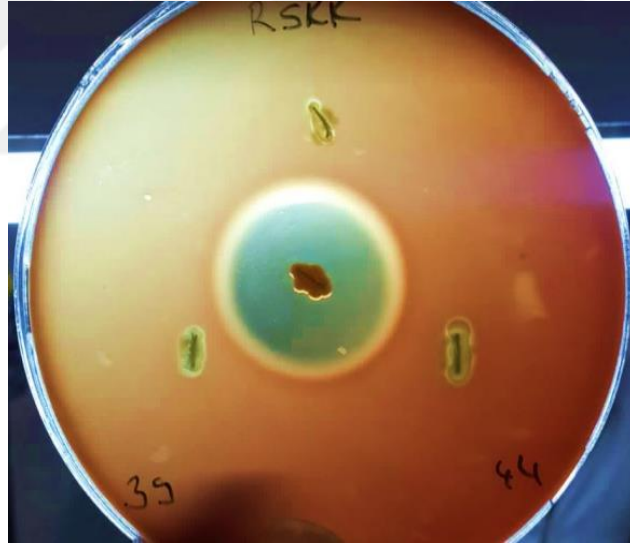
Şekil 4.5: SIM besiyerinde *L. monocytogenes* izolatlarının şemsiye şeklinde hareketi.



Şekil 4.6: *L. monocytogenes* izolatlarının şeker fermentasyon testi [1: Riboz; 2: Mannitol; 3: Ksiloz; 4: Ramnoz; 5: α -metil-D-mannosit].



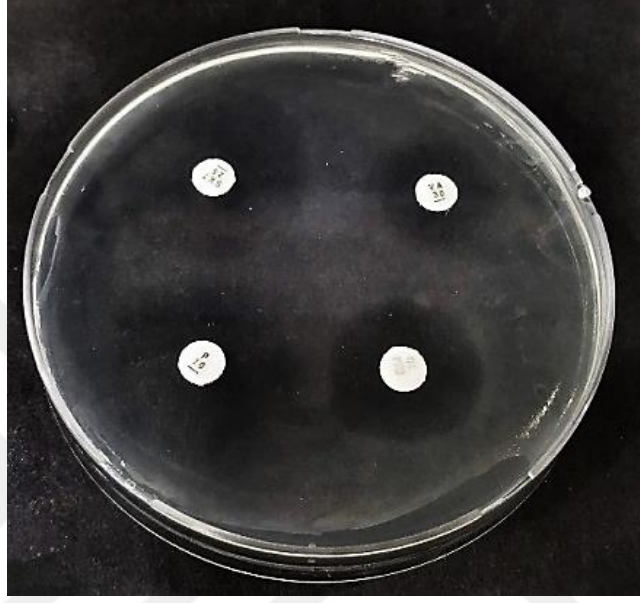
Şekil 4.7: *L. monocytogenes* izolatlarının CAMP testi.



Şekil 4.8: *L. monocytogenes* izolatlarının Hemoliz testi.

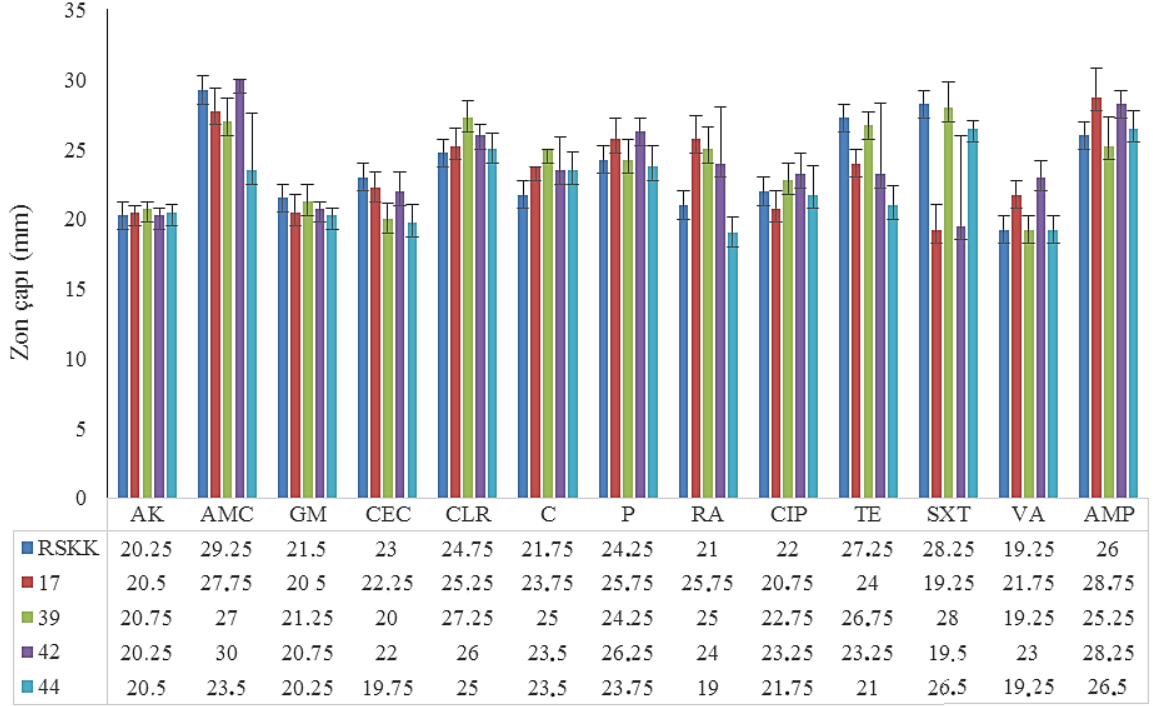
4.3 *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

L. monocytogenes olarak değerlendirilen izolatların antibiyotik direnç profilleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre incelenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı testi.

Oluşan zon çapları incelendiğinde (Şekil 4.10) D017 ve D042 izolatlarının standart *L. monocytogenes* suşuna (RSKK 475) kıyasla trimetprim-sulfametoksazol, D044 izolatının ise amoksisilin-klavulanik asit ve tetrasiklin antibiyotiğine karşı daha küçük zon oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.10: *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotiklerin zon çapları diagramı.

Test organizmalarının denenen antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç profilleri Tablo 4.4’te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde D017 suşunun siprofloksasin, D039 suşunun sefaklor, D044 suşunun sefaklor ve rifampin antibiyotiklerine karşı yarı duyarlı oldukları, diğer antibiyotiklere ise duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte D042 suşunun ise tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

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

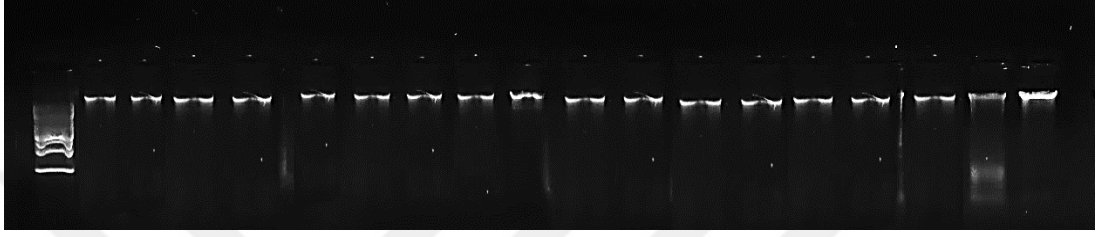
Bakteri No	Antibiyotikler												
	AN	AMC	GM	CEC	CLR	C	P	RA	CIP	TE	SXT	VA	AMP
RSKK 475	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
D017	D	D	D	D	D	D	D	D	YD	D	D	D	D
D039	D	D	D	YD	D	D	D	D	D	D	D	D	D
D042	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
D044	D	D	D	YD	D	D	D	YD	D	D	D	D	D

D-duyarlı, YD-yarı duyarlı

4.4 *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ

4.4.1. Elde edilen bakterilerden DNA izolasyonu

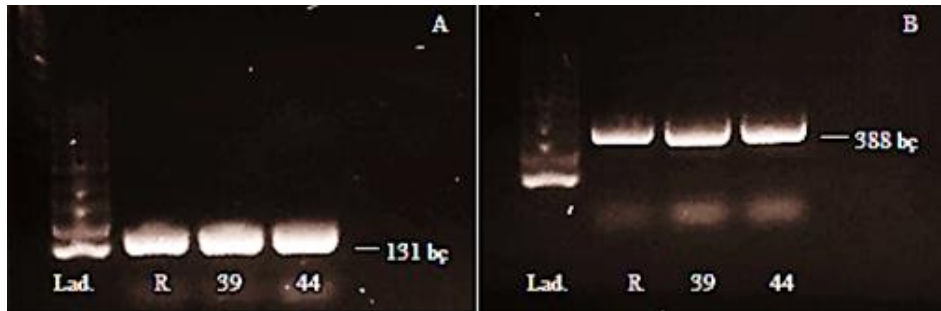
Tavuk etli dönerlerden izole edilen *Listeria* spp. şüpheli suşların DNA izolasyonu yapılmış ve bantlar Şekil 4.11' de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: Tavuk etli dönerlerden izole edilen suşlara ait DNA bantları.

4.4.2. *Listeria* spp. izolatlarının PZR Uygulaması ile Doğrulanması

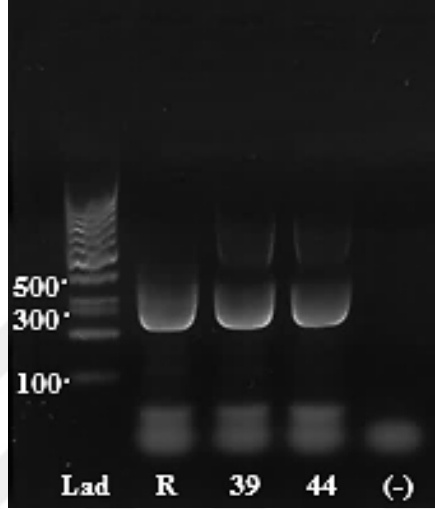
Elde edilen DNA'lar ile ilk olarak *iap* gen bölgelerinin incelenmesi için PZR yöntemi ile çalışılmıştır. Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı şekilde incelenen izolatlardan sadece ikisinin (D039 ve D044) 131 bç' lik *iap* genine sahip olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.12). *Listeria* spp. olarak doğrulanan izolatların *hlyA* gen bölgeleri Bölüm 3.5.2' de belirtildiği şekilde incelenmiş ve her iki izolatın (D039 ve D044) 388 bç'lik *hlyA* genine sahip *L. monocytogenes* olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: *iap* ve *hlyA* gen bölgelerine sahip bakterilere ait je elektroforezi görüntüleri [A:*iap* ve B:*hlyA* gen bölgeleri; Lad:100 bç ladder, R: RSK 475, 39 ve 44: izolat kodları]

4.4.3. *L. monocytogenes* izolatlarının multipleks PZR ile serotiplendirilmesi

iap ve *hlyA* gen bölgelerinin varlığıyla *L. monocytogenes* türüne ait olduğu doğrulanan her iki izolatın serotiplendirilmesi için multipleks PZR yapılmıştır. Bölüm 3.5.3'te belirtilen şekilde incelenen izolatların her ikisinin de *lmo 0737* (691 bç) ve *prs* (370 bç) genlerine sahip 1/2a serotipine ait olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: İzolatlarda multiplex PZR sonucu [Lad:100 bç ladder (nokta ile işaretli bantların bç cinsinden değerleri yanlarına yazılmıştır), R: RSK 475, 39 ve 44: izolat kodları]

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

L. monocytogenes yüksek tuz konsantrasyonu (% 10-12), geniş sıcaklık (-4 °C ila +45 °C) ve pH (4,0-9,6) aralığında yaşayabilme ve üreme özelliklerine sahip, patojen bir bakteridir (Ohshima ve diğ., 2019). Adaptasyon yeteneği sayesinde doğada farklı ortamlarda (örneğin nehirler, denizler, yağmur suları, kanalizasyon suları ve tarımsal atık suları gibi farklı su kaynaklarında, toprakta, bitkilerde ve silajlarda) yaşamını sürdürebilmektedir (Gönülalan, 2010; Valimaa ve diğ., 2015).

Doğada yaygın bir yaşam ortamına sahip bu bakteri buzdolabı sıcaklığında da üreyebilmekte ve birçok gıda grubunda (süt ve süt ürünlerinde, et ve et ürünlerinde, meyve ve sebzelerde, deniz ürünlerinde ve işlem görmüş hazır pişmiş ve dondurulmuş gıdalarda) bulunmaktadır (Shakuntala ve diğ., 2019). Türk Gıda Kodeksi' nin Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nin Resmî Gazete'de 6/2/2009 tarihli, 27133 sayılı yayınında ve Avrupa Birliği Komisyonu'nun (Commission Regulation [EC]) 1/1/2006 tarihli ve 2073/2005 sayılı Gıda Güvenlik tebliğinde gıda örneklerinin 25 gramında *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* gibi *L. monocytogenes* bakterisinin de sayısının sıfır olma zorunluluğu bildirilmiş ve bulunmaması için “sıfır tolerans” politikası uygulanmıştır.

Yapılan araştırmalarda *L. monocytogenes*'in hem çevre koşullarına karşı tolerans kabiliyeti hem de çok çeşitli yaşam ortamlarına sahip olması nedeniyle insanlara kolaylıkla bulaşabilen ciddi bir patojen olduğunu göstermektedir. Bakteri yenidoğanlarda, yaşlılarda, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ve hamile kadınlarda Listeriyoz olarak adlandırılan enfeksiyona sebep olmaktadır (Kurpas ve diğ., 2018). Hastalığa yakalanmış bireylerde menenjit, septisemi, endokardit, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları görülmekte ve hamilelerde erken doğuma, düşüğe, fetal (rahimde) ölüme, neonatal menenjit ve sepsis gibi ciddi olumsuz maternal, fetal ve neonatal etkilere neden olmaktadır (Barre ve diğ., 2016; Craig ve diğ., 2019). Dünyanın birçok yerinden bu zamana kadar rapor edilen Listeriyoz vakalarının büyük çoğunluğunun gıda kaynaklı olduğu da belgelenmiştir (CDC, 2018).

L. monocytogenes'in tespitinde geleneksel kültür yöntemlerine dayanan birden fazla (FDA/FSIS, USDA, ISO) metod kullanılmaktadır. Bu metodlar incelenen örneğe göre

değişiklik göstermektedir. Başka bir deyişle *L. monocytogenes* bakterisini incelenen gıda örneğine göre farklı metodlarla izole etmek mümkündür (Magalhaes ve diğ., 2014).

Tez çalışmamızda İstanbul ilinin farklı semtlerinden, özellikle gün içerisinde kalabalık nüfusların görüldüğü noktalarda bulunan kafe, restoran ve süpermarketlerden toplam 100 adet tavuk etli döner ve burger örneği toplanmış ve ISO 11290-1 metodu uygulanarak *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. Geleneksel kültür yöntemine dayanan metod üç aşamadan (ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve seçici katı besiyerine ekim) ibarettir. Her bir aşamada kullanılan besiyeri farklı içeriğe sahip olup, *L. monocytogenes* dışında üreyen bakterileri inhibe etmek içindir. Ön zenginleştirme ve selektif zenginleşme besiyerlerinde bulunan nalidiksit asit Gram negatif bakterilerin, akriflavin Gram pozitif bakterilerin, sikloheksimit saprofitik mantarların ve lityum klorür (LiCl) enterokokların büyümesini inhibe ederek *L. monocytogenes*'in besiyeri üzerinde tespitinin mümkün olmasını sağlamaktadır (Magalhaes ve diğ., 2014).

Listeria cinsi bakterilerin izolasyonunda ve *L. monocytogenes*'in tanımlanmasında seçici-ayrıt ettirici besiyeri olarak ALOA ve MOX kullanılmıştır. Bakterinin ALOA besiyerinde saptanması fosfatidilinositol fosfolipaz C ve β -glukosidaz enzimlerinin aktivitesine dayanmaktadır. Besiyerinde bulunan lesitin, *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* tarafından sentezlenen fosfolipaz enzimi ile hidrolize olması sonucunda koloni etrafında beyaz bir zon bölgesi oluşmaktadır. β -glukozidaz kromojenik substratı parçalayarak yeşil-mavi koloniler oluşmasına sebep olmaktadır (Magalhaes ve diğ., 2014).

L. monocytogenes izolasyonunda yaygın olarak kullanılan katı besiyerleri arasında PALCAM, MOX, ALOA ve Oxford agar görülmektedir (Şireli, 2002; Deniz ve Altun, 2017; Şanlıbaba, 2018; Arslan ve Baytur, 2018; Çufaoğlu, 2018; Kaya, 2019). Bu besiyerlerinin *Listeria* spp. üretme yetenekleri kıyaslandığında PALCAM besiyerinin MOX ve Oxford agar besiyerine nazaran daha başarılı olduğu görülmüştür (Capita ve diğ., 2001; Benetti ve diğ., 2012). Ancak *L. monocytogenes* izolasyonunda ALOA besiyerin ayırt ediciliğinin daha yüksek olduğu (mavi-yeşilimsi, zon oluşturan koloniler) ISO 11290-1 metodunun EK-A maddesinde belirtilmiştir. Başka bir deyişle bu bakterilerin geri kazanımında her ne kadar PALCAM agar daha başarılı görünse de refakatçi floranın elimine edilebilmesi açısından ALOA besiyeri daha iyi sonuç vermektedir. Bu nedenle tez çalışmamızda birincil seçici-ayrıt ettirici besiyeri olarak standart metotta önerilen ALOA besiyeri kullanılmıştır.

Tavuk etlerinde *L. monocytogenes* tespiti için kullanılan metotlardan bir diğeri USDA-FSIS standart yöntemidir. Standart metot kullanılarak sadece tavuk etlerinden değil aynı zamanda çevresel örneklerden izolasyon yapılabilmektedir. Bu metotta katı besiyeri olarak Modified Oxford Agar (MOX) önerilmektedir. Bu sebeple ISO 11290-1 standart metotta belirtildiği üzere ikinci seçici besiyeri olarak MOX kullanılmıştır (Capita ve diğ., 2001; USDA-FSIS standart metot, 2019).

Çalışmamızda *Listeria* spp. açısından şüpheli olarak değerlendirilen suşlar biyokimyasal ve moleküler testlerle doğrulanmıştır. Biyokimyasal testlerden SIM besiyerinde hareket, MR, VP, nitrat redüksiyon, şeker fermentasyonu (mannitol, α -metil-D-mannosit, ksiloz, ramnoz, riboz), % 5 koyun kanlı agarda CAMP ve hemoliz testleri yapılmıştır. Tavuk etli döner ve burgerden izole edilen suşların % 37.2' si SIM besiyerinde hareket testine, % 42.8' i MR testine, % 31.3'ü VP testine pozitif, % 13.6' sı nitrat redüksiyon testine negatif sonuç vermiştir. Şeker fermentasyon test sonuçlarıysa suşların fermentatif olduklarını, % 36.5' inin ramnoz ve α -metil-D-mannosit kullandığını göstermiştir. Biyokimyasal testlerde pozitif kontrol olarak standart RSKK 475 *L. monocytogenes* suşu kullanılmış ve tüm test sonuçları aynı olan 4 suş (% 7.8) *L. monocytogenes* olarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında kullandığımız standart metod birçok farklı çalışmada da tercih edilen bir yöntemdir. Gerek ülkemizde gerekse yurt dışında yürütülen bu tarz çalışmalar ile elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda izolasyon oranımızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir. Şanlıurfa'da yürütülen bir araştırmada ISO 11290-1 standart metodu kullanılarak yöresel peynirlerde *L. monocytogenes* varlığı incelenmiştir. Çalışma sonucunda sadece üç adet (% 3.09) peynir örneğinde *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Deniz ve Altun, 2017).

Şanlıbaba ve diğ., (2018) Ankara' da satılan tüketime hazır gıdaları *L. monocytogenes* kontaminasyonu açısından incelemiştir. Çalışmada ISO 11290-1 (2017) standart metodu uygulanmış ve 201 örnekten (pişmiş kırmızı et, tavuk eti, deniz ürünleri, sütlu tatlılar, çiğ marul, meyveli salatalar, süt ürünleri, yumurta ağırlıklı ürünler) toplam 41 *Listeria* spp. izolatu elde edilmiş ve bunlardan sadece 17' sinin (% 8.5) *L. monocytogenes* türüne ait olduğu saptanmıştır. Pişmiş tavuk etli örneklerden izole edilen *Listeria* spp. (% 23.7) suşlarının ise sadece % 10.5' inin *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir.

Bununla birlikte çalışma metodu kadar çalışılan örneğin çiğ veya pişmiş olması ve işlem görmüş paketli ürün özelliği taşıyıp taşımadığının kontaminasyon oranını etkileyen ana faktör olduğunun unutulmaması gerekir. Bu sebeple yapılan çalışmalar incelendiğinde tez çalışması kapsamında elde ettiğimizden daha yüksek bakteri sayılarına ulaşan sonuçlarla karşılaşmak mümkündür. Ankara' da yürütülen bir tez çalışmasında ISO 11290-1 standart metodu uygulanarak 180 adet hindi etinden yapılan kıyma *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiş ve örneklerin % 17.8' inden bu bakteri izole edilmiştir (Ayaz, 2008).

Altun ve Atasever, 2018 yılında yapmış oldukları araştırmada 60 adet tavuk eti örneğinde (derisiz tavuk göğsü, derisiz tavuk budu, derisiz tavuk kanat ve tavuk derisi) ISO 11290-1 standart metodu kullanılarak *L. monocytogenes* varlığı incelenmiştir. Çalışma sonucunda 22 örneğin *Listeria* spp. ile kontamine olduğu ve örneklerden 14'nün *L. monocytogenes*'e ait olduğu tespit edilmiştir.

Kayseri'de Çufaoğlu (2018) 'nun yürütmüş olduğu doktora tezi kapsamında ISO 11290-1 standart metodu uygulanarak 120 adet piliç boyun derisi örneklerinden 20 adetinde (% 16.7) kontaminasyona rastanılmış ve toplam 31 *L. monocytogenes* izolatu elde edilmiştir. İzolatların benzerlik matrislerinin incelenmesi sonucunda DNA profillerinin 7 farklı grupun [Grup 1 ve Grup 2 (1 izolat), Grup 3 (3 izolat), Grup 4 ve Grup 7 (9 izolat), Grup 5 ve Grup 6 (4 izolat)] olduğunu tespit etmiştir.

Arslan ve Baytur (2018) % 20 yağlı dana kıyma ve derili kemikli tavuk göğüs etini *L. monocytogenes* açısından incelenmiştir. Toplam 128 örnek incelenmiş ve dana kıyma eti örneklerinden 80 (% 62.5), tavuk eti örneklerinden 48 (% 37.5) adet *Listeria* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Tavuk etlerinden elde edilen *Listeria* cinsi bakterilerden yedisi (% 14.5), dana kıymalardan ise 26'sı (% 32.5) *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır.

ISO 11290-1 standardının farklı ülkelerde yürütülen çalışmalarda da sıklıkla tercih edildiği görülmektedir. Bakterinin sağlık açısından sahip olduğu yüksek risk faktörü ve sebep olduğu hastalıkların çeşitliliği nedeniyle dünya çapında sıklıkla çalışıldığı bilinmektedir.

Ürdün'de bu bakteri araştırmacıların ilgi odağı olmuş ve 2010 yılında başkent Amman'da yerli market ve mezbahalardan tavuk eti bazlı çiğ ve pişmiş yiyecekler (taze çiğ tavuk, shawirma, tavuk burger, tavuk sosis ve mortadella) olmak üzere 280 örnek toplanmış ve incelenmiştir. ISO 11290-1 standart metodu uygulanarak taze tavuklardan *L. ivanovii* (% 64), *L. monocytogenes* (% 20), *L. grayi* (% 10.6), *L. seeligeri* (% 5.3) ve *L. welshimeri* (% 1.3)

olmak üzere 75; işlem görmüş tavuk etli gıda örneklerinden *L. monocytogenes* (% 55.3), *L. ivanovii* (% 38.4), *L. grayi* (% 2), *L. seeligeri* (% 1.5) ve *L. welshimeri* (% 1.5) olmak üzere 65 *Listeria* spp. şüpheli izolatu elde edilmiştir. Elde edilen 51 *L. monocytogenes* şüpheli izolatu 15' i (% 29.4) çiğ tavuk etinden, 23'ü (% 45) tavuk burger'den, 9'u (% 17.6) tavuk sosisinden ve 4'ü (% 7.8) tavuk shawirma'dan elde edilmiştir. Moleküler testlerle *iap*, *hlyA* ve *actA* gen bölgelerinin incelenmesi sonucunda 17 izolatu (%33.3) *L. monocytogenes*'e ait olduğu kanıtlanmıştır (Osaili ve diğ., 2010).

Diğer bir çalışmada Kureljusic ve diğ. (2017) araştırmalarında ISO 11290-1 standart metodu uygulanarak *L. monocytogenes* açısından incelenmiş 15 adet kanatlı eti örneğinden sadece 3'ünde *L. monocytogenes* bakterisine rastlamışlardır.

ISO 11290-1 metodu dışında da birçok gıdada farklı yöntemlerle *L. monocytogenes* varlığı incelenmiştir. Gerek bu çalışmalar gerekse ISO 11290-1 standardı kullanan çalışmalar değerlendirildiğinde gıda örneğinin çeşidi, çiğ veya pişmiş olması, gördüğü işlemler ve saklama koşulları gibi birçok etmen bu gıdaların *L. monocytogenes* ile kontamine olmasını etkilemektedir.

Yapılan çalışmalarda sadece *L. monocytogenes* değil, diğer *Listeria* suşlarının da gıdalarda sıklıkla bulunduğu görülmektedir. Kaya (2019) İstanbul ilinde satılan beyaz peynirlerde *L. monocytogenes* varlığını araştırdığı çalışmada FDA-BAM yöntemiyle 119 adet beyaz peynir örneğinde klasik kültür yöntemiyle izole ettiği şüpheli suşlarının biyokimyasal testler sonucunda 19' unu *Listeria* spp. olarak tanımlamıştır. Araştırmacı moleküler testlerle doğrulaması yapılan izolatlardan sadece yedisinin *Listeria* spp. (% 36.8) olduğunu belirlenmiştir. Bununla birlikte sekans analizi ile bu suşların *L. seeligeri* olduğu belirlenmiştir.

Hatay ilinde yapılan bir çalışmada ise 50 adet tavuk döner örneği incelenmek üzere toplanmış ve örneklerin % 4 (2/48) oranında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Nur ve diğ., 2017).

Şireli ve diğ. (2002) Ankara ilinde satılan tavuk etli kıyma, köfte ve burgerlerin USDA-FSIS standart metodu uygulayarak *L. monocytogenes* ile kontamine olmaları açısından araştırmıştır. Çalışılan 100 adet örnekten tavuk burgerlerinin % 40' ında, tavuk köfte örneklerinin % 83.3' ünde ve tavuk kıymalarının % 85' inde *Listeria* cinsine ait türler izole edilmiştir.

Gençer ve Kaya (2004) Erzurum ilinde satılan pişmiş yaprak dönerler üzerinde araştırma yapmış ve incelenen 32 adet döner örneğinden sekizinde (% 25) *Listeria* spp. bulunmuştur.

İzolatlardan altısının (% 18.75) *L. monocytogenes*, yedisinin (% 21.88) *L. innocua*, birinin (% 3.13) *L. murrayi*, birinin (% 3.13) *L. welshimeri*'ye ait olduğu tespit edilmiştir.

Özmen ve Kılıç (2006) Gemlik Garnizonu' nda satılan tavuk etlerini *L. monocytogenes* bakterisinin varlığı açısından incelemiştir. Çalışma sonucunda tavuk karkaslarından % 76' sında (76/100) *Listeria* cinsi bakteri bulunmuştur. İzolatlardan % 56.6' sı *L. innocua*, % 31.6' sı *L. monocytogenes*, % 5.3' ü *L. murrayi*, % 3.9' u *L. grayi*, % 5.3' ü *L. murrayi* ve % 2.6' sı *L. welshimeri* türlerine aittir.

Elmalı ve diğ., (2015). Hatay ilinde bulunan marketlerinden 120 adet piliç kanat eti *Listeria* spp. varlığı açısından incelenmiştir. Araştırmacılar örneklerden izole edilen suşların 57'sinin *Listeria* spp. olduğunu bildirmiştir. *Listeria* spp. olarak değerlendirilen izolatlardan 54'ü *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir. Çalışma 4 mevsim boyunca devam etmiş ve en yüksek izolasyon oranının sonbaharda olduğu belirtmiştir. Yaz döneminde % 60 (9/15), güz döneminde % 73.3 (11/15), kış döneminde % 33.3 (5/15) ve ilk bahar döneminde % 13.3 (2/15) oranında *L. monocytogenes* izole etmek mümkün olmuştur.

Yıldırım ve diğ. (2015), Tokat' ta kasap, market ve bakkallarda satışa sunulan tavuk göğsü ve butlarından topladıkları 50 adet örneği *L. monocytogenes* açısından incelemiştir. Yapılan mikrobiyolojik incelemeler sonucunda göğüs eti örneklerinin üçünde (% 12) *L. monocytogenes*, altısında *L. murrayi*, 19'unda *L. welshimeri*; but örneklerinin dördünde (% 16) *L. monocytogenes*, 19'unda *L. welshimeri*, ikisinde *L. murrayi* türleri tespit edilmiştir. Örneklerinin % 12' sinde (6/50) *Listeria* spp. türüne rastlanmamıştır.

Bahsi geçen çalışmaların yanı sıra özellikle iki çalışma dikkati çekmektedir. Bu çalışmalarda İstanbul ilinde satışa sunulan dönerlerde *Listeria* cinsi bakterilerin tespit edilemediği görülmektedir. Kaya ve diğ. (2018) İstanbul ilinde bulunan restoranlardan 60 çiğ ve pişmiş döner örneği (15 tavuk etli, 15 kırmızı etli) toplayarak mikrobiyolojik açıdan incelemiştir. 30 adet pişmiş döner (tavuk etli ve kırmızı etli) örneğinin hiçbirinde *L. monocytogenes*'e rastlanmamıştır. İstanbul ilinde yapılan bir başka çalışmada satışa sunulan 30 adet döner örneği toplanarak mikrobiyolojik kalitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda *L. monocytogenes* bulunmamıştır (Bostan ve diğ., 2011). Belirtilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda tez çalışmamızın İstanbul'da satışa sunulan tavuk etli dönerlerde *L. monocytogenes* saptanan ilk çalışma olduğunu söyleyebiliriz.

Ülkemizde olduğu gibi diğer ülkelerde de gıdalarda *Listeria* cinsi bakterilerin incelenmesinde farklı metotların kullanıldığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlar bu bakterinin kullanılan yöntemler, gıda örneğinin türü ve çalışılan ülkeye bağlı olarak farklı oranlarda tespit edildiğini ortaya koymaktadır. Liu ve diğ. (2020) , 112 adet et ve et ürünleri (% 72' sini tavuk eti) üzerinde yürüttükleri çalışmaları sırasında çiğ ette % 8.5 oranında ve yenmeye hazır gıdalarda % 3.2 oranında *L. monocytogenes* bakterisi izole etmiştir. Bu sonuç işlenmiş gıdalarda bakterinin daha az görüldüğünü ortaya koymaktadır. Yürüttüğümüz tez çalışmasında özellikle burger etlerinin işlenmiş gıda olması sebebi ile bu bakteri açısından temiz olması da benzer bir sonuç oluşturmaktadır.

Malezya' da yapılan araştırma sonucunda tavuk etli burgerlerin hazırlanması sırasında tavuk parçalarının 140 °C' de ısıtılmış yağda pişirilirken, zaman geçtikçe (2-10 dk arasında) patojen bakterinin sayısının azaldığı, minimum pişme sıcaklığının 6 dk olduğu belirlenmiştir (Wong ve diğ., 2011).

2017 yılında Avrupa Birliği ülkelerinde satılan (işlem görmüş ve perakende) gıdalar *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. Toplanan örneklerin % 80'i et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, balık ve deniz ürünleri ile meyve ve sebzelerden oluşmuştur. En fazla numune et ve et ürünlerinden özellikle domuz, hindi, tavuk ve sığır eti (çoğunlukla Polonya, Bulgaristan ve Çek Cumhuriyeti), ardından balık ve deniz ürünlerinden (çoğunlukla Polonya ve Almanya'dan) ve süt ve süt ürünleri olarak da sert, yarım yumuşak ve yumuşak peynirlerden (Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Hollanda, ve Polonya) alınmıştır. İncelenmiş 673 tavuk eti örneklerinin % 1.6'sı; 252 hindi eti örneklerinin % 0.8'i; perakende satılan 3.700 domuz eti örneklerinin % 2.5'i; süt ve süt ürünleri örneklerinden 1.052 yarı yumuşak peynirlerden % 2.4 oranının *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (ECDC\EFSA; 2018).

Bu çalışmaların yanı sıra bakterinin varlığı temel olarak hijyen ve sanitasyon kurallarına bağlı olduğu için farklı sonuçlarla da karşılaşmak mümkündür. Örneğin Wong ve diğ. (2012) , Malezya' da dondurulmuş dana, tavuk ve balık köfteleri içeren toplam 112 adet örnek toplamış ve *L. monocytogenes*'in varlığı açısından incelemiştir. Dondurulmuş tavuk etli köftelerin % 33.3, dana köftelerinin % 22.9 ve balık etli köftelerin % 10.5 oranında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Indrawattana ve diğ. (2011) , Bankong’ da bulunan açık marketlerden ve süpermarketlerden 48’i tavuk eti olmak üzere toplam 104 adet et ve et ürünü toplamış ve *L. monocytogenes* bakterisinin varlığı açısından incelenmiştir. Araştırmacılar 61 örnekte (% 58.7) *Listeria* spp. tespit etmiştir. İzolatların 8’i tavuk eti örneklerinden izole edilmiştir ve toplam 22 adet suş *L. monocytogenes* olarak değerlendirilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise El-Shenawy ve diğ. (2011) Mısır’ da sokaklarda perakende satılan 576 adet hazır pişmiş gıda örneğini (kırmızı et, kanatlı eti ve deniz ürünleri) incelemiştir. Araştırma sonucunda kanatlı etinden yapılan shawirma ve tavukların % 8.7’ sinin (12/137) *Listeria* spp. ile kontamine olduğu ve bunlardan sadece yedisinin (% 58) *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir.

Goh ve diğ. (2012) ise Malezya market ve hipermarketlerinde satışa sunulan 35 adet çiğ tavuk eti (tavuk göğsü, bütün ve alt but kısımları) örneğinde FDA-BAM standart metoduyla *L. monocytogenes* varlığını araştırmış ve %20 oranında patojene bulaşma teyit etmiştir. Patojen bakterinin en yüksek bulunma oranı tavuğun göğüs kısmında (% 42.03), ardından alt butlarında (% 11.27) ve bütün but örneklerinde (% 7.14) olduğu bildirilmiştir.

Belirtilen sebepler ve bu çalışmalarda ulaşılan sonuçlar ışığında satışıdaki gıdanın ne kadar doğru koşullarda hazırlandığı, saklandığı ve satıldığının değerlendirilmesi açısından da *L. monocytogenes* kontaminasyonunun incelenmesinin ne denli önemli olduğu görülmektedir.

Bakterinin bulaşma ve diğer bakterilere oranla daha zorlu koşullarda hayatta kalma yeteneği nedeniyle de araştırmalarda önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan birinde Goh ve diğ., (2014) *L. monocytogenes* ile kontamine dondurulmuş ve pişmiş tavuk etlerinin polietilen ve ahşap kesme tahtaları üzerinde kesilmesi sırasında oluşan kontaminasyonları incelemiştir. Araştırmacılar ahşap kesme tahtalarının *L. monocytogenes* ile daha düşük oranda kontamine olduğunu ve bakterinin kısa sürede ahşap yüzeylerde öldüğünü belirtmektedir. Bununla birlikte polietilen yüzeye bakterinin daha rahat tutunduğu ve çoğalmaya başladığı tespit edilmiştir.

Polietilen yüzeylerle ilgili bir başka çalışmada *L. monocytogenes* suşları ile kontamine olmuş kesme tahtalarında zaman geçtikçe (72 saatte) bakteri sayının giderek arttığı görülmüş ve bu yüzeylerin dezenfektanlarla muamele edilmesinin biyofilm oluşumunu önlemeye yardımcı olabileceği de bildirilmiştir (Beltrame ve diğ., 2015).

Öksüztepe ve Beyazgül (2014) Elazığ ilinde dönerler üzerinde yapmış oldukları araştırmada satışa sunulan ve halk tarafında sevilerek tüketilen tavuk etli dönerlerin et dönerleriyle kıyaslandığında daha düşük kaliteye sahip olduğunu belirtmişler. En büyük etkenler olarak hijyen kurallarının yetersiz olması, pişirme sırasında eşit oranda ısıнын dağılmaması gösterilmiş ve önlemlerin alınmasının önemli olduğunu vurgulamıştır.

Çalışmamızda biyokimyasal testlerle doğrulanan şüpheli suşların antibiyotik direnç profillerinin tayini Kirby Bauer Disk Difüzyon yöntemi (Bauer ve diğ., 1966) uygulanarak yapılmıştır. İzolatların antibiyotik direnç profillerinin incelenmesi sonucu yalnızca D042 izolatının standart *L. monocytogenes* suşu (RSKK 475) gibi tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, D017 izolatının siprofloksasin'e, D039 ve D044 izolatının sefaklor'a karşı yarı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda D039 ve D044 döner örneklerinin kaynaklarının (30. dönerci noktası) aynı olmasına rağmen, D039 rifampin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğu halde, D044 numaralı suş yarı duyarlı olması her iki izolatın birbirinden farklı *L. monocytogenes* suşları olduğu kanaatine varılmıştır.

Çevresel bir izolatın antibiyotik direnç profilinin tespiti oldukça önemlidir. Bu sayede bu bakterilerin herhangi bir hastalığa sebep olduğu takdirde tedaviye vereceği cevapla ilgili öngörüye sahip olmak mümkün olacaktır. Tüketilen gıdalardan elde edilen izolatların denenen antibiyotiklere karşı duyarlı olması, tedavide bu antibiyotiklerin kullanılabileceğini göstermektedir. Aksi söz konusu olduğunda, yani izolatların antibiyotiklere dirençli olduğu durumda bu izolatlar ile kontamine gıdaları tüketen kişilerde hastalık gelişmesi durumunda bahsi geçen antibiyotiklerin tedavi için kullanılamayacağı düşünülmelidir.

L. monocytogenes tedavisi üzerine yürütülmüş çalışmalar özellikle ampisilin, penisilinin, gentamisin, sülfametoksazol, trimetoprim, eritromisin, vankomisinin tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Craig ve diğ., 2019; Lepe, 2020). Örneğin Craig ve diğ. (2019), yapmış oldukları çalışmada gebelikte teşhis edilen veya şüphelenilen listeriosis vakaları için önerilen antibiyotik seçenekleri arasında penisilin, ampisilin ve amoksisilin bulunmaktadır. Maternal, fetal ve neonatal vakalarda tedavi süreci 7-28 gün arasında değişmekte olup hastalıklara iyi geldiği belirtilmektedir.

İncelenen izolatların rifampin, siprofloksasin, sefaklor dışında tüm antibiyotiklere duyarlı olması bu bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisi için klinikte kullanılan antibiyotiklerin etkili olacağını düşündürmektedir.

Gerek ülkemizde gerekse diğer ülkelerde yürütülen birçok çalışmada gıda izolatu *L. monocytogenes* bakterilerinin direnç profilleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bakterinin çalışılan antibiyotiklere karşı sergilediği direncin değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum çevresel izolatların bulundukları ortamlarda sıklıkla antibiyotiklere maruz kalarak direnç geliştirdikleri günümüzde oldukça olağandır. Yücel ve diğ. (2005), et ürünleri üzerinde yapmış oldukları araştırmada izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının (9/79) hepsinin ampisilin, sefalotin ve nalidiksit asite karşı dirençli ve kloramfenikol, tetrasiklin ve siprofloksasin'e karşı duyarlı olduğunu tespit edilmiştir.

Ankara'da hindi kıymalarında izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profillerinin incelenmesi izolatların % 68.8' nin ampisiline, % 81.3' ün penisilin G' ye karşı dirençli, % 40.6' sının eritromisine, %18.8 streptomisine karşı yarı duyarlı, vankomisin, tetrasiklin, gentamisin, kloramfenikol antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Ayaz, 2008).

Kocaman (2015), kuzu etlerinden izole ettiği *Listeria* türlerinin antibiyotik duyarlılık profillerinin tayininde izolatlardan sadece birinin tetrasikline dirençli, diğer antibiyotiklere duyarlı olduklarını tespit etmiştir.

Hatay yöresine ait peynir örneklerinin (116 adet) incelenmesi sonucunda elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının tümünün streptomisine (% 100) dirençli; ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, tetrasiklin, vankomisin ve eritromisine yarı veya tam duyarlı olduğu bildirilmiştir (Onen ve Elmalı, 2016).

Bolu'da tavuk eti ve dana kıymalardan izole edilen 128 adet *L. monocytogenes* izolatın antibiyotik direnç profilleri amoksisilin/klavulanik asit, sefalotin, vankomisin, kloramfenikol, kinupristin antibiyotiklerine nazaran seftriakson (% 51.5), fusidik asit (% 30.3), klindamisin (% 21.2) ve trimetoprim/sulfametoksazola (% 12.1) karşı yüksek oranda dirençli oldukları belirtilmiştir (Arslan ve Baytur, 2018).

Otlu peynirlerden izole edilen *L. monocytogenes* izolatların (5/250) farklı oranlarda direnç profillerine sahip olduğu 2018 yılında yürütülen bir çalışma ile belirlenmiştir. Bu çalışmada suşların % 100' ünün eritromisine, % 80' inin oksitetrasikline, % 40' ının penisilin G'ye ve/veya ampisiline dirençli iken % 60' ının tetrasikline yarı duyarlı ve tüm suşların vankomisin, amoksisilin/klavulanik asit ve kloramfenikole karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tuncay, 2018).

Altuntas ve diğ., 2012 yılında bazı gıda örneklerinden (çiğ dana kıyma, çiğ kırmızı et, çiğ süt, tavuğ göğsü, pişmiş tavuk eti, hamsi ve midye) toplamda izole edilen 14 *L. monocytogenes* suşunun antibiyotik direnç profillerini incelemiş ve izolatların streptomisin (% 92.9), vankomisin (% 100), gentamisin (% 100), rifampisin (% 100), tetrasiklin (% 100), penisilin G (% 100), eritromisin (%100), kloramfenikol (% 100), trimetoprim (% 100) antibiyotiklerine yüksek oranda duyarlı, fosfomisine ise (% 92.9) dirençli olduğu belirtilmiştir. Elde edilen izolatlardan sadece birinin streptomisine (% 7.1) karşı dirençli olduğu ve izolasyon kaynağının tavuk etli döner olduğu da tespit edilmiştir.

Osalini ve diğ. (2010), Ürdün’ de tavuk etli çiğ ve pişmiş yiyecek (tavuk-shawarma, tavuk burger, tavuk sosis ve mortadella) örneklerinin 17'sinde (% 12) *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir. Antibiyotik direnç profilleri incelenen izolatların amoksisilin (% 100), trimetoprim (% 100), enrofloksasin (% 100), kliramfenikol (% 100), eritromisin (% 94.1), gentamisin (% 94.1), tilmikosin (% 35.3), siprofloksasine 14 (% 82.4) karşı duyarlı; tetrasikline karşı izolatların % 11.8 dirençli ve % 88.2 duyarlı, tilmikosine karşıysa % 17.6 dirençli ve % 35.3 duyarlı oldukları saptanmıştır.

Kore’ de Seul şehrinde satışta bulunan 274 adet taze tavuk karkası toplanarak *Listeria* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırmıştır. FDA standart metodu uygulanarak incelenen örneklerden *L. monocytogenes* (% 29.6), *L. innocua* (% 50,1), *L. welshimeri* (% 6.9) ve *L. grayii* (% 11.3) türü elde edilen çalışmada tüm *L. monocytogenes* suşlarının kanamisin, vankomisin, sefalotin, rifampisin, eritromisin, ampisilin, gentamisin, streptomisin ve kloramfenikole duyarlı, penisilin G 17 (% 63) ve tetrasikline (% 26) dirençli olduğunu bildirilmiştir (Sik ve diğ., 2006).

Bankong’ da bulunan açık marketlerden ve süpermarketlerden toplanan 104 adet kırmızı ve kanatlı et örnekleri toplanıp *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. Araştırma sonucunda sekiz adet tavuk eti örneğinden toplam 22 adet suş *L. monocytogenes* olarak değerlendirilmiştir. Suşların büyük çoğunluğunun antibiyotiklere duyarlı olduğu, sadece birinin tetrasikline yarı duyarlı olduğu çalışmada bildirilmiştir (Indrawattana ve diğ., 2011).

Khademi ve Sahebkar (2019) İran’ da yapmış oldukları araştırma sonucunda izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının yüksek oranda penisilin, ampisilin ve gentamisin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda araştırmada trimetoprim/sülfametoksazol,

vankomisin ve siprofloksasinin düşük direnç oranları nedeniyle İran'daki insan listeriyozunun tedavisinde alternatif olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Tez çalışmamız kapsamında antibiyotik direnç profilleri incelenen suşlar moleküler doğrulanma testlerine tabi tutulmuştur. PZR yoluyla izolatlarda *Listeria* spp. özgü *iap* ve *L. monocytogenes*' e özgü *hlyA* gen bölgeleri incelenmiştir. *L. monocytogenes* olarak doğrulanan D039 ve D044 izolatların serolojik gruplarının tayini multipleks PZR uygulanarak yapılmış ve *lmo 1118*, *lmo 0737*, *orf 2110*, *orf 2819* ve *prs* gen bölgeleri incelenmiştir. Gen bölgelerinin incelenmesi sonucu *L. monocytogenes* olarak değerlendirilen 39 ve 44 numaralı suşlar 31 kodlu döner örneğinden izole edilmiş ve izolatların 1/2a serotipine ait olduğu doğrulanmıştır. Bu bakterinin 4b serotipinin epidemik listeriyoza, 1/2a ve 1/2b serotiplerinin ise sporadik enfeksiyonlara sebep olduğunu bilinmektedir (Chen ve diğ., 2017). Bu sebeple izole edilen D039 ve D044 suşlarının halk sağlığı açısından tehdit oluşturabileceği düşünülmektedir.

Gerek Türkiye' de gerekse dünyada tavuk etlerinden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarında 1/2a serotipinin yaygın olarak görüldüğü belirtilmektedir. Bolu ilinde tavuk etlerinin *L. monocytogenes* varlığı açısından araştırılması sonucunda izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının hepsinin (7/62) 1/2a serotipine ait olduğu tespit edilmiştir (Arslan ve Baytur, 2018). Çufaoğlu (2018), piliç boyun derileri üzerinde yapmış olduğu çalışmada elde edilen *L. monocytogenes* izolatların hepsinin (% 100) 1/2a serotipine ait olduğu doğrulanmıştır.

Ebner ve diğ., (2015) İsviçre'de yürütmüş oldukları araştırmada 2011-2014 yıllarında farklı gıda örneklerden (et, süt, bitki bazlı gıda ürünleri) izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplerini incelemiştir. Yapılan çalışma sonucunda toplam gıdalarda 1/2a serotipli izolatların yaygın olduğu, özellikle de süt ürünlerinde bulunduğu teyit edilmiştir. Et ürünlerinden izole edilen suşların % 58' inin (52/89) 1/2a, % 15' inin (13/89) 4b serotipine; süt ürünlerinden izole edilen suşların % 71' inin (24/34) 1/2a, % 18' inin (6/34) 4b serotipine ait olduğu bildirilmiştir. Sik ve diğ. (2006), tavuk karkasları ile yapılan çalışmada 150 adet *L. monocytogenes* izolatu elde edilmiştir. Araştırma sonucunda en yaygın serotipin 1/2a (% 45.3), ardından 1/2b (% 27.3), 1/2c (% 24.6), 4b (% 1.3) ve 3b (% 0.6) olduğu belirlenmiştir.

Maung ve diğ., 2019 yılında tavuk etlerinden 2012 ve 2017 yılında izole edilen *L. monocytogenes* suşların serotiplendirilmesi üzerine çalışma yapılmıştır. 2012 yılında 114 adet *L. monocytogenes* izolattan % 73.9' i 1/2b, % 21.5'i 1/2a, % 3.1 4b/4e ve % 1.5' i 1/2c

serotipine; 2017 yılında izole edilen 39 izolattan % 51.7' i 1/2b ve % 48.3' i 1/2a serotipine ait olmuştur.

Yapılan tez çalışması ve araştırmalar sonucunda Türkiye'de ve dünyanın birçok ülkesinde tüketime sunulan tavuk etli döner ve hamburgerlerin *L. monocytogenes* bakterisi açısından halk sağlığı için tehdit oluşturduğu düşünülmektedir.

Piyasada ve mağazalarda birkaç çeşitte tavuk etli (hazır pişirilmiş, yarım hazır) döner ve burgerler satılmaktadır. İncelenen bilimsel makalelerde ve yapılan tez çalışmasında her iki gıdada *Listeria* cinsi bakteri türlerinin bulunma olasılığının birden çok nedeninin olduğu gösterilmektedir. Döner ve burgerlerin yapımı sırasında, hatalı kesim ve ambalajlanması, satış noktalarında hijyenin yetersizliği, yanlış temizleme teknikleri, saklanma yerlerinin yeterli koşullarının sağlanmaması patojene bulaşma riskini arttırmaktadır (Kurpas ve diğ., 2018; Lianou, 2021). Satış noktalarında döndürülerek pişirilen tavuk dönerlerin incelenmesi dönerlerin tüm kısımlarının aynı derecede pişmemesi ve kesim sırasında kesme bıçağının pişmeyen kısımlarda hayatta kalan bakterilerle kontamine olması, kesme tahtalarının yüzeylerinin yanlış temizleme teknikleri sonucunda bakterilerin lokalize olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda satış noktalarında müşteri sirkülasyonunun yoğunluğu da bakteriye bulaşma riskini arttırmaktadır. Yürütülen bilimsel çalışmalar tavuk etli döner ve burgerlerin çiğ halde daha çok bakteri barındırdığı, ısıtma işlemlerin bakterilerin hayatta kalmasını engellediğini göstermektedir (Bostan ve diğ., 2011). Bunlara ek olarak gıdanın servis edilmesinin ardından kısa süre içinde tüketilmesi gerektiği ancak bunun bazı durumlarda söz konusu olmadığı da yapılan çalışmalarla ortaya konmuş bir diğer problemdir. Gıdanın satışının ardından tüketilmeden uygunsuz koşullarda bekletilmesi içindeki mikrobiyal popülasyonda artışa sebebiyet vereceği için risk faktörünü arttırmaktadır. Başka bir deyişle sadece üretici ve satıcı değil tüketici hataları da bu gıdanın taşıdığı mikrobiyal riskleri arttırabilmektedir (Lianou, 2021).

Tez kapsamında incelenen tavuk etli döner örneklerinden sadece Eminönü semtinden alınan örneklerden birinde *L. monocytogenes* 1/2a serotipine ait iki farklı suş ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yapılan antibiyotik direnç profili analizi sporadik hastalıklara sebep olan 1/2a serotipli izolatların antibiyotik tedavisine pozitif sonuç verebileceği kanaatine varılmıştır.

Tez çalışmamız kapsamında İstanbul ilinde tavuk burgerlerin incelenmesi, burger satış noktalarının ve ürünlerinin değerlendirilmesi sonucunda satış noktalarının yoğunluğuna ve yetersiz hijyenik ortamlarda hazırlanmalarına rağmen toplanan örneklerde *L. monocytogenes* tespit edilmemiştir. Şireli ve diğ., (2001) tavuk etli burgerlerin kıymadan yapılan burgerlere nazaran daha düşük oranda *Listeria* cinsi bakterilerle kontamine olmasını kullanılan et kalitesi dışında ilave edilen katkı maddelerinin antilisterial etkilerinden kaynaklı olabileceğini bildirmiştir (Halkman, 2013). Çalışmamızda incelenen burger köftelerinin yüksek sıcaklıklı kızgın yağda pişirilmesi bakterilerin hayatta kalma olasılıklarını minimuma indirdiği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Acar, M.S., 1996, Kasaplık hayvan etleri ve tavuk etinden yapılan döner kebapların mikrobiyolojik kalitesinin karşılaştırmalı araştırması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi A.B.D.
- Allerberger, F., 2003, *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 183-189.
- Altun S.K., ve Atasever M., 2018, Erzurum’da tüketime sunulan tavuk etlerinin bazı patojen bakteriler yönünden incelenmesi, *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 8 (1), 36-50.
- Altuntas, E.G., Kocan, D., Cosansu, S., Ayhan, K., Juneja, V.K. and Materon, L., 2012, Antibiotic and bacteriocin sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different foods, *Food and Nutrition Sciences*, 3, 363-368.
- Anonim, <http://www.iskender.com.tr/iskenderin-tarihi.html>, [Ziyaret tarihi: 25 Ağustos 2019].
- Ariza-Miguel, J, Fernandez-Natal, M.I, Soriano, F., Hernandez, M., Stessl, B. And Rodriguez-Lazaro, D., 2015, Molecular epidemiology of invasive listeriosis due to *Listeria monocytogenes* in a Spanish hospital over a nine-year study period, 2006–2014, *BioMed Research International*, 1-10.
- Arslan, S., ve Baytur, S., 2018, Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and subtyping and virulence factors of *Listeria monocytogenes* from retail meat, *Journal of Food Safety*, 39 (1).
- Ayaz, M., Othman, F.A., Bahareth, T.O., Al-Sogair, M.A. and Sawaya, W.N., 1985, Microbial quality of shawarma in Saudi Arabia, *Journal of Food Protection*, 48 (9), 811-814.
- Ayaz, N.D., 2008, Hindi kıymalarından *Listeria monocytogenes*’in immuno manyetik separasyon ve pcr ile tanısı ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanması, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara.
- 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, 1882–1889.

- Barre, L., Angelidis, A.S., Boussaid, D., Brasseur, E.D., Manso, E. and Besse, N.G., 2016, Applicability of the EN ISO 11290-1 standart method for *Listeria monocytogenes* deection in presence of new *Listeria* species, *International Journal of Food Microbiology*, 238, 281-287.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. and Turck, M., 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4): 493–496.
- Beaufort, A., Bergis, H., Lardeux, A.L., Unit Modelling of Bacterial Behaviour, Lombard, B., 2014, Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, Anses-Food Safety Laboratory, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_tech-guide-doc_listeria-in-rte-foods_en.pdf, [Ziyaret tarihi: 12 Aralık 2019].
- Beltrame, C.A., Martelo, E.B., Mesquita, R.A., Barbosa, J., Steffens, C., Toniazzo G. Valduga E. and Cansian, R.L., 2015, Adhesion of *Listeria monocytogenes* to cutting boardsurfaces and removal by different sanitizers, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10, 41–47.
- Bernagozzi M., Bianucci F., Sacchetti R. and Bisbini P., 1994, Study of the prevalence of *Listeria* spp. in surface water, *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, 196, 237–244.
- 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, 526–532.
- Bostan, K., Yılmaz, F., Muratoğlu, K. ve Aydın A., 2011, Pişmiş Döner Kebaplarda Mikrobiyolojik Kalite ve Mikrobiyel Gelişim Üzerine Bir Araştırma, *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 17 (5), 781-786.
- Bouayad, L., Hamdi, T. M., Naim, M., Leclercq, A. and Lecuit, M., 2015, Prevalence of *Listeria* spp. and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from broilers at the abattoir, *Foodborne Pathogens and Disiease*, 12, 606–611.
- Buchanan, R.J., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C. and Whiting, R.C., 2017, A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments, *Food Control*, 75, 1-13.
- Buyck, M.J. and Seideman S.C., 1982, Physical and Sensory Properties of Chicken Patties Made with Various Levels of Fat and Skin, *Journal of Food Protection*, 45(3), 214-217.
- Campagnolloa, F.B., Gonzales-Barron, U., Pilão Cadavez, V.A., Sant’Anaa S.A. and Schaffnerc, D.W., 2018, Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in

- traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses, *Food Control*, 92, 370–379.
- Carpentier, B., and Cerf, O., 2011, Review-persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises, *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1-8.
- Cebirbay, M.A., ve Aktaş, N., 2008, Türk mutfağının geleneksel yiyeceği: döner kebab, uluslararası asya ve kuzey afrika çalışmaları kongresi, 38. ICANAS, 38.ICANAS Maddi Kültür Bildiri Kitabı; I, Cilt, 329–339, Ankara.
- Chen, J.Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S. and Hua, Z., 2017, Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources, *Food Science and Human Wellness* 6, 97–120.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, OJ L 338.
- Cossart, P., and Lebreton, A., 2014, A trip in the “New Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*, *FEBS letters* 588, 2437–2.
- Craig, A.M., Dotters-Katz, S., Kuller, J.A., and Thompson, J.L., 2019, Listeriosis in Pregnancy: A Review, *Obstetrical And Gynecological Survey*, 74 (6) 362-368.
- Çotuk, A., ve Sungur, E., 2015, Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Yöntemleri, 4.baskı, Nobel Tıp Kitapevi.
- Çufaoğlu, G., 2018, Piliç Boyun Derisinde *Listeria monocytogenes* prevalansının belirlenerek izolatların karakterizasyonu ve litik bakteriyofajlar ile piliç but gıda modelinde biyokontrolünün araştırılması, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Kayseri.
- Datta, A., and Burall, L., 2018, Current Trends in Foodborne Human Listeriosis, *Food Safety*, 6 (1).
- Datta, A.R., 2003, *Listeria monocytogenes*. In: Miliotis MD, Bier JW, editors. *International Handbook of Foodborne Pathogens*, New York: Marcel Dekker, Inc.; 105–21.
- Deniz, H.İ. ve Altun, S.K., 2017, Şanlıurfa ilinde tüketime sunulan yöresel peynirlerde virüsent *Listeria monocytogenes* izolasyonu ve identifikasyonu, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 12(3), 289-295.
- Dickstein, Y., Oster, Y., Shimon, O., Neshet, L., Yahav, D., Wiener-Well, Y., Cohen, R., Ben-Ami, R., Weinberger, M., Rahav, G., Maor, Y., Chowers, M., Nir-Paz, R. and Paul, M., 2019, Antibiotic treatment for invasive nonpregnancy-associated listeriosis and

mortality: a retrospective cohort study, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 2243–2251.

- 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, 3285–3291.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. and Martin P., 2004, Differentiation of the major *listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR, *Journal Of Clinical Microbiology*, 3819–3822.
- Ebner, R., Stephan, R., Althaus, D., Brisse, S., Maury, M. and Tasara, T., 2015, Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2014 from different food matrices in Switzerland, *Food Control*, 57, 321–326.
- Elmalı, M., Can, H.Y. ve Yaman, H., 2015, Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat, *Food Science and Technology International*, Campinas, 35(4), 672–675.
- El-Shenawy, M., El-Shenawy, M., Manes, J., and Soriano J.M., 2011, *Listeria* spp. in street-vended ready-to-eat foods, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
- European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products – 4 June 2019. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA; 2019.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2018, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I., 1991, *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *American Society for Microbiology*, 55(3), 476–511.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. and Stasiewicz, M.J., 2014, *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health, *Journal of Food Protection*, 77, 150–170.
- Gasnov, U., Hughes, D. and Hansbro, P.M., 2005, Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review, *FEMS Microbiology Reviews* 29, 851–875.
- Gençer, V., ve Kaya, M., 2004, Yaprak Dönerin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Kimyasal Bileşimi, *Turk J Vet Anim Sci.*, 28, 1097–1103.

- George, M., Lund, M. and Brocklehurst, F., 1988, The effect of pH and Temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*, *Letters in Applied Microbiology*., 6, 153–156.
- Gibbons N. E., 1972, *Listeria* Pirie – Whom does it honour?, *International Journal of Systematic bacteriology*, 22 (1), 1-3.
- Gilot, P., Genicot A., and Andre P., 1996, Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium, *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1007– 1010.
- Goh, S.G., Kuan, C. H., Loo, Y.Y., Lye, Y.L., Chang, W.S., Soopna, P., Najwa, S., Tang, J. Y.H., Yaya, R., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., Afrah- Henji, L. and Son, R., 2012, *Listeria monocytogenes* in retailed raw chicken meat in Malaysia, *Journal of Poultry Science*., 91(10), 2686-2690.
- Goh, S.G., Leili, A.H., Kuan, C.H., Loo, Y.Y., Lye, Y.L., Chang, W.S., Soopna, P., Najwa, S., Tang, J.Y. H., Yaya, R., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Son, R., 2014, Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards, *Food Control* 37, 51-55.
- Gökmen, M., Akkaya, L., Kara, R. ve Önen, A., 2016, Balıkesir’de satışa sunulan bazı tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*’in yaygınlığı, *Van Veterinary Journal*, 27 (1), 31-36.
- Gönülalan, S., 2010, Kayseri ilinde satışa sunulan dondurmaların *Listeria* spp. varlığı yönünden incelenmesi, Yüksek Lisans, Erciyes Üniversitesi.
- 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., Bakker, H.C., Wiedmann M., Swaminathan, B., and Saunders, B.D., 2010, *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1280–1288.
- Gray, M.L. and Killinger, A.H., 1966, *Listeria monocytogenes* and listeric infections, *Bacteriological Review*., 30(2), 309-82.
- Guariglia-Oropeza, V., Orsi, R.H., Guldemann, C., Wiedmann, M., and Boor, K.J., 2018, The *Listeria monocytogenes* bile stimulon under acidic conditions is characterized by strain-specific patterns and the upregulation of motility, cell wall modification functions, and the prfA regulon, *Frontiers in microbiology*, 9, 120.
- Gürel, Z. ve Aslan, D., 2019, Halk sağlığı bakış açısıyla gıda kaynaklı krizler ve önleme yaklaşımları, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(3), 361-376.

- Halkman, A. K., 2013, Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 33-38.
- Halter, L.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, 641–647.
- Hofer, E., Ribeiro, R. and Feitosa, D.P., 2000, Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 615–620.
- Huang, Y.T., Ko, W.C., Chan, Y.J., Lu, J.J., Tsai, H.Y., Liao, C.H., Sheng, W.H., Teng, L.J. and Hsueh, P.R., 2015, Disease burden of invasive listeriosis and molecular characterization of clinical isolates in Taiwan, 2000–2013, *PLOS ONE*, 10 (11).
- Hudzicki, J., 2009, Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol, American Society for Microbiology.
- Indrawattana, N., Nibaddhasobon, T., Sookrung, N., Chongsang-nguan, M., Tungtrongchitr, A., Makino, S., Tungyong, W. and Chaicumpa, W., 2011, Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw Meats Marketed in Bangkok and Characterization of the Isolates by Phenotypic and Molecular Methods, *Journal of Health, Population and Nutrition*, 29(1), 26-38.
- Jackson, K.A., Gould, L.H., Hunter, J.C., Kucerova, Z. and Jackson, B., 2012, Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998–2014, *Emerging Infectious Diseases* 24, 1116-1118.
- 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, 120–123.
- Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K.J., ve Kneifel, W., 2014, *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products- A Review., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13.
- Kaya, A., Özpınar, H., Sancar, B.Ç., 2018, Investigation of Microbiological Quality of Raw and Cooked “Doner Kebab” Consumed in Istanbul, *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences* , 6 (2), 78-83.
- Kaya, N., 2019, İstanbul’da tüketime sunulan beyaz peynir örneklerinde *listeria monocytogenes* varlığının araştırılması, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- Khademi, F., ve Sahebkar, A., 2019, A systematic review and meta-analysis on the prevalence of antibiotic-resistant *Listeria* species in food, animal and human specimens in Iran, *Food Scientists & Technologists* (India).
- Kocaman, N., 2015, Kuzu etlerinden *Listeria monocytogenes* izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Kozak, S.M., Bobak, Y. and Amico, D., 2018, Efficacy of antimicrobials applied individually and in combination for controlling *Listeria monocytogenes* as surface contaminants on queso fresco, *Journal of Food Protection*, 81(1), 46-53.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Põltsama, P., and Elias, T., 2013, *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods, *Food Control*, 30, 24-29.
- Kurpas, M., Wieczorek, K. and Osek, J., 2018, Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*, *Veterinary Research.*, 61, 49-55.
- Leclercq, A., 2010, *Listeria rocourtiae* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 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.
- Lepe, J.A., 2020, Current aspects of listeriosis, *Medicina Clínica*.
- Lianou, A., Raftopoulou, O., Spyrelli, E. and Nychas, G.J.E., 2021, Growth of *Listeria monocytogenes* in Partially Cooked Battered Chicken Nuggets as a Function of Storage Temperature, *Foods*, 10, 533.
- Liu, D., 2008, Handbook of *Listeria monocytogenes*, USA : CRC Pressby Taylor & Francis Group, LLC.
- Liu, Y., Sun, W., Sun, T., Gorris, L., Wang, X., Liu, B. and Dong, Q., 2020, The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach, *International Journal of Food Microbiology*, 312.
- Lokerse, R.F.A., Maslowska-Corker, K.A., Wardt, L.C. and Wijtzes, T., 2016, Growth capacity of *Listeria monocytogenes* in ingredients of ready-to-eat salads, *Food Control* 60, 338-345.
- Magalhaes, R., Mena, C., Ferreira, V., Almeida, G., Silva, J. and Teixeira, P., 2014, Traditional Methods for Isolation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria monocytogenes*:

- Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Kieran Jordan ve diğ., 1157, Springer Science, Business Media New York, ISBN 978-1-4939-0703-8, 3-24.
- Maia, R.L., Teixeira, P. and Mateus, T.L., 2019, Risk communication strategies (on listeriosis) for high-risk groups, *Trends in Food Science & Technology* 84, 68–70.
- Martinez-Rios, V., Gkogka, E. and Dalgaard, P., 2019, New Term to Quantify the Effect of Temperature on pH_{min}-Values Used in Cardinal Parameter Growth Models for *Listeria monocytogenes*, *Frontiers in Microbiol*, 10, 1510.
- Maung, A.Y., Mohammadi, T.N., Nakashimaa, S., Liu, P., Masudaa, Y., Honjoh and Miyamoto, T., 2019, Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan, *International Journal of Food Microbiology*, 304, 2, 49-57.
- Maurella, C., Gallina, S., Ru, G., Adriano, D., Bellio, A., Bianchi, D.M., Chiavacci, L., Crescio, M.I., Croce, M., D'Errico, V., Dupont, M.F., Marra, A., Natangelo, U., Pomilio, F., Romano, A., Stanzione, S., Zaccaria, T., Zuccon, F., Caramelli, M. and Decastelli, L., 2018, Outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* 1/2a in sliced cold beef ham, Italy, *Eurosurveillance*, 23(10), 17-155.
- McLauchlin, J., Catherine, D., and Christine, E. R., 2014, *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*, In E. Rosenberg, E. F. Delong, S. Lory, E. Stackebrandt ve F. Thompson (Eds.), The prokaryotes, firmicutes and tenericutes, 241-259.
- Melero, B., Diez, A.M., Rajkovic, A., Jaime, I. and Rovira, J., 2012, Behaviour of non-stressed and stressed *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* cells on fresh chicken burger meat packaged under modified atmosphere and inoculated with protective culture, *International. Journal of Food Microbiology*, 158 (2),107-112.
- Melero, B., Stessl, B., Mansoa, B., Wagnerb, M., Esteban-Carboneroa, O. J., Hernándezza, M., Roviraa, J. and Rodriguez-Lázaroa, D., 2019, *Listeria monocytogenes* colonization in a newly established dairy processing facility, *International Journal of Food Microbiology* 289, 64–71.
- Milian H., and Cifre P., 2014, What is new in listeriosis? *BioMed Research International*, ID 358051.
- Mishra, K.K., Mendonca, M., Aroonnual, A., Burkholder, K.M., and Bhunia, A.K., 2011, Genetic organization and molecular characterization of secA2 locus in *Listeria* species, *Gene*, 489, 76-85.
- Mohammed, T. K., 2019, Detection of hlyA gene in *Listeria monocytogenes* Isolated from Cerebral Spinal Fluid of Some Iraqi Meningitis Children, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.*, 11(2), 614-617.

- Montero, K.N., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, V., Cerda, J.P. and Lecuit, M., 2018, *Listeria costaricensis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 844–850.
- Muchaamba, F., Eshwar, A. K., Stevens, M. J. A., Ah, U., and Tasara, T., 2019, Variable Carbon Source Utilization, Stress Resistance, and Virulence Profiles Among *Listeria monocytogenes* Strains Responsible for Listeriosis Outbreaks in Switzerland, *Frontiers in Microbiology*, 10, 957.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., and Swann, B.R., 1926, A disease of rabbit characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp). *Journal of Pathology and Bacteriology*, 29, 407-439.
- Nayak, D.N., Savalia, C.V., Kalyani, I.H., Kumar, R. and Kshirsagar, D.P., 2015, Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods, *Veterinary World*, 8(6), 695-701.
- Noordhout, C.M., Devleesschauwer, B., Angulo, F.J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., Havelaar, A. and Speybroeck, N., 2014, The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infectious Diseases*, 14, 1073–1082.
- Nur G., Deveci H.A., Kırpık M.A., Nur Ö., ve Ayata E., 2017, Gıda Güvenilirliği Kriterlerine Göre Hatayda Satılan Tavuk Dönerlerinde Mikrobiyolojik Kalite, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 9 (2), 14 – 22.
- Nyfeldt, A., 1929, Etiologie de la mononucleose infectieuse, *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie*, 101, 590–591.
- Ohshima, C., Kanagawa, S., Miya, S., Nakamura, A., Takahashi, H., Kuda T., and Kimuraa, B., 2019, Whole-genome sequence of a serotype 1/2b *Listeria monocytogenes* strain isolated from raw seafood in Japan, *Microbiology Resource Announcement*, 8, 206-219.
- Onen, S., Elmalı, M., 2016, Determination of *L. monocytogenes*, and its Antibiotic Resistance of Local Produced Cheese Consuming in Hatay, *Van Veterinary Journal*, 27 (1), 25-29.
- Onurlubaş, E., Doğan, H.G., ve Gürler, A.Z., 2015, Türkiye’ de ev dışı gıda tüketimin durumu ve tüketici eğilimleri, *The Journal of International Social Research*, 8 (38).
- Orsi, R., and Wiedmann M., 2016, Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009, *Applied Microbiology Biotechnology*, 100, 5273–5287.

- Osaili, T.M., Alaboudi, A.R., and Nesiar, E.A., 2011, Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan, *Food Control*, 22, 586-590.
- Öksüztepe, G., Beyazgül, P., 2014, Elazığ'da satılan pişmiş et ve tavuk dönerlerin mikrobiyolojik kalitesi, *Fırat Üniversitesi Sağlık. Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28 (2), 65 – 71.
- Özmen, G., ve Kılıç, H., 2006, Isolation of *Listeria* spp. from Chicken meat consumed in gemlik garrison, *Journal of Health Sciences*, 15(3), 194-197.
- Paduroa, C., Monteroa, D.A., Chamorroa, N., Carreñob, L.J., Vidal, M. and Vidala, R., 2020, Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008–2017, *Food Microbiology* 85.
- Palumbo, J.D., Kaneko, A., Nguyen, K.D., and Gorski, L., 2005, Identification of genes induced in *Listeria monocytogenes* during growth and attachment to cut cabbage, using differential display, *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5236-5243.
- Pexara, A., Ambrosiadis, I., Georgakis, S. and Genigeorgis, K. 2006. A new production technology for “gyros”. Evaluation of parameters affecting the quality of the final product, *Journal of Food Engineering*, 77, 601–609.
- Rios, V.M., and Dalgaard, P., 2018, Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis, *Food Control* 84, 205-214.
- Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huaman, B. H., Hascoët, A. S., Yuste, J. and Rodríguez-Jerez, J. J., 2019, Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilm cells formed by an in vitro model: A comparison of different methods, *International Journal of Food Microbiol.*, 16, 209-214.
- Rocourt, J. and Grimont, P.A.D., 1983, *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, s. 866-869.
- Rocourt. J., and Buchrieser. C., 2007, The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenic position. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (III Edition.), *Listeria*, listeriosis and food safety, s. 1-20, CRC Press.
- Rocourt. J., Boerlin. P., Grimont. F., Jacquet. C. and Piffaretti. J.C., 1992, Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*, *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 42, 171–174.
- Rosa-Zariñana, A.E., Crosby-Galván, M.M., Ramírez-Guzmán, M.E., Hernández-Sánchez, D. and Mata-Espinosa, M.A., 2018, Standardization of PCR technique for detecting

Listeria monocytogenes in chicken, beef and pork, *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(13), 25-34.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., and Griffin, P.M., 2011, Foodborne illness acquired in the United Statesmajor pathogens, *Emerging Infections Diseases.*, 17, 7–15.

Schardt, J., Jones, G., Müller-Herbst, S., Schauer, K., D’Orazio, S. and Fuchs, T. M., 2017, Comparison between *Listeria sensu stricto* and *Listeria sensu lato* strains identifies novel determinants involved in infection, *Scientific Reports* 7.

Schlech, W.F. and Acheson, D., 2000, Foodborne listeriosis, *Clinical Infections of Disease.*, 31, 770–775.

Schlech, W.F. III, Haldane H., Mailman T.L., Warhuus M, Crouse N. and Haldane, D.J., 2005, Does sporadic *Listeria* gastroenteritis exist? A 2-year population-based survey in Nova Scotia, Canada, *Clinical Infections of Disease*, 41, 778–784.

Seeliger and Schoofs, 1981, "Nonpathogenic *Listeriae*: *L. innocua* sp.n." A, Medizinische Mikrobiologie, *Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 249 (4), 487–493.

Seeliger, H.P.R, Rocourt, J, Schrettenbrunner A, Grimont P.A.D. and Jones D., 1984, *Listeria ivanovii* sp. nov., *International Journal of Systemic Bacteriology.*, 34, 336–337.

Shakuntala I., Dasa S., Ghataka S., Milton A.A.P., Sanjuktaa R., Puroa K., Pegua R.K., Duaraha A., Barbuddheb S.B., and Sen A., 2019, Prevalence, characterization, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from foods of animal origin in North East India, *Food Biotechnology*, 33(3), 237–250.

Sik, J.S., Ryu, S., Choo, E., Han, K., Miyamoto, T. and Heu, S.J., 2006, Antibiotic Resistance and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated from Chicken Carcasses in Korea, *Journal of Microbioly and Biotechnology*, 16(8), 1276-1284.

Swaminathan B., and Gerner-Smidt P., 2007, The epidemiology of human listeriosis, *Microbes and Infection*, 9, 1236-1243.

Şanlıbaba, P., Tezel, B. U. ve Çakmak G. A., 2018, Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Foods in Turkey, *Hindawi Journal of Food Quality*.

Şireli, U.T., Erol, Ü., Şahin,S., ve Terzi, G., 2002, Tavuk kıyma, köfte ve burgerlerinde *listeria* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi, *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*, 26, 1271-1276.

- Temple, M.E., and Nahata, M.C., 2000, Treatment of Listeriosis, *The Annals of Pharmacotherapy*, 34, 656-661
- Thamnopoulos, I.A.I., Michailidis, G.F., Fletouris, D.J., Badeka, A., Kontominas M.G. and Angelidis, A.S., 2018, Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration, *Food Microbiology*, 73, 168–176.
- Todd, E.C.D., Szabo, R. and Spirling, F., 1986 “Donairs (Gyros)- Potential hazards and control”, *Journal of Food Protection*, 49 (5), 369-377.
- Tomar O., and Akarca G., 2018, Afyonkarahisar’da satışı sunulan afyon kaymaklarının mikrobiyolojik özellikleri, *European Journal of Science and Technology*, 14, 102-109.
- Tuncay, R.M. and Sancak, Y.C., Presence of *Listeria monocytogenes* in herby cheese and determination of their susceptibility to antibiotics, 2018, *Van Veterinar Journal*, 29 (3) 169-173.
- Turp, G., Y., ve Yıldırım, B., 2019, Our Traditional product doner; production methods, quality characteristics and development studies, *turkish journal of agriculture - Food Science and Technology*, 7 (2), 344-354.
- Türk Gıda Kodeksinin Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği 6/2/2009 tarihli ve 27133 sayılı Resmî Gazete yayını <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/01/20100108-10.htm>
- United States Department of Agriculture food safety and inspection service, office of public health science – mlg 8.11, 2019, <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES>, [Ziyaret tarihi: 5 Mayıs 2020].
- Valimaa, A.L., Tilsala-Timisjarvi, A., and Virtanen, E., 2015, Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain - A review, *Food Control*, 55, 103-114.
- Vos, de P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K. H., Whitman, W.B. and Parte, A.C., 2009, *Bergey’s Manual Of Systematic Bacteriology*, 2.baskı, Springer, 244-257.
- Vu, K.T.H., Stasiewicz, M. J., Benjakul, S. and Vongkamjana, K., 2018, Genome Sequences of *Listeria* Phages Induced from Lysogenic Isolates of *Listeria monocytogenes* from Seafood and a Seafood Processing Environment in Thailand, *Genome Announce*, 6, 18.
- Wang, Y., Luo, L., Li, Q., Wang, H., Wang, Y., Sun, H. ve Ye, C., 2019, Genomic dissection of the most prevalent *Listeria monocytogenes* clone, sequence type ST87, in China. *BMC genomics*, 20 (1), 1-13.

- Warriner, K., and Namvar, A., 2009, What is histeria with *Listeria*?, *Trends in Food Science & Technology* , 20, 245-254.
- 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, 286–292.
- Wong, W. C., Pui, C.F., Chilek, T.Z.T, Noorlis, A., Tang, J.Y.H, Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Radu, S., 2011, Survival of *Listeria monocytogenes* during Frying of Chicken Burger Patties, *Food and Nutrition Sciences*, 2, 471-475.
- Yücel, N., Çıtak, S., Önder, M., 2005, Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, *Food Microbiology*, 22, 241-245.
- Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R. and Guldemann, C., 2019, Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time, *International Journal of Food Microbiology*, 296, 83–92.

EKLER

EK - A – İzole edilen *L. monocytogenes* şüpheli suşlarının biyokimyasal testleri.

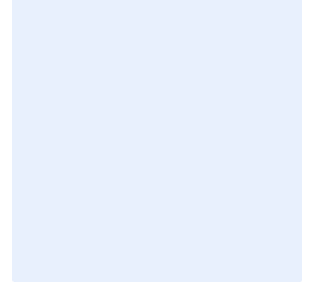
İzolat No.	İzolasyon kaynağı	SIM	MR	VP	Nitrat redük.	Mannitol	α Metil Mannosit	Ksiloz	Ramnoz	Riboz
D004	Tavuk döner	+	-	-	+	-	-	-	-	-
D005	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D008	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D010	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D011	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D012	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D013	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D014	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D015	Tavuk döner	-	+	+	+	-	+	-	-	-
D016	Tavuk döner	-	+	+	+	-	+	-	-	-
D017	Tavuk döner	+	+	+	-	-	+	-	+	-
D018	Tavuk döner	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D019	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D020	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	+	-	-
D021	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	+	-	-
D022	Tavuk döner	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D023	Tavuk döner	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D024	Tavuk döner	+	+	-	+	-	-	-	-	-
D025	Tavuk döner	+	-	-	+	-	-	-	-	-
D026	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D027	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D028	Tavuk döner	+	-	-	+	-	-	-	-	-
D029	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	+	-	-
D030	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D031	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D032	Tavuk döner	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D033	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	+	-	-

EK-A (Devam1)

İzolat No.	İzolasyon kaynağı	SİM	MR	VP	Nitrat reduk.	Mannitol	α Metil Mannosit	Ksiloz	Ramnoz	Riboz
D034	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D035	Tavuk döner	+	+	+	+	-	+	-	+	-
D036	Tavuk döner	+	+	+	+	-	+	-	+	-
D037	Tavuk döner	+	+	-	+	-	+	-	+	-
D038	Tavuk döner	+	-	+	+	-	-	-	+	-
D039	Tavuk döner	+	+	+	-	-	+	-	+	-
D040	Tavuk döner	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D041	Tavuk döner	+	+	+	-	-	-	-	+	-
D042	Tavuk döner	+	+	+	-	-	+	-	+	-
D043	Tavuk döner	+	+	+	+	-	+	-	+	-
D044	Tavuk döner	+	+	+	-	-	+	-	+	-
D045	Tavuk döner	-	+	+	+	-	-	-	+	-
D046	Tavuk döner	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D047	Tavuk döner	-	+	-	+	-	-	-	-	-
D048	Tavuk döner	-	+	-	+	-	+	-	-	+
D049	Tavuk döner	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D050	Tavuk döner	+	-	-	+	+	-	-	-	-
D051	Tavuk döner	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D052	Tavuk döner	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D053	Tavuk döner	+	-	-	+	+	-	-	-	-
D054	Tavuk döner	-	-	-	+	+	-	-	-	-
D055	Tavuk döner	-	+	+	+	-	+	-	-	-
D056	Tavuk döner	+	+	+	+	-	+	-	-	-
B057	Hamburger	-	-	-	+	-	-	-	-	-
RSKK	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sabina MURSALOVA
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	
Fakülte	
Bölümü	
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	