T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİSTERİA MONOCYTOGENES'İN SALAMURA BEYAZ PEYNİR ÜRETİM HATTINDA KONTAMİNASYON KAYNAKLARININ BELİRLENMESİ VE PFGE METODU İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Nihat TELLİ

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ahmet GÜNER

KONYA-2012

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİSTERİA MONOCYTOGENES'İN SALAMURA BEYAZ PEYNİR ÜRETİM HATTINDA KONTAMİNASYON KAYNAKLARININ BELİRLENMESİ VE PFGE METODU İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Nihat TELLİ

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ahmet GÜNER

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102044 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2012

ÖNSÖZ

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte her an bilimsel yönlendirmeleriyle büyük yardımlarını gördüğüm, lisansüstü eğitimimde sürekli öğrenme düsturunu edinmemi sağlayan, heyecanımı canlı tutan, karşılaştığım problemleri çözmemde tavsiyeler sunan, deneyimlerini benimle paylaşan, akademik düşünmeyi öğreten, sürekli ilgi, sabır ve anlayış gösteren başta danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Ahmet GÜNER olmak üzere, çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen çok sevdiğim merhum meslektaşım Arş. Gör. Dr. Kürşat KAV'a, Yrd. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ'a, Yrd. Doç. Dr. Ferda SOYER'e, tezimi maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Projeler Koordinatörlüğü'ne, lisansüstü eğitimim boyunca maddi desteğini gördüğüm TUBİTAK-BİDEB 2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı'na, genotiplendirme çalışmalarında olanaklarından faydalanmamı sağlayan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ailemle her an yanımda olan nişanlım Arş. Gör. Arife Ezgi YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

	Onay Sayfası	i
	Önsöz	ii
	İçindekiler	iii
	Simgeler ve Kısaltmalar	v
	Çizelge Listesi	viii
	Şekil Listesi	ix
	Resim Listesi	x
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Tarihçe	2
1.2.	*Listeria* Türlerinin Taksonomisi	3
1.3.	*Listeria monocytogenes*'in Morfolojisi	4
1.4.	*Listeria monocytogenes*'in Biyokimyasal Özellikleri	6
1.5.	*Listeria monocytogenes*'in Gelişme Özellikleri	6
1.6.	*Listeria monocytogenes*'in Kaynakları	7
1.7.	*Listeria monocytogenes* Enfeksiyonunda Risk Grupları	8
1.8.	*Listeria monocytogenes*'in Patojenitesi	9
1.8.1.	*Listeria monocytogenes*'in Virülans Faktörleri	10
1.8.2.	*Listeria monocytogenes*'in Hücre İçi Yaşam Döngüsünde Etkili Faktörler	12
1.9.	*Listeria monocytogenes*'in Antibiyotik Duyarlılığı	12
1.10.	*Listeria monocytogenes*'in Oluşturduğu Hastalıklar	15
1.10.1.	Hayvanlarda Listeriozis	15
1.10.2.	İnsanlarda Listeriozis	16
1.11.	*Listeria monocytogenes*'in Gıdalarda Varlığı	18
1.11.1.	Sebze ve Meyvelerde *Listeria monocytogenes*	21
1.11.2.	Su Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*	21
1.11.3.	Et ve Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*	22
1.12.	Süt ve *Listeria monocytogenes*	24
1.13.	Peynir ve *Listeria monocytogenes*	26
1.14.	Salamura Beyaz Peynirlerde *Listeria monocytogenes*	29
1.15.	Salamura Beyaz Peynir Üretiminde *Listeria monocytogenes*'in Kontaminasyon Kaynakları	30
1.15.1.	Hammadde	32
1.15.2.	Pastörizasyon	32
1.15.3.	Alet-Ekipman	34
1.16.	*Listeria monocytogenes*'in Süt ve Ürünlerinden İzolasyon Teknikleri	34
1.16.1.	Kültürel Olmayan İzolasyon Metotları	34
1.16.2.	Kültürel İzolasyon Metotları	36
1.16.3.	Hızlı Teknikler	39
1.17.	*Listeria monocytogenes*'i Genotiplendirme Metotları	41
1.17.1.	Geleneksel Fenotipik Metotlar	41
1.17.2.	Moleküler Genotipik Metotlar	42
2.	**GEREÇ ve YÖNTEM**	51
2.1.	Gereç	51
2.1.1.	*Listeria monocytogenes*'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Gereçler ve Hazırlanışları	51

2.1.2. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonunda Gereçler ve Hazırlanışları 56
2.1.3. *Listeria monocytogenes* İzolatlarını Serotiplendirmede Gereçler ve Hazırlanışları 57
2.1.4. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının PFGE İle Genotiplendirilmelerinde Gereçler ve Hazırlanışları 58
2.1.5. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testi Gereçleri ve Hazırlanışları 59
2.1.6. Liyofilize Referans Suşlar 59
2.1.7. Liyofilize Referans Kültürlerin Aktive Edilmesi ve Stoklama 60
2.2. Yöntem 62
2.2.1. Numune Alım Metodu 62
2.2.2. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyonu 62
2.2.3. Örnek Hazırlama 63
2.2.4. Ön Zenginleştirme 64
2.2.5. İzolasyon 65
2.2.6. *Listeria monocytogenes*'in Biyokimyasal ve Fizyolojik İdentifikasyonu 65
2.2.7. İzolatların Muhafazası 70
2.2.8. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu 70
2.2.9. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Serotiplendirmeleri 71
2.2.10. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Genotiplendirmeleri 75
2.2.11. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri 82
2.2.12. İstatistiksel Analizler 83
3. BULGULAR 84
3.1. Kültürel İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları 84
3.2. PCR Bulguları 88
3.3. Serotiplendirme Bulguları 88
3.4. PFGE Bulguları 89
3.5. Antibiyotik Duyarlılık Bulguları 92
4. TARTIŞMA 96
4.1. Kültürel İzolasyon ve İdentifikasyon 96
4.2. PCR 99
4.3. Serotiplendirme 100
4.4. PFGE 101
4.5. Antibiyotik Duyarlılık 104
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 107
6. ÖZET 108
7. SUMMARY 109
8. KAYNAKLAR 110
9. ÖZGEÇMİŞ 122

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
aadA	Adenil Transferaz Gen
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACA	Akriflavin Seftazidim Agar
ActA	Aktin Transferaz Protein
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	Kazanılmış İmmun Yetmezlik Sendromu
Ami	Otolizin Amidaz
AMP	Adenozin Mono Fosfat
ampC	AmpC Beta Laktamaz Enzim
ApaI	*Acetobacter pasteurianus* sub. *pasteurianus* Restriksiyon Enzim Geni
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
ASLM	Al-Zorecky Sandine Listeria Medium
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
a_w	Su Aktivitesi
β	Beta
BetL	Basal Endosfer Transfer Layer Protein
bp	Baz Çifti
bsh	Safra Tuzu Hidrolaz Proteini
C	Santigrat
Ca^{+2}	Kalsiyum
CAMP	Christe Atkins Munch Peterson
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CFSAN	Center for Food Safety and Applied Nutrition
clpE	ATP Bağlı Clp Proteaz
CmIA	Kloramfenikol Rezistans Geni
dATP	Deoksi Adenozin Trifosfat
dCTP	Deoksi Sitidin Trifosfat
dGTP	Deoksi Guanozin Trifosfat
dNTP	Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dTTP	Deoksi Timidin Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EcoRI	*Escherichia coli* Restriksiyon Enzim Geni
ereA	Eritromisin Esteraz Rezistans Gen A
ereB	Eritromisin Esteraz Rezistans Gen B
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ermB	Eritromisin Rezistans Geni
FAO	Food and Agriculture Organization
FAT	Fluorescence Antibody Technique
Fbp	Fibrinonektin Bağlı Protein
FDA	Food and Drug Administration
floR	Florfenikol Rezistans Geni
FSIS	Food Safety and Inspection Service
g	Gram
γ	Gama
H	Flagellar Antijen
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
H_2S	Hidrojen Sülfür
hgf	Hepatosit Büyüme Faktörü
hly	Hemolizin Geni
hpt	Heksoz Fosfat Taşıyıcı
IDF	International Dairy Federation

IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IMS	Immuno Magnetic Separation
InIA	Internalin A
InIB	Internalin B
ISO	International Standardization Organization
IU	International Units
kb	Kilobaz
kob	Koloni Oluşturan Birim
λ	Lambda
l	Litre
LLO	Listeriolizin O
lmaA/dthl8	Gecikmiş Tip Hipersensitivite Proteini
Lmo0733	Transkripsiyon Düzenleyici Proteini
LPM	Lithium Chloride Phenylethanol Moxolactam
M	Molar
mb	Megabaz
M.Oxford	Modify Oxford
MEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
µg	Mikrogram
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
MİD	Minimal İnfektif Doz
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MLST	Multi Locus Sequence Based Typing
mg	Miligram
µm	Mikrometre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MMA	Modify McBride's Agar
Mod.V.J	Modify Vogel Johnson
Mpl	Metalloproteaz
MR-VP	Metil Red-Voges Proskauer
mw	MegaWatt
NaCl	Sodyum Klorür
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standarts
Not1	*Nocardia otitidis caviarum* Restriksiyon Enzim Geni
NO_2	Nitrat
O	Somatik antijen
OD	Optik Dansite
OpuB	Ozmoprotektan Protein B
OpuC	Ozmoprotektan Protein C
PALCAM	Polymixin Acriflavin Lithium Chloride Ceftazidime Eskulin Mannitol
PC-PLC	Fosfatidilkoline Spesifik Fosfolipaz C
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
penA	Penisilin Bağlı Protein A
pepC	Peptidaz C
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH	Power of Hydrogen
PI-PLC	Fosfatidilinositole Spesifik Fosfolipaz C
plcA	Fosfolipaz A
plcB	Fosfolipaz B
PrfA	Pozitif Düzenleyici Faktör A
RAPAMY	Acriflavin Phenylethanol Esculin Mannitol Egg Yolk Emulsion

RAPD	Randomly Amplified Polimorphic DNA
rDNA	Rekombinant DNA
REA	Chromosomal DNA Restriction Endonuclease Analysis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Rounds per minute
rRNA	ribozomal RNA
rRNB	Ribozomal Operon Klonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SLCC	Spesiyal *Listeria* Kültür Koleksiyon
SmaI	*Serratia marcescens* Restriksiyon Enzim
sn	Saniye
SRFA	Selective Restriction Fragment Amplification
LSP	Low Melt Agaroz Sodyum Dodesil Sülfat Proteinaz K
StrA	Streptomisin Rezistans Gen A
StrB	Streptomisin Rezistans Gen B
su1I	Sülfonamid Rezistans Gen
TBE	Tris Borate EDTA
TetA	Tetrasiklin Rezistans Gen A
TetB	Tetrasiklin Rezistans Gen B
TetC	Tetrasiklin Rezistans Gen C
TetD	Tetrasiklin Rezistans Gen D
TetE	Tetrasiklin Rezistans Gen E
TetG	Tetrasiklin Rezistans Gen G
TS	Türk Standardı
TSB	Tryptic Soy Broth
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair Group Method
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultra Viyole
VanA	Vankomisin Rezistans Gen A
VanB	Vankomisin Rezistans Gen B
V	Volume
WHO	World Health Organization
~	Yaklaşık
%	Yüzde
>	Büyük

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1	*Listeria monocytogenes* Taksonomisinin Tarihsel Gelişimi	2
Çizelge 1.2	*Listeria monocytogenes* Serotiplerinin Sahip Oldukları Somatik (O) ve Flagellar (H) Antijenler	4
Çizelge 1.3	*Listeria* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri	6
Çizelge 1.4	*Listeria monocytogenes*'in Gelişme Koşulları	7
Çizelge 1.5	İnsanlarda Listeriozis Bulgularında Yaş ve Bağışıklık Durumu	18
Çizelge 1.6	Sporadik ve Epidemik *Listeria monocytogenes* Vakaları	20
Çizelge 1.7	Et ve Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* İnsidensi	23
Çizelge 1.8	Çiğ Sütlerde *Listeria monocytogenes* İnsidensi	25
Çizelge 1.9	Peynir Mikrobiyolojik Kriterleri	27
Çizelge 1.10	PCR Uygulamalarında Kullanılan *Listeria monocytogenes* Hedef Gen Bölgeleri	36
Çizelge 1.11	*Listeria* izolasyonunda kullanılan besiyerleri ve içerdikleri selektif maddeler	37
Çizelge 2.1	Numune Alınan Noktalar	51
Çizelge 2.2	*Listeria monocytogenes*'in Karbonhidrat Fermentasyon Reaksiyonları	69
Çizelge 2.3	*Listeria monocytogenes*'in CAMP Testi Hemoliz Reaksiyonları	70
Çizelge 2.4	*Listeria monocytogenes*'in O ve H Antijenlerinin Aglutinasyon Oluşturduğu Antiserumlar	74
Çizelge 2.5	Numune Sayısına Göre LSP Solüsyonu Bileşenlerinin Oransal Miktarları	76
Çizelge 2.6	Numune Sayısına Göre Lizis Solüsyonu Bileşenleri Miktarı	77
Çizelge 2.7	Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapları	82
Çizelge 3.1	*Listeria* spp. İzolatlarının İşletmelere Göre Dağılımı	85
Çizelge 3.2	İşletmelerin Salamura Beyaz Peynir Üretim Hattının Farklı Noktalarından Elde Edilen *Listeria* spp. İzolatları	87
Çizelge 3.3	İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Analiz Sonuçları	92

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	*Listeria monocytogenes*'in Mikroskobik Görüntüsü	5
Şekil 1.2	*Listeria monocytogenes*'in Kontaminasyon Kaynakları	7
Şekil 1.3	Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000-2004 Yıllarında Görülen Listeriozis Vakaları	8
Şekil 1.4	*Listeria monocytogenes*'in Hücre İçi Yaşam Döngüsü Şeması	9
Şekil 1.5	Listeriozis Döngüsü	16
Şekil 1.6	İnsanlarda Listeriozis Komplikasyonları	17
Şekil 1.7	Salamura Beyaz Peynir Üretim Akış Şeması	31
Şekil 1.8	Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemi Aşamaları	46
Şekil 2.1	*Listeria monocytogenes*'in İzolasyon ve İdentifikasyon Aşamaları	62
Şekil 2.2	PCR ile Moleküler İdentifikasyonda Thermal Cycler Koşulları	72
Şekil 2.3	*Listeria monocytogenes* İzolatlarının Genotiplendirme Metodu Aşamaları	75
Şekil 3.1	İzolatların *Listeria* Türlerine Göre Oranları	84
Şekil 3.2	*Listeria* spp. İzolatlarının Numune Noktalarına Göre Dağılımı	85

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1	Pyrex Şişelere Dağıtılmış Listeria Enrichment Brothlar	52
Resim 2.2	Oxford, Kanlı ve Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'ın Buzdolabında Muhafazası	52
Resim 2.3	Tryptone Soya ve Brain Heart Infusion Yatık Agarları	54
Resim 2.4	Liyofilize Referans Suşlar	60
Resim 2.5	Referans Suşların Brain Heart ve Tryptic Soy Brothlarda Pasajlanması	60
Resim 2.6	Tryptone Soya ve Brain Heart Infusion Agar Besiyerlerinde Üremiş Referans Suşlar	61
Resim 2.7	Referans Suşların Yatık Agarlarda Muhafazası	61
Resim 2.8	Örnek Hazırlama İşlemleri	63
Resim 2.9	Örnek Aktarılmış Listeria Enrichment Brothlar	63
Resim 2.10	Örneklerin Suplementsiz Listeria Enrichment Brothlarda Selektif Olmayan Ön Zenginleştirmeleri	64
Resim 2.11	Örneklerin Suplement İlave Edilmiş Listeria Enrichment Brothlarda Selektif Ön Zenginleştirmeleri	64
Resim 2.12	Oxford ve Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'da *Listeria* Şüpheli Kolonilerin Görüntüleri	65
Resim 2.13	*Listeria* Şüpheli Kolonilerin Gram Boyama Mikroskobik Görüntüsü	66
Resim 2.14	Sulfate Indole Motility Medium Besiyerinde Şemsiye Görünümünde Üremeler	67
Resim 2.15	Kanlı Agarda Hemoliz Görüntüsü	68
Resim 2.16	Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	69
Resim 2.17	CAMP Testi Reaksiyonları	69
Resim 2.18	Boncuklu Eppendorf Tüplerde Brucella Broth Saklama Besiyeri	70
Resim 2.19	Jel Döküm Ünitesi	79
Resim 2.20	Pulsed Field Elektrofez Sistemi Cihazı	79
Resim 2.21	Jel Görüntüleme Sistemi	80
Resim 2.22	İzolatların Bant Aralıklarının Seçimi	81
Resim 2.23	İzolatların Dendogram Bant Profillerinin Oluşturulması	81
Resim 3.1	Spesifik *hly* Geni İçeren Amplifiye DNA Örneklerinin U.V Transilluminatör Görüntüsü	88
Resim 3.2	AscI Enzimi Kullanılarak Elde Edilen U.V Transilluminatör Görüntüsü	89
Resim 3.3	ApaI Enzimi Kullanılarak Elde Edilen U.V Transilluminatör Görüntüsü	90
Resim 3.4	AscI Enzim Uygulamalı PFGE Dendogram Profilleri	91
Resim 3.5	ApaI Enzim Uygulamalı PFGE Dendogram Profilleri	91
Resim 3.6	A İşletmesi Duvar-Zemin Numunesinden Elde Edilen *Listeria monocytogenes* İzolatı Antibiyogram Görüntüsü	93
Resim 3.7	A İşletmesi Baskı Kasaları Numunesinden Elde Edilen *Listeria monocytogenes* İzolatı Antibiyogram Görüntüsü	94
Resim 3.8	C İşletmesi Çiğ Süt Numunesinden Elde Edilen *Listeria monocytogenes* İzolatı Antibiyogram Görüntüsü	95

1. GİRİŞ

Listeria monocytogenes, ciddi halk sağlığı problemleri oluşturan patojen bir bakteridir. *L. monocytogenes*'le kontamine gıdaların tüketimiyle ortaya çıkan listeriozisde insidens düşük olmasına karşın mortalite yüksektir. Listeriozisde en sık rastlanan klinik tablo diyare olmakla birlikte bakteriyemi, menenjit, endokardit, osteomiyelit ya da pnömoni şekillenebilmektedir. Santral sinir sisteminin etkilendiği vakalarda, ağır sekeller veya yüksek oranda mortalite görülmektedir (Kampelmacher 1988, WHO/FAO 2004, Painter ve Slutsker 2007).

Gıda kaynaklı listeriozisde, et ve ürünleri ile süt ve ürünleri kaynak olarak bildirilmesine karşın, sütün tamponlayıcı etkisi *L. monocytogenes*'i inhibitör faktörlere karşı koruduğundan, süt ve ürünlerinden kaynaklanan listeriozis vakaları daha sık görülmektedir (Yıldırım ve Sarımehmetoğlu 2006).

Türkiye'de en fazla üretilen ve tüketilen peynir çeşidi olan beyaz peynir, üretiminde mikrobiyolojik kalitesi düşük sütün kullanılması, pastörizasyon işlemlerinin etkin bir şekilde uygulanmaması ve yumuşak bir peynir türü olmasından dolayı Türkiye'de beyaz peynir kaynaklı listeriozis vakalarına sıklıkla rastlanılmaktadır (Gönç ve Kılıç 2002, Sancak ve ark 2002, Coşkun 2006).

Günümüze kadar çeşitli gıda maddelerinde yapılan birçok çalışmada genellikle *L. monocytogenes*'in insidensi araştırılmıştır. Halbuki listeriozis vakalarına ve/veya salgınlarına sebep olan başlıca gıdalarda olduğu gibi salamura beyaz peynirlerde de, bakterinin epidemiyolojisini ortaya koyacak genotiplendirme çalışmalarının, gıda sektöründe faaliyet gösteren işletmeler ve tedavi hekimliği açısından daha özgün ve değerli sonuçlar vereceği açıktır.

Bu araştırmada, listeriozise neden olan dominant genotiplerin belirlenmesi amacıyla salamura beyaz peynir üretim hattından elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tekniğiyle genotiplendirilmesi gerçekleştirildi.

1.1. Tarihçe

L. monocytogenes, önceleri *Bacillus hepatis*, *Bacterium monocytogenes*, *Listerella hepatolytica*, *Listerella hominis*, *Listerella monocytogenes*, *Corynebacterium pavvulum*, *Listerella ovis*, *Erysipelothrix monocytogenes* olarak (Çizelge 1.1) adlandırılmıştır (Gray ve Killinger 1966).

Bakteri ilk olarak 1891 yılında Fransa'da Hayem, 1893 yılında Almanya'da Henle tarafından insan dokularında tespit edilmiştir (Gray ve Killinger 1966, Özmen 2006).

Hülpers 1911 yılında, İsveç'te bakteriyi tavşan ciğerinden izole ederek *Bacillus hepatis* olarak adlandırmıştır. Murray ve arkadaşları, 1926 yılında Cambridge'de laboratuar tavşanları ve yaban domuzlarında görülen septik bir hastalıkta monositoz tablosu izlediklerinden etkene *Bacterium monocytogenes* adını vermişlerdir (Kampelmacher 1988, Özçelik 1994, Wagner ve McLauchlin 2008).

Çizelge 1.1. *Listeria monocytogenes* Taksonomisinin Tarihsel Gelişimi.

Yıl	Araştırmacı	Yer	İsimlendirme	Etken kaynağı
1891	Hayem	Fransa	-	İnsan
1893	Henle	Almanya	-	İnsan
1911	Hülpers	İsveç	*Bacillus hepatis*	Tavşan
1926	Murray ve ark.	Cambridge/İngiltere	*Bacterium monocytogenes*	Tavşan, Domuz
1927	Pirie	Güney Afrika	*Listerella hepatolytica*	Gerbil
1927	Leningham	Londra/İngiltere	*Listerella monocytogenes*	-
1929	Nyfeld	Danimarka	*Listerella hominis*	İnsan
1937	Gill	Yeni Zelanda	*Listerella ovis*	Koyun
1940	Pirie	-	*Listeria monocytogenes*	-

Pirie 1927 yılında Güney Afrika'da gerbil karaciğerinden izole ettiği bakteriyi Güney Afrika Araştırma Enstitüsü Başkanı Dr. Spencer Lister'in onuruna *Listerella hepatolytica* olarak adlandırmıştır (Gray ve Killinger 1966, Rocourt ve Buchrieser 2007, Wagner ve McLauchlin 2008). Pirie ve Murray, izole ettikleri bakterileri, Londra'daki Lister Enstitüsü Ulusal Kültür Koleksiyonu'na göndermişlerdir. Dr. Leningham, bu iki bakterinin benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir. Bunun üzerine bakteri *Listerella monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Nyfeld, Danimarka'da 1929 yılında, hasta insanların kanından elde ettiği bakteriyi *Listerella hominis* ismiyle nitelendirmiştir. Gill, 1937 yılında Yeni Zelanda'da, koyunlarda ensefalitis ile seyreden dönme hastalığında izole ettiği etkeni *Listerella*

ovis olarak adlandırmıştır (Gray ve Killinger 1966, Rocourt ve Buchrieser 2007, Wagner ve McLauchlin 2008).

Listerella cins ismi, Arthur Lister'e ithafen başka bir protozoon isimlendirilmesinde kullanıldığından, Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology 1939 yılında, isim benzerliğinin değiştirilmesi gerektiğini bildirmiştir. Bunun üzerine Pirie, 1940 yılında *Listeria monocytogenes* adının kullanılmasını önermiştir. Bu isimlendirme, günümüze kadar gelmiştir (Bilgehan ve Serter 1978, Kampelmacher 1988, Peiris 2005, Özmen 2006).

1.2. *Listeria* Türlerinin Taksonomisi

Listeria türleri Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de spor oluşturmayan, Gram pozitif, düzgün çubuk bakteriler grubunda yer almaktadır. Bu grup içinde yedi cins (*Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix, Brochothrix, Renibacterium, Kurthia, Caryophanon*) bulunmaktadır. Bu grubun başlıca özellikleri arasında düşük guanin/sitozin oranı, mikolik asit yokluğu ve lipoteikoik asit varlığı sayılabilir (Holt ve ark 1994).

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin dokuzuncu sayısında yapılan taksonomide, *Listeriaceae* familyasında *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri, L. grayi* ve *L. murrayi* olmak üzere yedi tür bulunduğu belirtilmektedir (Holt ve ark 1994). Moleküler biyolojik ve filogenetik analizler sonucu, *L. murrayi*'nin *L. grayi* ile özdeş ve *Listeria* soyu içerisinde altı türün olduğu saptanmıştır. Bu türler; *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri* ve *L. grayi*'dir. *L. grayi* ve *L. ivanovii*'nin her ikisi de ikişer alt tür içermektedir (Holt ve ark 1994, Hitckins 2003).

Listeria soyunda sadece *L. monocytogenes* insan listeriozisleri ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte; *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* de seyrek olarak saptanmıştır. Somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerin faktör antiserumları ile yapılan serotiplendirmede 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 olmak üzere *L. monocytogenes*'in 13 serotipi (Çizelge 1.2) olduğu saptanmıştır. Özellikle 4b, daha az olarak da 1/2a ve 1/2b serotipleri insan listeriozisine neden olan dominant serotipler olarak önem kazanmıştır (Hitckins 2003, Koçan ve Halkman 2006, Erol 2007).

DNA/DNA hibridizasyon çalışmalarıyla, genetik yakınlıkları ve evrimsel özellikleri dikkate alınarak, *L. monocytogenes* serotipleri üç soy grubuna ayrılmıştır. Buna göre 1/2a, 1/2c, 3a ve 3c serotipleri Grup I'de, 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e ve 7

serotipleri Grup II'de, 4a ve 4c serotipleri Grup III'de yer almaktadır. Bunun yanı sıra her bir soy grubu kendi içinde iki gruba ayrılmıştır. Grup Ia 1/2a ve 3a, Grup Ib 1/2c ve 3c, Grup IIa 4b, 4d, ve 4e, Grup IIb 1/2b, 3b ve 7, Grup IIIa 4a, Grup IIIb 4c serotiplerinden oluşmuştur (Rocourt ve Buchrieser 2007).

Çizelge 1.2. *Listeria monocytogenes* Serotiplerinin Sahip Oldukları Somatik (O) ve Flagellar (H) Antijenler (Buxton ve Fraser 1977).

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

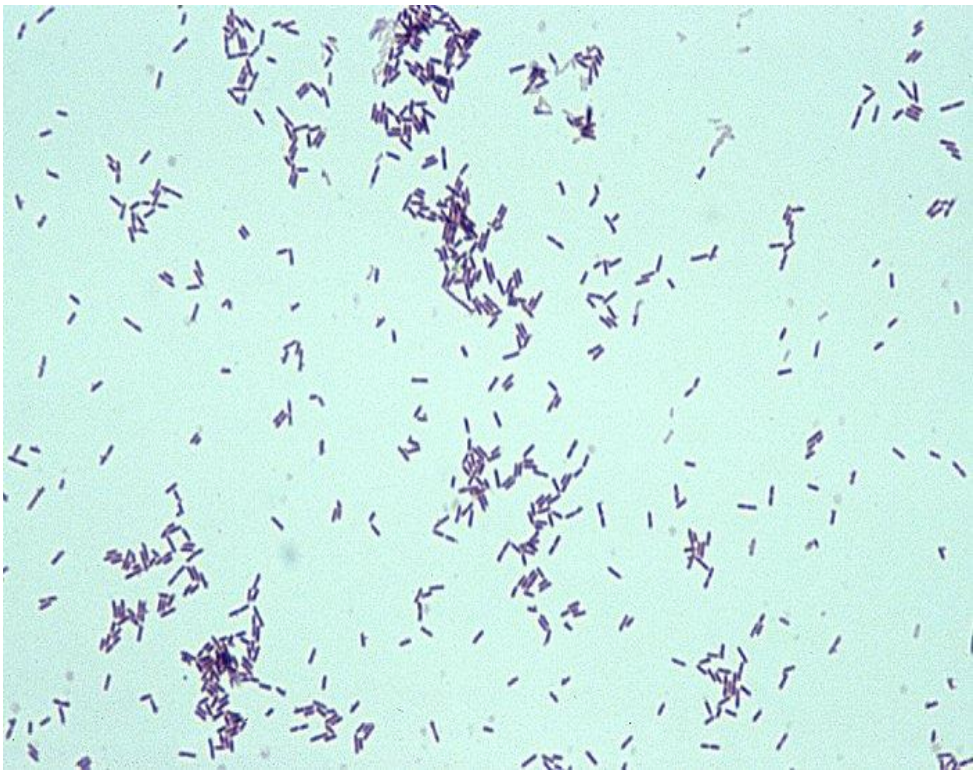
1.3. *Listeria monocytogenes*'in Morfolojisi

Listeria türlerinin hepsi mikroskobik görüntüleri bakımından benzerlik göstermektedir. *Listeria* kolonileri 0,5-1,5 mm çapında, yuvarlak, yarı saydam, hafif konveks, keskin kenarlı ve kristal merkezli renksiz şekildedirler. Koloniler, Nutrient Agar üzerinde dışbükey, saydam, dikey ışıkta mavimsi gri, eğik ışıkta karakteristik parlak mavi-yeşil görünürler. Yapışkan özellikte olduğundan, besiyerlerinden izolasyon ve identifikasyon amaçlı yapılacak ayırma oldukça güçtür. Eskimiş kolonilerin çapı 3-5 mm'ye kadar genişleyebilir ve daha opak bir yapıdadır (Holt ve ark 1994, Kum 2009).

L. monocytogenes, fakültatif anaerob, Gram pozitif, sporsuz bir bakteridir. 0,4-0,5 µm eninde, 0,5-2 µm boyunda yuvarlak uçlu çubuklar veya kokobasil şeklindedir. Farklı boyama yöntemleri kullanılsa da en iyi Gram ve Giemsa metotları ile boyanmaktadır. Yeni kültürlerde Gram pozitif olmakla beraber eskimiş kültürlerden yapılan boyamalarda Gram pozitif özelliği değişkenlik göstermektedir (Özçelik 1994, Wagner ve McLauchlin 2008).

Mikroskobik incelemede, genç kültürler tek tek ya da 3-4 hücreden oluşan kısa zincirli kokobasil halinde (Şekil 1.1) görülürler. Bunun yanı sıra uzun eksen boyunca dizilmiş gruplar halinde ve hücrelerin uçlarının birbirine değmesi ile V veya Y şeklinde Çin alfabesindeki harflere benzer şekilde görülmektedirler. Eski kültürlerde, 6-20 µm boyunda flamentöz formda bulunabilirler (Koçan ve Halkman 2006, Wagner ve McLauchlin 2008).

Sayıları bir ile beş arasında değişen peritrik flagellaları sayesinde 25°C'de hareketli olmasına karşın, 37°C'de flagella gelişimi çok zayıf olduğundan hareketsiz gibi görülebilir. Yarı katı besiyerinde tipik şemsiye ya da çam ağacı görünümündedir. Faz kontrast mikroskopta yapılan incelemede, takla hareketi sergilemektedir (Özçelik 1994, Gailunas 2003, Hitchins 2003, Wagner ve McLauchlin 2008).



Şekil 1.1. *Listeria monocytogenes*'in Mikroskobik Görüntüsü (Bacterioweb 2011).

1.4. *Listeria monocytogenes*'in Biyokimyasal Özellikleri

Listeria türlerinin hücre yüzeyi yapısı diğer Gram pozitif bakterilere benzerlik göstermektedir. Hücre yüzeyi çoğunlukla peptidoglikan, teikoik asit ve lipoteikoik asitlerden oluşmaktadır. Teikoik asit bileşenlerinin hücre duvarının %20'sini oluşturduğu ve bu asidin N-asetilglikozamin, ramnoz, ribitol ve fosfor içerdiği ifade edilmiştir (Wagner ve McLauchlin 2008, Kum 2009).

L. monocytogenes'in oldukça değişken biyokimyasal aktivitesi diğer türlerden ayırt etmede çok önemlidir (Çizelge 1.3). Genellikle çoğu besiyerinde kolaylıkla üreyebilmesine karşın gelişmesi için bazı B grubu vitaminlere (örn., biotin, riboflavin, tiamin, tioktik asit) ve aminoasitlere (örn., sistein, glutamin, izolöysin, löysin, valin) ihtiyaç duymaktadır. Katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir. Glikozdan laktik asit üretir. Bazı karbonhidratları (örn., glikoz, ramnoz, maltoz, mannoz, salisin, fruktoz, dekstrin ve nişasta) yalnızca asit oluşturarak fermente etmesine karşın, ksiloz, mannitol, dulsitol, inulin, inositol, adonitol ve rafinozu fermente edemez. İndol, üre, nitrat ve H_2S negatif, Metil-Red ve Voges-Proskauer (MR-VP) pozitiftir. Eskulini hidrolize eder ve kanlı agarda β-hemoliz yapar (Hampikyan 2006, Wagner ve Mclauchlin 2008).

Çizelge 1.3. *Listeria* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri (Wagner ve Mclauchlin 2008).

	β-hemoliz	Mikroskopta Hareket	CAMP (*S. aureus*)	CAMP (*R. Equi*)	Besiyerinde Hareket	Katalaz	Oksidaz	Üre	Glikoz	Eskulin	MR-VP	NO_2	Mannitol	Ksiloz	Ramnoz
L. monocytogenes	+	+	+	-	+	+	-	-	+/-	+	+/+	-	-	-	+
L. seeligeri	+	+	+	-	+	+	-	-	+/-	+	+/+	-	-	+	-
L.ivanovii	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+/+	-	-	+	-
L.innocua	-	+	-	-	+	+	-	-	+/-	+	+/+	-	-	-	+/-
L. grayi	-	+	-	-	+	+	-	-	+/-	+	+/+	-	+	-	-
L. welshimeri	-	+	-	-	+	+	-	-	+/-	+	+/+	-	-	+	+/-

+ : pozitif reaksiyon. - : negatif reaksiyon. +/- : değişken reaksiyon. +/+ : pozitif/pozitif reaksiyon.

1.5. *Listeria monocytogenes*'in Gelişme Özellikleri

L. monocytogenes aerobik, mikroaerofilik veya fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilir. Oldukça geniş pH aralığında (3,0-9,5) gelişebilmesinin yanı sıra optimum 6,0-8,0 pH'da gelişir. Geniş sıcaklık değerleri arasında (-0,1-45°C) gelişebilen bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 30-37°C'dir (Gailunas 2003, Rocourt ve Buchrieser 2007, Wagner ve Mclauchlin 2008).

L. monocytogenes halotolerant bir bakteridir. Bakterinin %10-12 NaCl varlığında çoğalabildiği ve %25,5 NaCl içeren ortamda 4°C'de aylarca canlı kalabildiği saptanmıştır. Gelişebildiği su aktivitesi değerleri optimum 0,97, minimum 0,92'dir (Çizelge 1.4) (Gailunas 2003, Wagner ve Mclauchlin 2008).

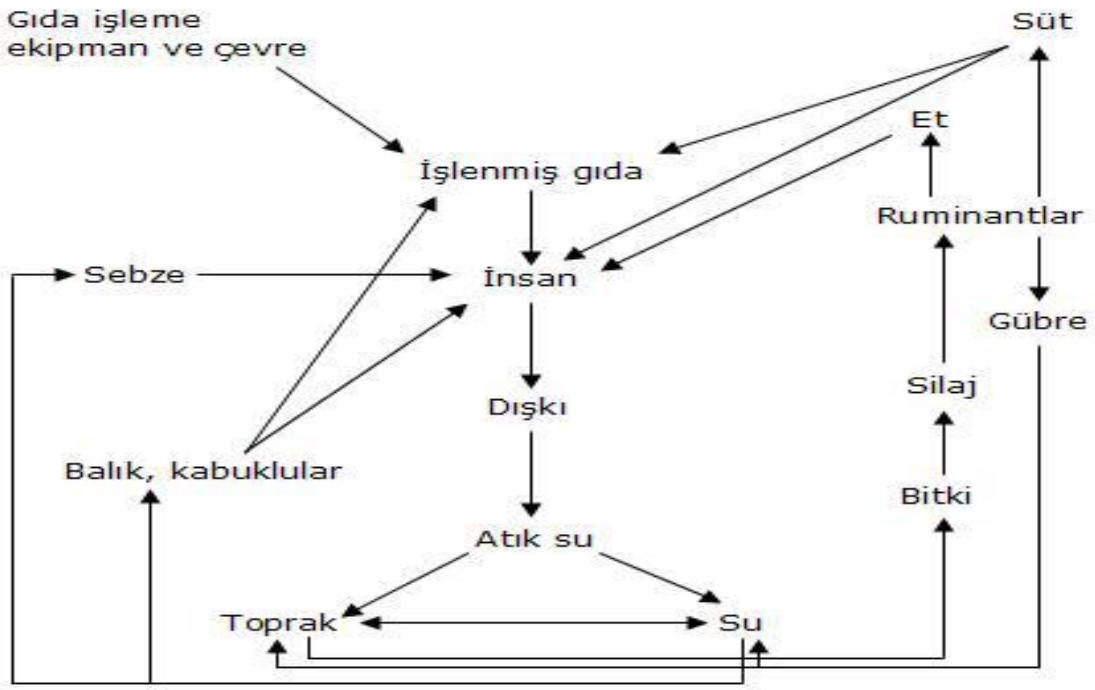
L. monocytogenes'in çevresel stres faktörlerine (örn., pH, sıcaklık, tuz) karşı dirençliliği artıran proteinler (örn., BetL, Bsh, OpuB, OpuC) sentezlediği bilinmektedir. Bu proteinlerin *L. monocytogenes*'in canlılığını sürdürebilmesi üzerine de olumlu etkileri bulunmaktadır (Wagner ve McLauchlin 2008, Kum 2009).

Çizelge 1.4. *Listeria monocytogenes*'in Gelişme Koşulları (Rocourt ve Buchrieser 2007, Wagner ve Mclauchlin 2008).

Faktör	Minimum	Optimum	Maksimum
Sıcaklık (°C)	-0,1	30-37	45
pH	3,0	6,0-8,0	9,5
Su aktivitesi (a_w)	0,92	0,97	-

1.6. *Listeria monocytogenes*'in Kaynakları

L. monocytogenes'in kontaminasyon kaynakları; toprak, su, hava, bitki, yem, gübre, hayvan, insan, kanalizasyon atıkları, işleme ekipmanları, ingrediyenler, katkı maddeleri ve ambalaj materyalleri olabilmektedir (Şekil 1.2) (Banwart 1983, Erol 2007).



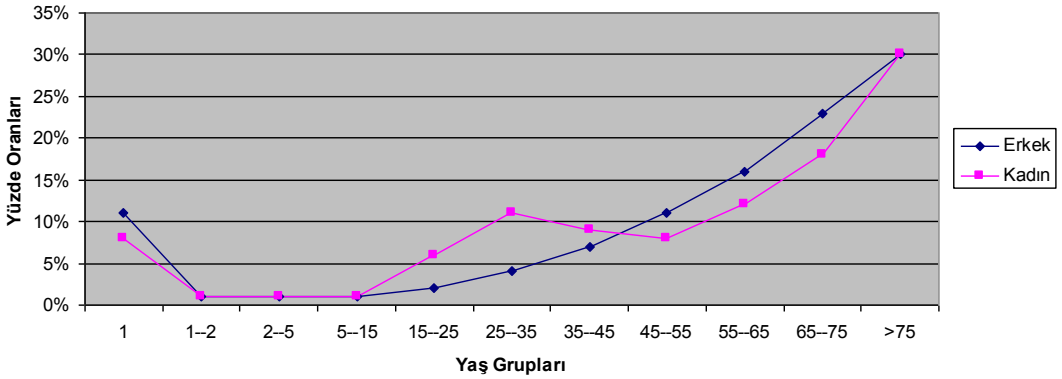
Şekil 1.2. *Listeria monocytogenes*'in Kontaminasyon Kaynakları (Erol 2007).

L. monocytogenes'in doğada yaygın (ubiquiter) halde bulunması, gıdalara kontaminasyon olasılığını artırmaktadır (Uhitil ve ark 2004). *L. monocytogenes* toprakta 2-6 ay, sütte 12 ay, koyun dışkısında 3 ay, sığır dışkısında 16 ay ve çeşitli gıda maddelerinde 5-26 ay canlı kalabilmektedir (WHO/FAO 2004, Koçan ve Halkman 2006, Sauders ve Wiedmann 2007).

1.7. *Listeria monocytogenes* Enfeksiyonunda Risk Grupları

L. monocytogenes'le enfekte bireylerin pek çoğunda hastalık belirtileri gözlenmemektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, *L. monocytogenes*'in kanda bulunması durumunda, büyük oranda karaciğer ve az oranda da dalak tarafından yıkımlandığı belirtilmiştir (Bahk ve Marth 1990). Bakterinin karaciğer tarafından yıkımlanmasında, yerleşik doku makrofajları görev yapmaktadır. Mononükleer fagositler, peritoneal makrofajlar ve polimorfnükleer lökositler de *L. monocytogenes*'in yıkımlanmasında rol oynamaktadırlar. Enfekte organizmada *L. monocytogenes*'e karşı üretilen antikor, komplementin de yardımıyla fagositozu gerçekleştirmekte (Bahk ve Marth 1990) ancak enfeksiyonun klinik belirtilere neden olması bireylerin bağışıklık sisteminin zayıflığıyla ilişkili olmaktadır (Painter ve Slutsker 2007).

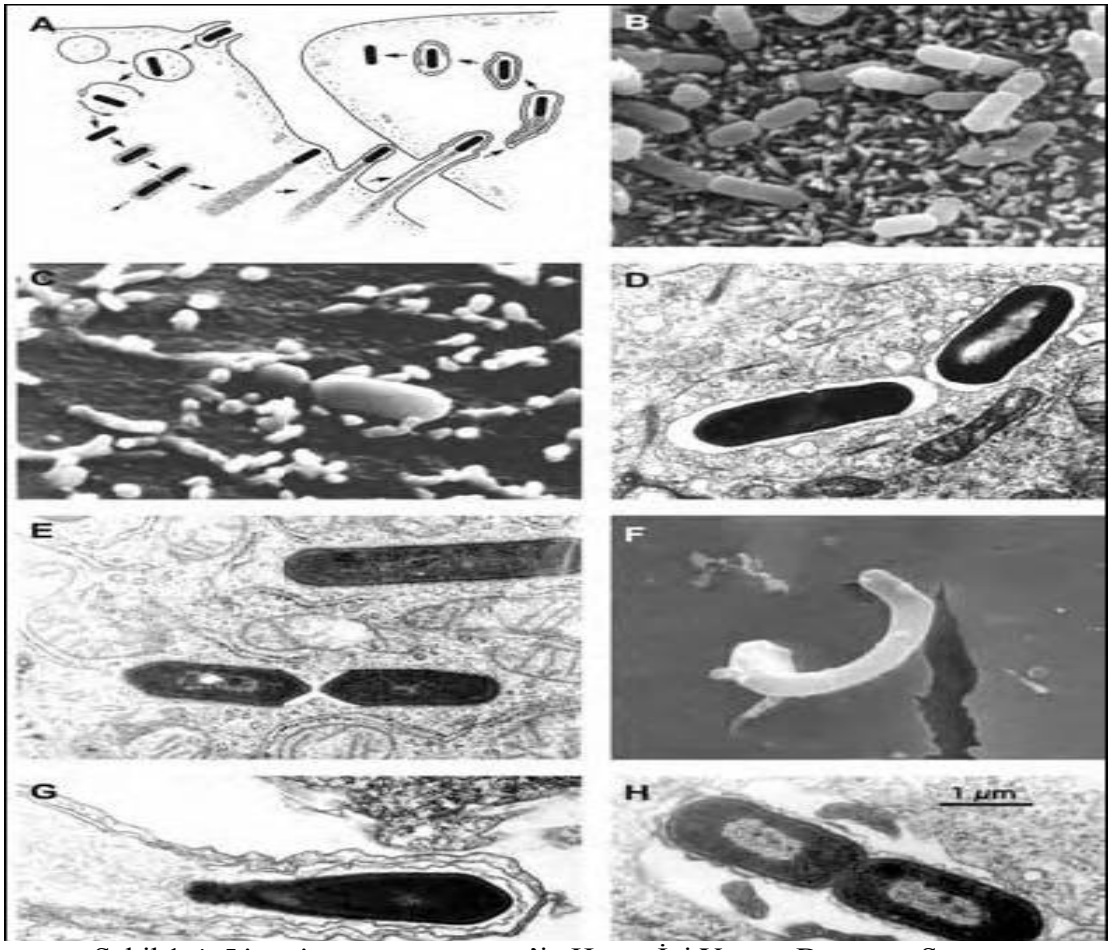
İnsanlarda görülen listeriozis vakalarında hamileler, yenidoğanlar, yaşlılar, bazı hastalıklar (örn., AIDS, lenfoma) neticesinde bağışıklık sistemleri etkilenmiş bireyler, immünsüpresif ilaçlarla bağışıklık sistemleri baskılanan transplant alıcıları ve malign tümörlü hastalar mortalite oranlarının yüksek olduğu risk gruplarıdır (Painter ve Slutsker 2007, Erol 2007, Liu 2008). Bu risk gruplarının yanı sıra yaş ve cinsiyetinde (Şekil 1.3) listeriozis görülme sıklığını etkilediği bildirilmiştir.



Şekil 1.3. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000-2004 Yıllarında Görülen Listeriozis Vakaları (Painter ve Slutsker 2007).

1.8. *Listeria monocytogenes*'in Patojenitesi

L. monocytogenes'in konak hücre içine girmesi, vakuollerden etkilenmemesi, sitozollerde çoğalabilmesi ve hücrelere dağılabilmesi (Şekil 1.4) patojenitesinde önem arz etmektedir. *L. monocytogenes*, epitel hücrelerine ve diğer hücrelere etkin bir şekilde girebilmek için sırasıyla internalin A (InlA) ve internalin B (InlB), konak hücresi içine girdikten sonra vakuollerden korunabilmek için listeriolizin O (LLO) ve fosfolipaz C sentezlemektedir. Bunun yanı sıra hücre içi ve hücreler arası taşınmayı sağlamak için de aktin transferaz protein (ActA) ve metalloproteaz (Mpl) sentezlediği bilinmektedir. Bu invazyon ve virülans bağlantılı proteinler, konak bağışıklık sisteminin hedef olarak kabul ettiği yapılardır (Wagner ve McLauchlin 2008, Kum 2009).



Şekil 1.4. *Listeria monocytogenes*'in Hücre İçi Yaşam Döngüsü Şeması (Kuhn ve Goebel 2007).

(A) *Listeria monocytogenes*, (B) Yüzeye tutunma, (C) Giriş, (D) Vakuol İçinde Bakteri, (E) Sitoplazmada serbest haldeki bakteri, (F ve G) Hareketli bakteriyel uzantılar, (H) Çift membranlı vakuol yapısında bulunan yan yana hücrelerdeki bakteri.

L. monocytogenes'in β-listeriolizin adı verilen protein yapısında toksik bir hemolizin üretimine bağlı olarak patojenite gösterdiği bilinmektedir. β-listeriolizin,

hücrelerin sitoplazmik membranlarında porlar açarak geçirgenliklerini bozmakta ve parçalanmalarına neden olmaktadır. Doku ve kırmızı kan hücrelerini lize ederken, siklik AMP üretimini de teşvik etmektedir (Çağlar ve ark 2000, Kuhn ve Goebel 2007). *L. monocytogenes*, bağırsak mukozasına yerleştikten sonra β-listeriolizin üreterek, karaciğer ve dalak makrofajlarında çoğalır. β-listeriolizin, bağırsak mukozasına yerleşme aşamasında bağırsak hareketlerini yavaşlatmasının yanı sıra gebelikte uterus kasına etki ederek prematüre doğumlara neden olabilmektedir. *L. monocytogenes*'in kültür ortamlarında da tripsine duyarlı, termolabil ve antijenik karakterde β-listeriolizin sentezlediği bilinmektedir. β-listeriolizin ile lipaz üretimi arasında bir ilişki olduğu ve sadece virulent suşların lipolitik olduğu belirtilmektedir (Koçan ve Halkman 2006).

β-listeriolizin dışında diğer patojenite faktörleri; demir konsantrasyonu, intraselüler üreme kapasitesi, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, katalaz ve yüzey bileşikleridir (Çağlar ve ark 2000, Kuhn ve Goebel 2007). Katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri, intraselüler yaşam için gereklidir. Bütün suşlarda tespit edilen fosfataz aktivitesinin patojenitede etkili olduğu bilinmektedir. Yüksek demir seviyesi de *L. monocytogenes*'in gelişimini artırmaktadır (Çağlar ve ark 2000).

1.8.1. *Listeria monocytogenes*'in Virülans Faktörleri

L. monocytogenes'in konakçı hücrelerine adhezyon ve invazyonunda farklı proteinlerin fonksiyonu bulunmaktadır. Bu proteinlerden InlA ve InlB identifiye edilmiş ilk proteinlerdir ve *L. monocytogenes* hücre yüzeyine salınırlar (Peiris 2005, Bhunia 2008).

İnternalin A

InlA proteini, 800 amino asitten oluşmuştur. InlA, *L. monocytogenes*'in intestinal epitel hücrelerine girmesini sağlayarak intestinal bariyerin aşılmasında önemli rol oynamaktadır (Peiris 2005).

E-kaderin, intestinal epitel hücrelerinden salgılanan bir transmembran glikoproteini (Güç 2004) olup InlA'nın reseptörü olarak görev yapmaktadır. InlA ve E-kaderin arasındaki türe özgü etkileşim, virülans kabiliyetinde oldukça önem arz etmektedir (Peiris 2005).

Klinik vakalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının büyük çoğunluğunda (%96) InlA tam uzunlukta sentezlenmesine karşın gıdalardan elde edilen izolatların daha az (%65) kısmında tam uzunlukta sentezlenmektedir. InlA, insan listeriozislerinin patojenitesinde önemli bir role sahiptir ve gıda kaynaklı

listeriozis vakalarında virülansın bir işaretidir (Peiris 2005, Barbuddhe ve ark 2008, Bhunia 2008).

İnternalin B

InlB proteini, hepatositler ve nonepiteliyal hücreleri de içeren birçok farklı hücre yüzeyine girmeyi ve hareket etmeyi sağlayan 630 amino asitten meydana gelir. Hedef hücreler üzerindeki hepatosit büyüme faktörü (hgf), InlB için başlıca reseptör olarak tanımlanmıştır (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Otolizin amidaz

Otolizin amidaz (Ami), *L. monocytogenes* hücre duvarı üzerinde bulunan bir proteindir. Litik aktivitesi vardır ve hücre adhezyonunda rol oynar (Peiris 2005, Bhunia 2008).

p60

p60, hücre duvarı hidrolizisinde katalizör rol oynayan bir proteindir (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Fibronektin bağlayıcı protein

L. monocytogenes'de beş ayrı fibronektin bağlayıcı protein (Fbp) saptanmıştır. Bunlardan moleküler ağırlığı en fazla olan FbpA, LLO ve InlB'nin seviyelerini düzenler ve bazı virülant proteinlerin degredasyonunu önler. Bunun yanı sıra farelerin karaciğer ve dalak, insanlarında epitel hücrelerinde bakterinin etkili kolonizasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Listeriolizin O

LLO, *L. monocytogenes*'in primer ve sekonder fagozomlardan kaçmasına yardım eden, porlarda oluşmuş bir proteindir. Bunun yanı sıra LLO, makrofajlarda interlöykin-1 sekresyonu, apoptozis, hücre adhezyonu ve enfekte epitel hücrelerde protein salınımı gibi birçok hücresel cevabı açığa çıkarır (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Aktin transferaz protein

Aktin transferaz protein (ActA), *L. monocytogenes*'in yüzey proteinidir. 639 amino asitten oluşmaktadır. Hedef hücrelere bağlanma ve hücre içine giriş fonksiyonlarında görevlidir. Enfekte hücrelerin sitoplazmasındaki bakterilerin hareketini başlatan ve hücreden hücreye iletimini sürdüren aktin filamentlerinin polimerizasyonunu başlatır (Peiris 2005, Kuhn ve Goebel 2007, Bhunia 2008).

Sortases

Hücre yüzey proteinlerini sabitleyerek, *L. monocytogenes*'in virülans özelliklerine katkı sağlayan transpeptidazlardır (Peiris 2005).

Auto

Otolitik aktiviteye sahip bir yüzey proteinidir. Ökaryotik hücrelerin invazyonunda rol oynar. Auto, erken ve geç enfeksiyon safhalarında bulunur. *L. innocua* ve *L. monocytogenes* 4b'de yoktur (Peiris 2005).

Safra tuzu hidrolazı

Konjuge safra tuzlarını dekonjuge eden bir enzimdir. Safra tuzlarının hidrolizi, *L. monocytogenes*'i safra tuzlarının toksik etkisinden koruyan bir mekanizmadır (Peiris 2005).

1.8.2. *Listeria monocytogenes*'in Hücre İçi Yaşam Döngüsünde Etkili Faktörler

Listeriolizin O ve iki fosfolipaz C

LLO, iki fosfolipaz C ile birlikte birincil ve ikincil hücre içi vakuollerden bakteri hücrelerinin kaçışında önemli bir rol oynamaktadır. Bu iki fosfolipaz C; fosfatidilinositole spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) ve fosfatidilkoline spesifik fosfolipaz C (PC-PLC)'yi içerir (Peiris 2005, Bhunia 2008).

Hekzos fosfat taşıyıcı ve pozitif düzenleyici faktör A

L. monocytogenes, enfekte hücrelerin sitoplazmasında bulunan glikoz-1-fosfatı kullanır. Bu işlem hekzos fosfat taşıyıcı (hpt) salınımı ile ilişkili pozitif düzenleyici faktör A (prfA) tarafından kolaylaştırılır. Bunun yanı sıra prfA, *Listeria* virülans genlerini düzenler (Peiris 2005).

Metalloproteaz

Metalloproteaz (mpl), konakçı hücrede sistein proteaz ve fosfolipazı aktive eden çinko bağımlı bir proteindir. Mpl, bir proenzim olarak sentez edilen PC-PLC'nin olgunlaşmasına yardım eden *mpl* geni tarafından düzenlenir (Peiris 2005).

1.9. *Listeria monocytogenes*'in Antibiyotik Duyarlılığı

L. monocytogenes, birçok antibiyotiğe karşı değişik düzeylerde duyarlılık göstermektedir. Rodas-Suarez ve ark (2006), gıdalardan, çevreden ve klinik vakalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatları arasında da farklı antibiyotik duyarlılıkları olabileceğini bildirmişlerdir. Facinelli ve ark (1991), *L. monocytogenes* izolatlarının farklı antibiyotiklere değişik düzeylerde duyarlılık göstermesinin, serotip farklılığından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Charpentier ve Courvalin (1999), *Listeria* türleri ve *L. monocytogenes*'de antibiyotiklere karşı duyarlılığın klinik uygulamalarda ilaçların yanlış ve/veya aşırı kullanımı sonucu kaybolduğu ve/veya kaybolacağını iddia etmişlerdir.

Charpentier ve Courvalin (1999), *L. monocytogenes* ile diğer *Listeria* türlerini gen dizilimleri ve antibiyotik dirençliliği oluşumunda rol oynayan mekanizmalar bakımından incelemişlerdir. Araştırmacılar, üç tür hareketli gen parçasının *Listeria* türlerinde dirençlilik mekanizmasında rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu gen parçalarını, kendiliğinden aktarılabilir plazmidler, hareketlenebilir plazmidler ve konjugatif transpozonlar olarak nitelendirmişlerdir.

Srinivasan ve ark (2005), süt üretim çiftliklerinden izole ettikleri izolatların önemli bir kısmında antibiyotik direnç genlerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, floR, penA, strA, tetA ve sulI genlerini yüksek oranlarda tespit ederken antitetrasiklin (tetB, tetC, tetD, tetE ve tetG) ve diğer antimikrobiyal genler (cmlA, strB, aadA, sulI, vanA, vanB, ampC, ermB, ereA ve ereB) tespit edilememiştir. Graves ve ark (2007), kloramfenikol, makrolid ve tetrasiklinlere karşı direnç oluşturan dirençlilik plazmidlerini *L. monocytogenes*'de tespit etmişlerdir.

Hansen ve ark (2005), Danimarka'da 1958-2001 yılları arasında ortaya çıkan insan listeriozislerinden elde edilen izolatları kullanarak yürüttükleri çalışmalarında 106 *L. monocytogenes* izolatını penisilin G, ampisilin, meropenem, gentamisin, sülfametoksazol, trimethoprim, eritromisin, vankomisin, linezolid, kloramfenikol ve tetrasikline duyarlı bulmuşlardır.

Godreuil ve ark (2003), Fransa'da insanlarda görülen listeriozis olgularından izole ettikleri 488 *L. monocytogenes* izolatını incelemişler ve beş izolatın florokinolonlara dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar florokinolonlara olan bu direncin, florokinolon içeren ilaçların sık kullanımından kaynaklandığını ve giderek artan florokinolon kullanımının konakçı olmayan türlerde dahi dirençli suşların görülmesine sebebiyet verebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Srinivasan ve ark (2005), dört süt üretim çiftliğinden izole ettikleri 38 *L. monocytogenes* izolatının hepsini sefalosporin C, streptomisin ve trimethoprime dirençli bulmuşlardır. Bunun yanı sıra izolatların büyük çoğunluğu ampisilin, rifampisin ve florfenikole direnç gösterirken yarısı tetrasiklin, penisilin G ve kloramfenikole dirençli, amoksisilin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve vankomisine duyarlı bulunmuştur.

Rodas-Suarez ve ark (2006), balık ve diğer deniz ürünlerinden elde ettikleri 68 *L. monocytogenes* izolatının dirençli olduğu antibiyotikleri ve dirençlilik oranlarını sırasıyla, pefloksasin (%28,9), sefalotin (%26,7), ampisilin (%23,7), penisilin (%22,5), seftazidim (%14,4), trimethoprim/sülfametoksazol (%12,7),

eritromisin (%12,1), tetrasiklin (%6,4), sefuroksim (%5,2), dikloksasilin (%4,0), gentamisin (%2,3) ve sefotaksim (%0) olarak tespit etmişlerdir.

Harakeh ve ark (2009), Lübnan'da üretilen peynir çeşitlerinden izole ettikleri 23 *L. monocytogenes* izolatının penisilin, trimethoprim/sülfametoksazol, tetrasiklin, gentamisin, eritromisin, kloramfenikol, klindamisin, oksasilin, vankomisin ve ampisilin antibiyotiklerine duyarlılıklarını araştırmışlardır. İzolatların hepsinin en az bir adet antibiyotiğe dirençli bulunduğunu ancak bazı antibiyotiklere dirençliliğin yüksek (örn., oksasilin, penisilin, ampisilin) olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların %26,66'sı vankomisine dirençli bulunmuştur. Araştırmacılar, vankomisine karşı yüksek direnç olmamasına rağmen, insan listeriozislerinde vankomisinin en son kullanılacak antibiyotik olması sebebiyle tespit edilen dirençlilik düzeyinin önem arz ettiğini bildirmişlerdir. İzolatlar gentamisin, trimethoprim-sülfametoksazol kombinasyonu, tetrasiklin ve eritromisine yüksek duyarlılık göstermiştir.

Conter ve ark (2009), test ettikleri 120 *L. monocytogenes* izolatının 14 tanesinin en az bir antibiyotiğe dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, spesifik olarak tek bir antibiyotiğe dirençliliği, çoklu dirençlilikten daha fazla tespit etmişlerdir. İzolatlardan on tanesi (%8,3) bir antibiyotiğe, üç tanesi (%2,5) iki antibiyotiğe, bir tanesi (%0,8) ise beş antibiyotiğe direnç göstermiştir. Klindamisine karşı direnç en sık görülürken sırasıyla linezolid, siprofloksasin, ampisilin, rifampisin, trimethoprim-sülfametoksazol kombinasyonu, vankomisin ve tetrasikline direnç gözlenmiştir.

Navratilova ve ark (2004), 2000-2002 yılları arasında çeşitli gıda maddelerinden elde ettikleri 70 *L. monocytogenes* izolatının streptomisin hariç ampisilin, sefalotin, klindamisin, eritromisin, gentamisin, neomisin, oksasilin, penisilin, tetrasiklin ve vankomisin antibiyotiklerine duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir.

Choi ve ark (2001), Kore'de 410 gıda numunesinden izole ettikleri sekiz adet *L. monocytogenes* izolatının ampisilin, kloramfenikol, karbenisilin, sefalotin, siprofloksasin, gentamisin, kanamisin, streptomisin ve trimethoprim-sülfametoksazole duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Facinelli ve ark (1991), İtalya'da gıda örneklerinden izole edilen 98 *L. monocytogenes* izolatının ikisinde streptomisin, sülfametoksazol ve kanamisine, birinde streptomisin, sülfametoksazol, kanamisin ve rifampine, birinde

streptomisin, sülfametoksazol, kanamisin, rifampin, eritromisin ve kloramfenikole direnç tespit etmişlerdir.

Listeriozisin tedavisinde ampisilin ve penisilin tek başına veya gentamisinle kombine edilerek kullanıldığında etkili olmaktadır. Ampisilin ve gentamisin kombinasyonu yaygın kullanım alanı bulmaktadır. β-laktam antibiyotiklerin kullanılamayacağı durumlarda trimethoprim ile bir sülfonamid (örn., ko-trimoksazol) kullanılabilmektedir. Alternatif tedavi prosedürleri trimethoprim-sülfametoksazol ve vankomisin-gentamisin kombinasyonları ve eritromisin, vankomisin, linezolid kullanımı olabilmektedir (Poros-Gluchowska ve Markiewicz 2003).

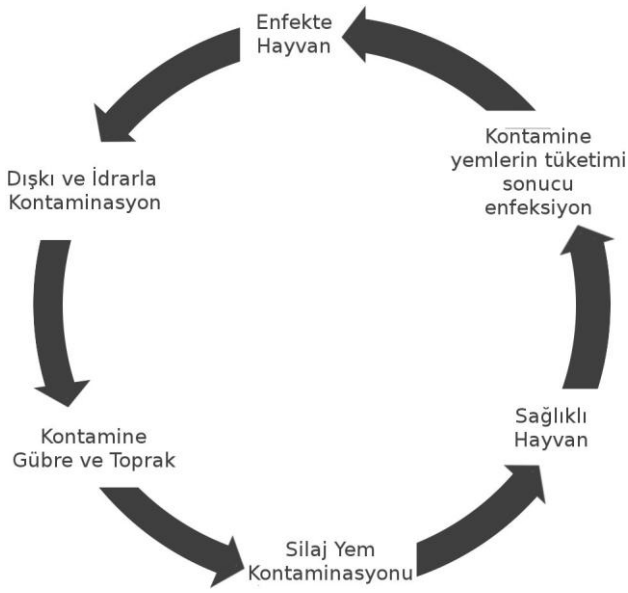
1.10. *Listeria monocytogenes*'in Oluşturduğu Hastalıklar

L. monocytogenes'in önemi, intestinal sistem dışında birçok doku, organ ve sistemde çeşitli hastalıklara (örn., yavru atma, septisemi, mastit, menenjit, meningoensefalit, konjonktivit, faranjit, sinüzit, gelişme geriliği, karaciğer apsesi, siroz) neden olabilen bir patojen olmasından ileri gelmektedir (Gönç ve Kılıç 2002).

1.10.1. Hayvanlarda Listeriozis

Birçok hayvan türünde (örn., sığır, manda, koyun, keçi, geyik, domuz, tavuk, hindi, sülün, güvercin, yarasa, köpek, kedi, tilki, fare, at, tavşan, balık) ortaya çıkan listeriozis olguları görülmektedir. Listeriozis enfeksiyonunda bazı hayvan türlerinin (örn., sığır, koyun, keçi, domuz, tavuk, hindi, sülün, martı, karga, güvercin ve balık) dışkılarında *L. monocytogenes* tespit edildiği bildirilmiştir. Bu durum, çevrenin kontaminasyonunda önemli rol oynamaktadır. *L. monocytogenes*, hasta hayvanların yanı sıra sağlıklı hayvanların dışkılarından da izole edilebilmektedir (Sauders ve Wiedmann 2007). Weber ve ark (1995), sağlıklı hayvanların dışkılarından izole ettikleri *L. monocytogenes* oranlarını sırasıyla sığır (%33), koyun (%8), kuşlar (%8), domuz (%5,9), at (%4,8) ve köpek (%0,9) olarak bulmuşlardır.

Silajla beslenen ruminantlarda diğer hayvan türlerinden daha fazla listeriozis olguları görülmektedir. Bu hayvanlarda listeriozis enfeksiyonları genellikle kontamine silaj tüketimine bağlı gerçekleşmektedir (Sauders ve Wiedmann 2007). Enfekte hayvanlar salgılarıyla çevreyi kontamine edebilmektedirler. Sağlıklı hayvanlara bulaşma daha çok oral yolla gerçekleşmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Listeriozis Döngüsü.

Gebe hayvanlarda (başta sığır ve koyunlar olmak üzere) uterusun enfeksiyonuyla abort, ölü doğum veya doğum sonrası ilk dört haftada yavru ölümleri görülmektedir. Yeni doğan kuzularda sıklıkla, sığırlarda nadiren viseral veya septisemik enfeksiyonlar görülebilmektedir. Bunun yanı sıra yürüme bozuklukları ve felç semptomlarıyla görülen ensefalitis, koyun, keçi ve sığırları etkilemektedir. Sığır mastitisi nadir görülmesine karşın tedavi sürecinin sonuna kadar sütle bu bakterinin salgılandığı bilinmektedir (Kınık ve ark 1998).

1.10.2. İnsanlarda Listeriozis

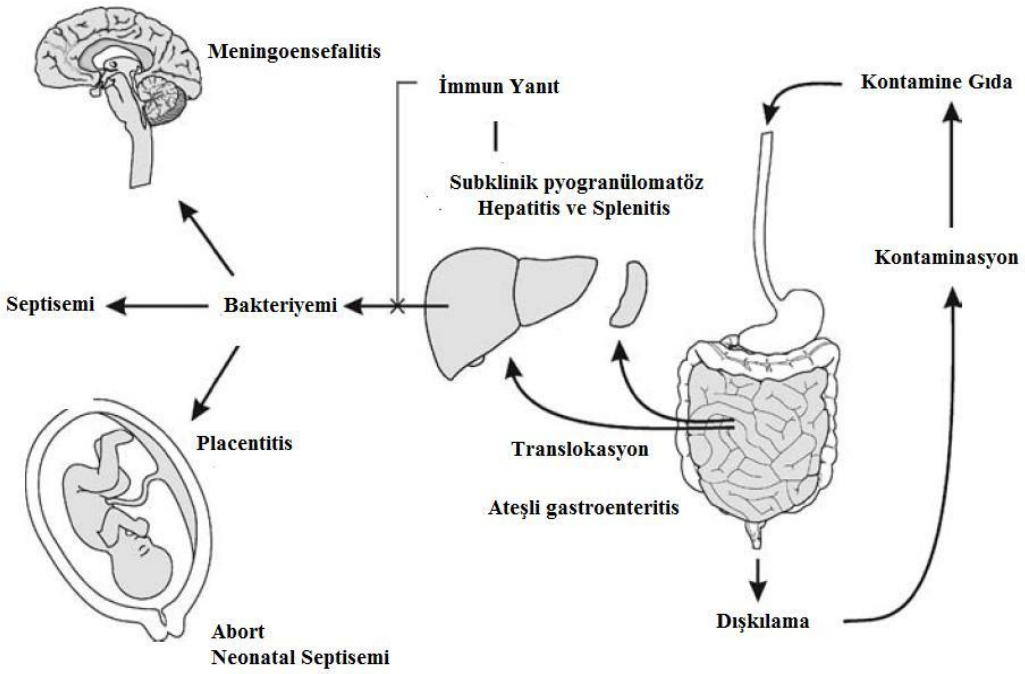
İnsanlarda görülen ilk listeriozis vakası I. Dünya Savaşı sonrasında bir askerde görülen menenjit olgusudur. Bunun yanı sıra bakterinin patojen özelliğinin kesinlik kazanması, 1949 yılında Almanya'daki yeni doğan bebeklerde görülen epidemik listeriozis olgularında, bakterinin ekstraintestinal sistemlerdeki etkilerinin de ortaya konmasıyla mümkün olmuştur (Hof 2003).

L. monocytogenes, göz ve deri yoluyla direkt olarak da bulaşabildiği gibi gıdalardan, hayvanlardan, insektlerden, bitkilerden ve topraktan da insanlara bulaşabilmektedir. Kontamine gıdaların tüketimi, bulaşmada en sık karşılaşılan yoldur. Göz ve deri yoluyla bulaşma daha çok laboratuar çalışanları, hayvan bakıcıları ve Veteriner Hekimlerde görülmektedir (Erol 2007).

İnsanlarda oluşturduğu enfeksiyon bakımından listeriozis, invaziv ve invaziv olmayan olarak iki formda incelenebilmektedir. İnvaziv olmayan listeriozis, febril

listerial gastroenterit olarak nitelendirilen hastalığın hafif formudur. Kısa bir inkübasyon dönemi sonunda baş ağrısı, diare, ateş ve miyalji ortaya çıkan başlıca semptomlardır. Hastalığın invaziv formu ise predispoze bireylerde (örn., hamileler, yenidoğanlar, yaşlılar, bazı hastalıklar neticesinde bağışıklık sistemleri etkilenmiş bireyler, immünsüpresif ilaçlarla bağışıklık sistemleri baskılanan transplant alıcıları ve malign tümörlü hastalar) görülen, yüksek mortalite oranlarıyla seyreden ve inkübasyon periyodu 90 güne kadar çıkabilen şeklidir (Painter ve Slutsker 2007). İnvaziv listeriozisde başlıca formlar ve klinik bulgular; akut septik form (yeni doğan listeriozisi), merkezi sinir sistemi formu (menenjit, ensefalit, ensefalomiyelit), glandular form (lenfadenit), lokal form (deri listeriozisi, konjonktivit) ve kronik septik form (endokardit, apse) olarak belirtilmektedir (Erol 2007).

Enfeksiyon, Şekil 1.6'da görüldüğü gibi influenza benzeri klinik bulgulardan ciddi komplikasyonlara kadar varan sonuçlara neden olabilmektedir (Kampelmacher 1988, Gönç ve Kılıç 2002, Koçan ve Halkman 2006, Erol 2007).



Şekil 1.6. İnsanlarda Listeriozis Komplikasyonları (Kuhn ve ark 2008).

L. monocytogenes'in enfeksiyon dozu tam olarak bilinmemektedir. Enfeksiyon dozunun belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar (Williams ve ark 2007, Van Stelten ve ark 2011) olmakla birlikte, gıdanın yapısı, etkenin virülansı ve enfekte insanların bağışıklık sistemi gibi faktörlerin göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmiştir. Bu durumların bir arada olup olmamasına bağlı olarak farklı

yaş gruplarında çeşitli klinik görünümler (Çizelge 1.5) karşımıza çıkabilmektedir (Painter ve Slutsker 2007). *L. monocytogenes*'in minimal infektif dozu (MİD) serotiplerinin sahip olduğu virülans faktörlerine göre de değişiklik göstermekte ve 1/2a, 1/2b ve 4b serotiplerinin MİD dozunun daha düşük olduğu belirtilmektedir (Erol 2007).

Çizelge 1.5. İnsanlarda Listeriozis Bulgularında Yaş ve Bağışıklık Durumu (Liu 2008).

Yaş	Klinik Bulgular	Predispozisyon
Hamileler	Ateş/Miyalji/İshal Preterm Eylem Abort Ölü Doğum	Gebelik
Yenidoğanlar <7 günlük >7 günlük	Sepsis, pnömoni Menenjit, sepsis	Prematürite
Hamile Olmayan Erişkinler	Sepsis, menenjit, lokal enfeksiyonlar	İmmunsupresyon, ilerlemiş yaş
Sağlıklı Erişkinler	İshal ve ateş	Muhtemelen inokulum

1.11. *Listeria monocytogenes*'in Gıdalarda Varlığı

L. monocytogenes'in gıda patojeni olduğu, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Kanada'da 1980'li yıllarda görülen ve ölümlerle sonuçlanan salgınlardan sonra anlaşılmıştır (Samelis ve Metaxopoulos 1999, Hibi ve ark 2006).

Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere pek çok ülkede ortaya çıkan listeriozis salgınları neticesinde hastalığın gıdalarla ilişkisi üzerine yapılan çalışmalara yoğunluk verilmiştir. Gıda kaynaklı listeriozis, salmonellozis ve kampilobakteriyozis gibi diğer gıda kaynaklı enfeksiyonlardan daha az görülmesine karşın, klinik olarak daha ciddi sonuçlara yol açabilmektedir (FDA 2003, Koçan ve Halkman 2006). Son yıllarda gıdalardan *L. monocytogenes*'in izolasyon ve

identifikasyon metotlarındaki gelişmeler ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insanlarda önemli gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon etkenlerinden *Clostridium perfringens, Salmonella* spp. ve *Staphylococcus aureus*'un yanı sıra *L. monocytogenes*'den kaynaklanan gıda enfeksiyonlarının da büyük önem kazandığını ortaya koymuştur (Şireli ve Erol 1999).

Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (Center for Disease Control and Prevention-CDC) 1999 yılı verilerine göre; gıda kaynaklı enfeksiyonlar arasında *L. monocytogenes* %20 mortalite oranıyla ikinci sırada yer almıştır (FDA 2003).

Enfeksiyona neden olan gıdalar arasında; çiğ ya da pastörize süt, dondurma, çiğ sebze ve meyveler, fermente et ürünleri, çiğ veya pişmiş kırmızı et, kanatlı etleri, çiğ veya tütsülenmiş balık, kabuklu deniz ürünleri, ısıl işlem uygulanmamış sütten üretilen taze peynirler, yumuşak peynirler, kanatlı etleri, tüketime hazır gıdalar, ısıl işlem görmüş jambon, çeşitli sosis ve salamlar sayılabilir (Molla ve ark 2004, Berktaş ve ark 2006, Sergelidis ve Abrahim 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization, FAO) gıdaları *L. monocytogenes* enfeksiyonu görülme riski bakımından;

a) Çiğ gıda maddeleri (örn., çiğ sebze, çiğ et, çiğ süt).

b) Isıtılmadan veya yalnız katkı maddeleri ile hazırlanmış gıda maddeleri (örn., hazır çorbalar, çiğ sucuklar, çiğ sütten yapılan peynirler).

c) Isıl işlem görmüş gıda maddeleri (örn., pastörize sütten yapılan çeşitli peynirler, pişirilmiş, dilimlenip paketlenmiş et ve su ürünleri).

d) Kapalı kutularda hazırlanmış gıdalar (örn., pastörize süt ve et ürünleri) olarak sınıflandırmışlardır (WHO/FAO 2004).

Gıdaların üretim aşamalarında teknolojileri gereği uygulanan işlemler (örn., pastörizasyon) *L. monocytogenes* üzerine letal etki yaratmaktadır. Ancak gıdaların işleme ortamlarına bağlı olarak kontaminasyon gerçekleşebilmektedir (Gailunas 2003). Değişik ülkelerde sporadik ve epidemik listeriozis vakaları bildirilmiştir (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Sporadik ve Epidemik *Listeria monocytogenes* Vakaları.

Yer	Vaka/Ölüm Sayısı	Gıda Maddesi	Kaynak
Almanya (1966)	279/109	Süt ürünleri	McLauchlin ve ark 2004.
ABD (1976)	20/4	Çiğ salata	McLauchlin 1997.
ABD (1979)	23/5	Çiğ kereviz,domates,marul	Farber ve Losos 1988.
Yeni Zelanda (1980)	29/9	Kabuklu deniz ürünleri, çiğ balık	Karunasagar ve Karunasagar 2000.
Kanada (1981)	41/17	Salata	Cjazka ve Batt 1994.
ABD (1983)	49/14	Pastörize süt	Fleming ve ark 1985.
ABD (1985)	142/48	Jalisco peyniri	Cjazka ve Batt 1994.
İsviçre (1983-1987)	122/31	Çiğ sütten elde edilen peynir	Lunden ve ark 2004.
ABD (1986-1987)	36/16	Dondurma, salam	Farber ve Peterkin 1991.
ABD (1989)	9/1	Karides	Farber ve Peterkin 1991.
İngiltere (1987-1989)	185/129	Et ürünleri	Farber ve Peterkin 1991.
Tazmanya (1991)	4/0	Midye	Mitchell ve ark 1991.
Fransa (1992)	279/85	Jöleli domuz dili	Valk ve ark 2001.
Fransa (1993)	39/12	Domuz kıyması	Valk ve ark 2001.
İtalya (1993)	23/0	Pirinç salatası	Lukinmaa ve ark 2004.
Fransa (1995)	20/4	Çiğ sütten elde edilen yumuşak peynirler	Lunden ve ark 2004.
İsveç (1994-1995)	6/1	Dumanlanmış soğukta muhafaza edilen balık eti	Loncarevic ve ark 1998.
Fransa (1995)	17/4	Yumuşak peynir	McLauchlin 1997.
Finlandiya (1998-1999)	25/6	Tereyağı	Lyytikainen ve ark 2000.
Fransa (1999)	32/10	Jöleli domuz dili	Valk ve ark 2001.
ABD (2000)	13/0	Meksika tipi peynir	MacDonald ve ark 2005.

1.11.1. Sebze ve Meyvelerde *Listeria monocytogenes*

Çiğ olarak tüketilen sebze ve meyveler, WHO ve FAO tarafından, *L. monocytogenes*'le kontaminasyon vakalarında risk oranı yüksek gıdalar arasında gösterilmektedir (WHO/FAO 2004). Sebzelerin kontaminasyonunda, kontamine gübrenin kullanıldığı topraklardan sağlanan sebzelerin yeterince temizlenmemesi ve hijyenik olmayan koşullarda hazırlanması en önemli faktördür (Erol 2007).

Lee ve ark (2009), dondurulmuş sebze üretimi yapılan bir işletmede küp ve şerit biber işleme hattının farklı bölgelerinden topladıkları 216 numuneyi *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* spp. varlığı yönünden incelemişlerdir. Araştırmacılar küp biber hattından alınan 108 numunenin 26'sının *Listeria* spp. ile kontamine olduğunu ancak küp ve şerit biber hattında *L. monocytogenes*'in izole edilmediğini bildirmişlerdir.

Mena ve ark (2004), Portekiz'de 37 dondurulmuş brokoli numunesinin altısını, 106 dondurulmuş dilimlenmiş kabak numunesinin 18'ini, 31 dondurulmuş dilimlenmiş yeşil biber numunesinin yedisini, 27 dondurulmuş bezelye numunesinin dördünü *L. monocytogenes* ile kontamine bulmuşlardır. Araştırmacılar 37 patlıcan ve 33 dondurulmuş dilimlenmiş kırmızı biber numunesinde *L. monocytogenes* izole edilmediğini bildirmişlerdir.

Johannessen ve ark (2002), 200 marul, 156 mantar ve 173 çilek numunesinin birer tanesinde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Little ve ark (2007), İngiltere'de 2686 salata numunesinden kırmızı et katkılı salataların %6'sını, deniz ürünleri katkılı salataların ise %3,8'ini *L. monocytogenes* ile kontamine bulmuşlardır.

Ponniah ve ark (2010), Malezya'da 306 salata numunesinden 69 tanesinde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Şireli ve Gücükoğlu (2008) 100 salata numunesinin, Monge ve Arias-Echandi (1999) ise 50 salata numunesinin onunda *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir.

1.11.2. Su Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes varlığının araştırıldığı çalışmalarda, su ürünlerinin farklı oranlarda kontamine ve önemli kontaminasyon kaynaklarından biri olduğu ortaya çıkmaktadır (Erol 2007).

Cordano ve Rocourt (2001), Şili'de 268 kabuklu deniz ürününün %11,6'sını *L. monocytogenes* ile kontamine bulmuşlardır.

Nørrung ve ark (1999), Danimarka'da 335 yarı işlenmiş balık ürününün %10,8'inde ve 232 çiğ balık numunesinin %14,2'sinde *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir.

Moharem ve ark (2007), Hindistan'da 132 çiğ balık numunesinin üçünde *L. monocytogenes* izole ederken, 32 kurutulmuş balık numunesinde tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Mena ve ark (2004), Portekiz'de 25 çiğ balık numunesinin üçünde *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, sekiz kabuklu deniz ürününde bakterinin tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Pinto ve ark (2001), Portekiz'de 23 çiğ balık numunesinde *L. monocytogenes*'e rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Rodas-Suarez ve ark (2006), Meksika'da 66 çiğ balık numunesinin onunda *L. monocytogenes* saptamışlardır.

Jalali ve Abedi (2008), İran'da 61 çiğ balık, 12 dondurulmuş balık ve 12 karides numunesinde *L. monocytogenes* izole edilmediğini bildirmişlerdir.

1.11.3. Et ve Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes'in et ve ürünlerinde bulunması ve gelişmesi gıda maddesinin çeşidine, doğal mikroflorasına, pH'sına ve kontaminasyon miktarına bağlıdır. Çiğ etler, *L. monocytogenes*'in hayvanlardan insanlara geçişinde önemli olmaktadır. Et ve ürünleri özellikle işleme, taşınma ve depolama sırasında kontaminasyona maruz kalmaktadır. Sterilizasyon uygulanan ve soğukta muhafaza edilen gıda maddeleri güvenilir olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra tüketime hazır ürünlerde, hazırlama aşamalarında oluşan kontaminasyonlar önem arz etmektedir (Güven ve Patır 1998, Farber ve ark 2007).

Farklı ülkelerde son 20 yılda yapılan araştırmalarda, et ve ürünlerinde *L. monocytogenes* kontaminasyonunun %0-86,4 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7. Et ve Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* İnsidensi.

Gıda	Yer	Numune Sayısı	*Listeria monocytogenes* pozitif numune sayısı	Pozitif Numune Yüzdesi (%)	Kaynak
Tavuk eti	Kanada	16	9	56,3	Farber ve ark (1989).
Tavuk eti	ABD	160	21	13,1	Genigeorgis ve ark (1989).
Dana kıyma	Kanada	44	38	86,4	Farber ve ark (1989).
Fermente sucuk	Kanada	30	6	20	Farber ve ark (1989).
Tavuk eti	Türkiye	80	31	38,8	Güven ve Patır (1998).
Dana kıyma	Türkiye	100	13	13	Güven ve Patır (1998).
Sucuk	Türkiye	80	6	7,5	Güven ve Patır (1998).
Parça et	Türkiye	70	8	11,4	Güven ve Patır (1998).
Isıl işlem görmüş et ürünü	Danimarka	772	39	5	Nørrung ve ark (1999).
Isıl işlem görmemiş et ürünü	Danimarka	328	77	23,5	Nørrung ve ark (1999).
Parça et	Danimarka	343	106	30,9	Nørrung ve ark (1999).
Tavuk eti	İspanya	100	15	15	Capita ve ark (2001).
Sığır ve domuz eti kıyması	İsviçre	400	43	10,75	Fantelli ve Stephan (2001).
İşlenmiş et ürünü	Portekiz	56	2	3,6	Pinto ve ark (2001).
İşlenmiş et ürünü	Şili	634	23	3,6	Cordano ve Rocourt (2001).
Tavuk kıyma	Türkiye	40	14	46,6	Şireli ve ark (2002).
Tavuk köfte	Türkiye	30	6	20	Şireli ve ark (2002).
Tavuk burger	Türkiye	30	8	26,6	Şireli ve ark (2002).
Dana kıyma	Türkiye	42	2	4,7	Yücel ve ark (2005).
Parça et	Türkiye	19	1	5,2	Yücel ve ark (2005).
Tavuk eti	Türkiye	26	3	11,5	Yücel ve ark (2005).
Tavuk eti	Türkiye	100	24	24	Özmen (2006).
Dana kıyma	Türkiye	100	11	11	Berktaş ve ark (2006).

Çizelge 1.7 (Devam). Et ve Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* İnsidensi.

Parça et	Türkiye	50	8	16	Berktaş ve ark (2006).
Sucuk	Türkiye	25	6	24	Berktaş ve ark (2006).
Sosis	Türkiye	25	3	12	Berktaş ve ark (2006).
Pastırma	Türkiye	25	4	16	Berktaş ve ark (2006).
Salam	Türkiye	25	-	-	Berktaş ve ark (2006).
Taze sucuk	İtalya	288	112	38,9	Cesare ve ark (2007).
Fermente sucuk	İtalya	277	42	15,2	Cesare ve ark (2007).
Dana Eti	İran	66	2	3,1	Jalali ve Abedi (2008).
Koyun eti	İran	46	2	4,3	Jalali ve Abedi (2008).
Tavuk eti	İran	72	0	-	Jalali ve Abedi (2008).
Deve eti	İran	27	0	-	Jalali ve Abedi (2008).

1.12. Süt ve *Listeria monocytogenes*

Son yıllarda kaydedilen listeriozis salgınları ve ciddi sporadik olguların epidemiyolojisinde pastörize süt ve yumuşak peynir tüketiminin önem arz ettiği gözlemlenmiştir (Yıldırım ve Sarımehmetoğlu 2006). Süt ve ürünlerinin listeriozis vakalarında önem arz etmesi sütün tamponlayıcı etkisiyle açıklanabilmektedir. Süt, koruyucu sistemleri sayesinde (örn., IgG, IgA, fagositler, laktoferrin ve laktoperoksidaz tiyosiyanat-hidrojen peroksit sistem) birçok mikroorganizmanın üreyip gelişmesini kısıtlamaktadır. Buna karşın sütün bu tamponlayıcı etkisi *L. monocytogenes*'i inhibitör faktörlere karşı korumaktadır (Barza 1985, Cousins ve Bramley 1985).

L. monocytogenes'le sütlerin kontaminasyonunun genel olarak üç şekilde gerçekleşebileceği bildirilmektedir. Birinci olasılık, kontamine silajları tüketen süt sığırlarının enfekte olmasıyla sütün direkt kontaminasyonudur. İkinci olasılık, sağım sırasında meme üzerindeki lezyonlar ve sağım personelinden bakterinin bulaşmasıyla gerçekleşmektedir. Üçüncü olasılık ise sağım sonrası çevresel kaynaklardan sütün kontaminasyonudur (Barza 1985).

Bakterinin süt ile birlikte salgılanması, fakültatif intraselüler bakterilerin (örn., *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp.) ortak özelliğidir. Bu bakteriler, lökositlerin içinde çoğalabilir ve yine bu hücrelerle birlikte sütten salgınabilirler. *L. monocytogenes* sütte serbest olarak ya da lökositlerin içinde bulunur. *L. monocytogenes*'in fakültatif intraselüler özellikte olması bakteriyi sütte bulunan immunoglobulin, lizozim, peroksidaz ve laktoferrin gibi birçok antibakteriyel substansa karşı korumaktadır. Bunun yanı sıra yanı sıra etkili olarak uygulanmayan pastörizasyon işleminde canlı kalabilmesi, buzdolabı sıcaklığında üreyebilmesi de süt ve ürünleri vasıtasıyla bulaşma riskini arttıran hususlardır (Barza 1985).

Mastitisli bir ineğin sütünü çiğ olarak tüketen bir annenin, ölü doğan ikiz çocuklarının kadavraları ve sütten aynı *L. monocytogenes* serotiplerinin tespit edilmesiyle ortaya konan vaka, çiğ sütlerden kaynaklandığı bildirilen ilk listeriozis vakası olarak kabul edilmektedir (Hird 1987). Farklı ülkelerde son 25-30 yılda yapılan araştırmalarda, çiğ sütlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonunun %0-45,3 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 1.8).

Çizelge 1.8. Çiğ Sütlerde *Listeria monocytogenes* İnsidensi.

Yer	İnsidens (%)	Kaynak
Hollanda	4.7	Beckers ve ark (1987).
İngiltere	3.6	Greenwood ve ark (1991).
İsveç	1.0	Waak ve ark (2002).
Nijerya	0.7	Oni ve ark (1989).
Amerika Birleşik Devletleri	4.1	Rohrbach ve ark (1992).
Amerika Birleşik Devletleri	4.0	Liewen ve Plautz (1988).
Kanada	1.6	Davidson ve ark (1989).
Kanada	1.3-5.4	Farber ve ark (1988).
İskoçya	1-3.8	Fenlon ve Wilson (1989).
İspanya	45.3	Rodriquez ve ark (1985).

Çizelge 1.8 (Devam). Çiğ Sütlerde *Listeria monocytogenes* İnsidensi.

İtalya	0	Massa ve ark (1990).
Portekiz	16.7	Mena ve ark (2004).
İrlanda	4.9	Rea ve ark (1992).
Kanada	2,73	Steele ve ark (1997).
Türkiye	0,6	Issa ve ark (2009).
Türkiye	18,2	Sharif ve Tunail (1991)
Slovakya	18	Holko ve ark (2002).
Türkiye	2	Aslantaş ve Yıldız (2003).
Türkiye	1,2	Sağun ve ark (2001).
Türkiye	0,45	Uysal ve Anğ (2003).
Türkiye	0,95	Uraz ve Yücel (1998).
Türkiye	2,16	Arda ve ark (1996).
Türkiye	0,8	Taşçı ve ark (2009).

1.13. Peynir ve *Listeria monocytogenes*

Peynirlerde hammadde, üretim, işleme aşamalarından kaynaklanan mikroflora ürüne özgü duyusal özellikleri kazandırmaktadır. Bunun yanı sıra Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde (2009), bazı patojenlerin ve maya-küfün peynirlerde belirtilen limitleri aşmaması gerekmektedir (Çizelge 1.9).

Çizelge 1.9. Peynir Mikrobiyolojik Kriterleri*.

	n	C	m	M
Maya ve Küf (küfle olgunlaştırılanlar hariç)	5	2	10^2	10^3
Staphylococcus aureus (koloni oluşturan birim-kob/g)**	5	2	10^2	10^3
Salmonella spp.	5	0	0/25g-ml	
Listeria monocytogenes	5	0	0/25g-ml	
Escherichia coli O157:H7	5	0	0/25g-ml	

* Eritme peynir hariç diğer tüm peynirler
* *Koagülaz pozitif stafilokoklar

Çizelge 1.9'da verildiği üzere, peynir numunesinde *L. monocytogenes* bulunmaması gerekmektedir. Listeriozis vakalarının büyük çoğunluğu sıfır tolerans olarak tanımlanan fakat bu standartlara uymayan gıdaların tüketimi ile ilişkilidir (WHO/FAO 2004). PulseNet veritabanı kayıtlarına göre(Painter ve Slutsker 2007), ABD'de 1998-2006 yılları arasında görülen listeriozis olgularında, yemeye hazır et ürünleriyle birlikte pastörize edilmemiş sütten elde edilen peynirler başlıca sorumlu gıdalar olarak tespit edilmiştir.

L. monocytogenes'in farklı tip peynirlerde olgunlaşma ve/veya depolama süresince peynirin tipine bağlı olarak sayısının azalabildiği, canlılığını sürdürebildiği, bazılarında ise üreyebildiği yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Brick peynirinde depolamanın altıncı ayında 10^5 kob/g (Ryser ve Marth 1989), olgunlaşma döneminde sırasıyla Cemembert peynirinde üçüncü ayda 10^7 kob/g (Ryser ve Marth 1987a), Cheddar peynirinde 14. ayda (Ryser ve Marth 1987b), Blue peynirinde dördüncü ayda (Papageorgiou 1989), Colby peynirinde beşinci ayda 10^2 kob/g düzeyinde (Yousef ve Marth 1988) bakteri tespit edilmiştir. Patır ve Güven (1999), ısıl işlem uygulanmadan üretilen Şavak salamura peynirlerinde üretim esnasında çiğ koyun sütüne inoküle edilen *L. monocytogenes*'in 120 gün boyunca canlılığını muhafaza ettiğini bildirmişlerdir. Bu durum *L. monocytogenes* suşuna, etkenin başlangıç inokulasyon düzeyine, kullanılan starter kültürün çeşit ve aktivitesine, peynirin işleme pH'sına, olgunlaşma ve depolama koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Fernandez-Garayzabal ve ark (1987), pastörize sütten yapılmış peynirlerin %1,6'sında, taze peynirlerin %4'ünde *L. monocytogenes* tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Rudolf ve Scherer (2001), değişik ülkelerden temin ettikleri 329 adet krem peynir numunesinin 21 tanesinde (%6,4), Pinto ve ark (2001), 49 peynir örneğinin 3'ünde (%6,1) *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Gülmez ve Güven (2001), Kars'ta 40 adet taze beyaz peynir numunesinin iki tanesinde (%5), Gül ve ark (1995), Diyarbakır'da 224 adet taze, beyaz ve tulum peynir örneklerinin dört tanesinde (%1,8) *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Cordano ve Rocourt (2001), Şili'de 256 yumuşak peynir örneğinin %0,8'inde *L. monocytogenes* izole etmelerine karşın 155 sert peynir numunesinde izole edememişlerdir. Buna karşın Güner ve Telli (2011), Türkiye'nin değişik bölgelerinde yöresel olarak üretilen yarı sert peynirlerden Van otlu, Carra, Konya küflü ve Urfa tulumunda *L. monocytogenes*'in varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar, Van otlu peynirinde dokuz (%30), Carra peynirinde 14 (%46,6), Konya küflü peynirinde yedi (%23,3), Urfa tulum peynirinde dört (%13,3) numuneyi *L. monocytogenes* ile kontamine bulmuşlardır.

Kara ve ark (1999), Erzurum piyasasından temin ettikleri 16 civil peynir örneğinin bir tanesinde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Gülmez ve Güven (2001), Kars'ta 40 adet çeçil peynir numunesinin birinde (%2,5) *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir.

Keleş ve ark (2006), Konya'da 30 adet tulum ve 30 adet kaşar peyniri numunelerinde *L. monocytogenes* tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Kurşun ve ark (2009), çiğ sütten üretilen geleneksel bir peynir türü olan Keş peynirinde, 48 örnekten ikisinde (%4,1) *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir.

Çetinkaya ve ark (1999), Elazığ ve çevresinden topladıkları 51 Şavak peyniri, 52 tulum peyniri ve 10 çökelek peyniri numunesini *Listeria* varlığı bakımından araştırmışlardır. Araştırmacılar Şavak peyniri numunelerinde bir adet *L. monocytogenes* izole ederlerken, tulum ve çökelek peyniri numunelerinde izole edememişlerdir.

Arda ve ark (1996), İstanbul'da 186 sert peynir numunesinin ikisinden (%1,07) *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

1.14. Salamura Beyaz Peynirlerde *Listeria monocytogenes*

Türkiye'de, 2009 yılında üretilen 11 583 313 ton sütün %20'si peynir yapımında kullanılmıştır. Peynir çeşitleri içerisinde, salamura beyaz peynir %65'lik oranla en büyük paya sahiptir (TUİK 2009).

Türk Standartları Enstitüsü (TSE) Beyaz Peynir Standardı'nda salamura beyaz peynir ''inek sütü (TS 1018), koyun sütü (TS 11044), manda sütü (TS 11045), keçi sütü (TS 11046) veya karışımlarının pastörize edilmesi ve tekniğine göre işlenmesi, gerektiğinde katkı maddelerinin ilavesi ve olgunlaştırılması sonucu elde edilen mamül'' olarak tanımlanmaktadır (TSE 2006).

Peynirler, Codex Alimentarius Commission (2006)'a göre, olgunlaştırma şekli ve tekstürel özellikleri dikkate alınarak yağsız kitledeki su yüzdesi bakımından çok sert (≤%51), sert (%49-56), yarı sert (%54-69) ve yumuşak (≥%67) olmak üzere dört sınıfta incelenmektedir. Bu sınıflandırmada, salamura beyaz peynir, yumuşak peynirler grubunda yer almaktadır. Aynı zamanda kısa sürede olgunlaştırılarak tüketime sunulmaktadır. Yumuşak ve kısa süreli olgunlaştırılan peynirler (örn., beyaz peynirler), *L. monocytogenes*'in varlığı ve üremesini teşvik eden ortamlardır. Nitekim Arıcı ve ark (1999), 10^3 kob/ml *L. monocytogenes* inokule edilmiş, inek ve koyun sütünden üretilen salamura beyaz peynirlerinin üretim, olgunlaşma ve depolama aşamalarında bakterinin canlılığını incelemişlerdir. Araştırmacılar peynir örneklerinin ikisinde beşinci gün sonunda 10^5 kob/g, sekizinci hafta sonunda 10^4 kob/g *L. monocytogenes* tespit ederlerken, 20. hafta sonunda inek sütünden elde edilen salamura beyaz peynirlerde >10 kob/g, koyun sütünden elde edilen salamura beyaz peynirlerde de >100 kob/g düzeyinde bakteriyi tespit etmişlerdir.

Süt sağımı sırasındaki hijyen koşulları, süt işletmelerinin yapısı ve üretim teknikleri ile özellikle aile işletmelerinde pastörizasyon uygulanmadan üretim yapılması göz önüne alındığında, Türkiye'de *L. monocytogenes*'in salamura beyaz peynirlerde bulunma olasılığının oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir (Bolat 2006, Yıldırım ve Sarımehmetoğlu 2006).

Kara ve ark (1999), Erzurum piyasasından topladıkları 34 salamura beyaz peynir örneğinin bir tanesinde *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir.

Akkaya ve Alişarlı (2006), Afyonkarahisar il merkezi semt pazarlarında satışa sunulan 100 adet salamura beyaz peynir örneğinin altısında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Keleş ve ark (2006), Konya'da 40 adet salamura beyaz peynir numunesinin iki tanesinde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Gönç ve Kılıç (2002), İzmir'de büyük satış yerlerinden piyasaya sunulan 82 adet salamura beyaz peynir numunesinin 11 tanesinde (%13,4) *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Uysal ve Anğ (2003), İstanbul, Trakya ve Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan 271 salamura beyaz peynir numunesinin 11 (%4)'inden *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Bolat (2006), Ankara'da tüketime sunulan 75 salamura beyaz peynir numunesinin iki tanesini *L. monocytogenes*'le kontamine bulmuştur.

Öktem ve ark (2006), Ankara'da marketlerden temin ettikleri 100 salamura beyaz peynir numunesinin dört tanesinde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Kaynar ve ark (2005) Ankara'da marketlerden topladıkları 30 adet salamura beyaz peynir numunesinde, Gülmez ve Güven (2001) Kars'ta toplanan 40 adet salamura beyaz peynir numunesinde *L. monocytogenes* saptanmadığını bildirmişlerdir.

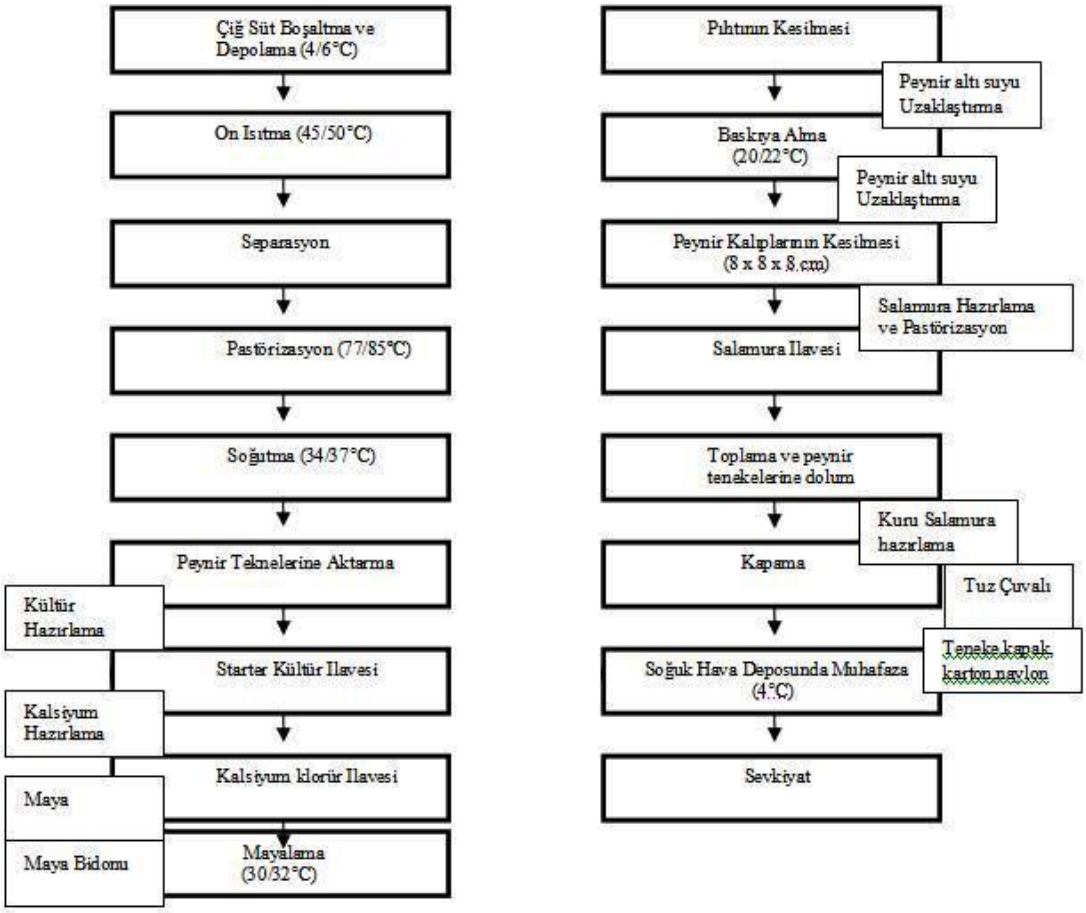
Kahraman ve ark (2010), altı farklı ilden temin ettikleri 105 salamura beyaz peynir numunesinin beş tanesinde *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir.

Arslan ve Özdemir (2008), semt pazarlarında tüketime sunulan ev yapımı 142 beyaz peynir numunesinin 13 tanesini *L. monocytogenes*'le kontamine bulmuşlardır.

1.15. Salamura Beyaz Peynir Üretiminde *Listeria monocytogenes*'in Kontaminasyon Kaynakları

Süt ürünleri üretim aşamalarında; süt işleme makinaları, sayaçlar, separatörler, pıhtı presleri, yıkama ve salamura düzenleri, presler ve personel gibi hemen her ortam *L. monocytogenes*'in izole edilebildiği bulaşma kaynaklarıdır (Gönç ve Kılıç 2002, Sancak ve ark 2002, Coşkun 2006). Salamura beyaz peynir üretimi birçok aşamadan oluşmakta (Şekil 1.7) (İnal 1990, Üçüncü 2002) ve

kontaminasyon noktaları oldukça fazla olabilmektedir (Kasımoğlu 1999, El-Hofi 2010).



Şekil 1.7. Salamura Beyaz Peynir Üretim Akış Şeması.

El-Hofi ve ark (2010), salamura beyaz peynir üretiminde süt kabulü, pastörizasyon, tuzlama, mayalama, teknelere dolum, pıhtılaşma ve kalıpların kesilmesi aşamalarını mikrobiyal kontaminasyon bakımından kritik kontrol noktaları olarak tespit etmişlerdir.

Kasımoğlu (1999), salamura beyaz peynir üretim hattında beyaz peynir teknesi, cendere bezi, branda, pıhtı kesici, kültür kovası, peynir tenekesi, duvar ve zemin, personel elleri, hava, pastörize süt ve pastörizasyon sonrası farklı aşamalardan elde edilen süt, tuzsuz ve tuzlu peynirler, maya, kalsiyum klorür, starter kültür, salamura, su olmak üzere 25 farklı bölgeden numune toplamıştır. Örneklerin aerobik mezofil genel canlı, stafilokok ve mikrokok, koagülaz pozitif stafilokok, enterobakteriler, koliform bakteriler, *Escherichia coli*, enterokok, *Pseudomonas* spp., maya ve küf yönünden mikrobiyal kontaminasyon kaynaklarını tespit etmeye çalışmıştır. Araştırmacı, pastörizasyon işlemi, cendere bezi, branda, hava ve

personeli mikrobiyal kontaminasyon bakımından kritik kontrol noktaları olarak saptamıştır.

1.15.1. Hammadde

Meme dokusunun patojen bir bakteriyle enfekte olması durumunda, hijyenik koşullarda sağım yapılmasına karşın sütte bu bakterilere rastlamak mümkün olmaktadır. Kınık ve ark (1998), meme yüzeylerinin kontaminasyonunun *L. monocytogenes*'in süte kontaminasyonunda önem arz ettiğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra sütün sağımı sonrası bakterinin ubiquiter özelliği dolayısıyla (Uhitil ve ark 2004, Erol 2007) çevreden de kontaminasyon şekillenebilmektedir (Metin 2005, Erol 2007).

Çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesinin iyileştirilebilmesi, sütün eldesi ve işletmeye nakli aşamalarında hijyenik kurallara uyum (İnal 1990, Öksüz 1996) ve çiftliklerde iyi hijyen uygulamalarıyla (Temelli ve ark 2006) gerçekleştirilebilmektedir. Fekal kontaminasyonun engellenmesi, süt sağım ekipmanlarının dezenfeksiyonu (Sanaa ve ark 1993, Kınık ve ark 1998) ve silajın uygun koşullar altında üretilerek pH değerinin 4,0'a düşürülmesi, *L. monocytogenes* kontaminasyonunun önlenmesi bakımından önem arz etmektedir (Metin 2005, Erol 2007).

Sanaa ve ark (1993), 128 adet farklı süt üretim çiftliğinde, çiğ sütlerin *L. monocytogenes* kontaminasyonuyla ilişkili risk faktörlerini araştırmışlardır. Araştırmacılar silaj kalitesinin, hayvan ve ahır temizliğinin, yetersiz aydınlatmanın, sağım metotlarının, sağım salonlarının, sağımlar arasında kullanılan havluların dezenfeksiyonunun çiğ sütün *L. monocytogenes*'le kontaminasyonunda önem arz ettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Taşçı ve ark (2009), uygun koşullarda üretilmeyen silajla beslenen hayvanlardan elde edilen sütlerde, *L. monocytogenes* kontaminasyonunun daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

1.15.2. Pastörizasyon

Salamura beyaz peynir üretiminde pastörizasyon zorunlu bir işlem basamağıdır (TSE 2006). Süt bileşimindeki protein, laktoz, yağ, mineral, su ve vitamin pastörizasyonda süt tortuları oluşmasına neden olmaktadır. Sütün bileşiminden kaynaklanan bu tortular, sert suların tuzlarıyla birleşerek, temizlenmesi daha güç olan süttaşı oluşumuna da neden olmaktadır. İşletmelerde, tortu ve süttaşı

gibi kirlerin niteliğine göre uygun temizlik maddelerinin uygun konsantrasyonlarda kullanılması, temizliğin etkinliği bakımından önem arz etmektedir (Metin ve Öztürk 1995). Nitekim, pastörizatörde işlem sonrası süt tortularının birikmesi, ısıl işlem etkinliğinin azalmasına yol açmaktadır. Patojen bakterilerin etkin bir ısıl işleme maruz kalmasını engelleyen bu durum, programlı temizlik ve bakım işlemleriyle önlenebilmektedir. Bunun yanı sıra pastörizatörün uygun olmayan dizaynı, pastörize sütlerin *L. monocytogenes*'le kontaminasyonunda rol oynamaktadır. Pastörizatörün çiğ süt ile pastörize süt birimleri arasındaki basınç farkının fazla olması, pastörize sütün kontaminasyonuna neden olabilmektedir (Arvanitoyannis ve Mavropoulos 2000).

WHO (1988), 71,7°C'de 15 sn. yapılan pastörizasyonun, çiğ sütlerdeki *L. monocytogenes* düzeyini insan sağlığı açısından risk oluşturmayacak bir düzeye indirdiğini; Lado ve Yousef (2007), *L. monocytogenes* hücrelerinde 56°C ve üzerindeki sıcaklıklarda ribozomal hasar, protein denatürasyonu ve dolayısıyla enzim aktivitelerinde bozulmalar meydana geldiğini bildirmiştir. Nitekim, Sarımehmetoğlu ve Kaymaz (1994), salamura beyaz peynir üretiminde çiğ süte $4,6x10^5$ kob/ml düzeyinde inokule ettikleri *L. monocytogenes*'in 72°C'de 2 dk. uygulanan pastörizasyon işlemiyle tamamen yıkımlandığını; Lovett ve ark (1990), ABD'de pastörize süt tüketimine bağlı olarak meydana gelen listeriozis salgınında yer alan *L. monocytogenes* izolatının pastörizasyon uygulamasında canlılığını sürdüremediğini tespit etmişlerdir. Buna karşın, Bunning ve ark (1988), 61,7°C'de 35 dk.'lık pastörizasyon sonunda *L. monocytogenes*'in $5x10^3$ kob/ml düzeyinde canlı kalabildiğini; Sarımehmetoğlu ve Kaymaz (1994), 10^4 kob/ml ve daha fazla sayıda *L. monocytogenes* inokule edilen sütlere 63°C'de 30 dk. süreyle uygulanan pastörizasyon işleminde *L. monocytogenes*'in canlılığını devam ettirdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca İnal (1990), *L. monocytogenes*'in enfekte hayvanların sütlerinde fagosite edilmiş ve lökositler tarafından çevrelenmiş durumda olmasından dolayı bakterinin pastörize sütlerde bulunabileceğini ileri sürmüştür. Bunun yanı sıra pastörize süt ve ürünlerinde *L. monocytogenes* izolasyonu gerçekleştiren araştırmacılar (Fernandez-Garayzabal ve ark 1986, Greenwood ve ark 1991, Frye ve Donnely 2005), pastörizasyon sonrasında da kontaminasyon şekillenebileceğini ileri sürmüşlerdir.

1.15.3. Alet-Ekipman

Süt ve ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığında, alet-ekipmandan kaynaklanan kontaminasyon büyük önem arz etmektedir (Erol 2007).

L. monocytogenes, paslanmaz çelik, cam, ahşap, porselen, demir, plastik, polyester, propilen, kauçuk, karton ve kağıt olmak üzere birçok farklı yüzeyde biofilm oluşturur (Senczek ve ark 2000, Lado ve Yousef 2007). Nitekim Latorre ve ark (2010), çiğ süt tanklarında şekillenen biofilm yapısı içerisinde *L. monocytogenes* varlığını saptamışlardır. Ambalaj materyalleri de *L. monocytogenes*'in biofilm oluşturma özelliği nedeniyle kontaminasyonda önem arz etmektedir (Lado ve Yousef 2007).

Evrensel ve ark (2003), Bursa'da bir salamura beyaz peynir üretim işletmesinde; pastörizasyon sonrası üretim hattındaki plastik boruların, muşambanın, cendere bezinin direkt mikrobiyal kontaminasyon kaynağı olduğunu saptamışlardır.

Temelli ve ark (2006), beyaz peynir üretim hattında çiğ süt, salamura, baskı plakaları, zemin, ambalaj materyali, peynir katkıları, bıçaklar, cendere bezi, soğuk ve üretim oda havasını mikrobiyal kontaminasyonun şekillendiği noktalar olarak belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra pastörizasyon sonrası kontaminasyonun engellenmesi için alet-ekipmanın temizlik ve dezenfeksiyonuna özen gösterilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

1.16. *Listeria monocytogenes*'in Süt ve Ürünlerinden İzolasyon Teknikleri

Süt ve ürünlerinden *L. monocytogenes* izolasyonunda kullanılabilen metotlar kültürel olmayan, kültürel ve hızlı metotlar olarak sınıflandırılabilmektedir (Çelik ve Temiz 1991, İşleyici ve Sancak 2000).

1.16.1. Kültürel Olmayan İzolasyon Metotları

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Tekniği

Teknik, bir enzimin bilinen bir antijen veya antikora kovalent bağlanması, sonra enzim bağlı materyalin örnekle tepkimeye sokulması ve daha sonra enzime özel substrat eklenerek enzim etkinliğinin hem nicel hem de nitel olarak tespitine dayanmaktadır (Reid ve ark 2006). ELISA tekniğini Wagner ve Bubert (1999), *L. monocytogenes*'in izolasyonunda, Palumbo ve ark (2003), gıdalardan, çevreden ve klinik vakalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarını serotiplendirmede kullanmışlardır.

Fluorescence Antibody (FAT) Tekniği

Tekniğin esası, fluorojenik ve kromojenik özellikteki bir boya ile (örn., akridin orange, nötral red, fosfatidilinositol) boyanmış hücrelerin ihtiva ettiği deoksiribo nükleik asit (DNA) ve ribo nükleik asit (RNA) miktarlarına bağlı olarak farklı renklerde ve yoğunlukta fluoresans vermesidir (Cherry ve Moody 1965, İşleyici ve Sancak 2000). Smith ve ark (1960), *L. monocytogenes*'in identifikasyonunda FAT tekniğini kullanmışlardır.

Polymerase Chain Reaction (PCR) Tekniği

PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi temeline dayanan in vitro bir tekniktir (Arı 2008). PCR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Brehm-Stecher ve Johnson 2007, Liu ve ark 2008). PCR ile *L. monocytogenes*'in identifikasyonunda birçok hedef gen bölgesi (Çizelge 1.10) kullanılmıştır. Wieckowska ve ark (1998), süt örneklerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonunda, Borucki ve Call (2003), *L. monocytogenes* izolatlarını serotiplendirmede PCR tekniğini kullanmışlardır.

Çizelge 1.10. PCR Uygulamalarında Kullanılan *Listeria monocytogenes* Hedef Gen Bölgeleri (Liu ve ark 2008).

Hedef Gen Bölgesi	Protein
Hly	Listeriolizin (LLO)
PlcA	Fosfatidilinositol-fosfolipaz C (PI-PLC)
PlcB	Fosfatidilkolin-fosfolipaz C (PC-PLC)
ActA	ActA
Mpl	Metalloproteaz
PrfA	Transkripsiyonal regülatör PrfA
InlA	Internalin A
InlB	Internalin B
ClpE	Clp ATPase
lmaA/dth18	LmaA antijeni/gecikmiş-tip hipersensitivite proteini
Lmo0733	Transkripsiyonal regülatör
Lmo2234	Tanımlanmamış
PepC	Aminopeptidaz C

1.16.2. Kültürel İzolasyon Metotları

Listeria izolasyonunda kullanılan kültürel teknikler, zenginleştirme ve izolasyon aşamalarından oluşmaktadır (Curtis 1999).

Elektif zenginleştirme aşamasında *Listeria* besiyerlerinin bileşimindeki suplementler (Çizelge 1.11), *Listeria* spp. dışındaki mikroorganizmaların üremesi üzerine inhibitör etkide bulunur. *Listeria* besiyerlerinin bileşimindeki akriflavin enterokokların, siklohekzimid maya ve küflerin, nalidiksik asit Gram negatif bakterilerin gelişimini engeller. Bu suplementler *Listeria* spp.'lerin üreme ve gelişmeleri için uygun ortam oluşturur (Pichhardt 2004, Donnelly ve Nyachuba 2007).

Bunun yanı sıra besiyerinin bileşiminde bulunan ve *Listeria* bakterileri tarafından kullanılan bazı maddeler (örn., eskulin, ferrik amonyum sitrat) izolasyon

aşamasında tipik renkli veya zonlu kolonilerin oluşmasında ve dolayısıyla selektif ayrımda etkilidirler (İşleyici ve Sancak 2000).

Çizelge 1.11. *Listeria* İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve İçerdikleri Selektif Maddeler (Curtis 1999, İşleyici ve Sancak 2000).

Besiyeri Adı	Acriflavin	Glicine Anhydride	Phenylethanol	LICI	Esculin	K-Tellürite	Antibiyotik
MMA	-	+	+	+	-	-	Siklohekzimid
LPM	-	+	+	+	-	-	Mox
Mod. V.J.	-	+	-	+	-	+	Mox, Nal, Bac
RAPAMY	+	-	+	-	+	-	Mox, Nal
PALCAM	+	-	-	+	+	-	Cz, Poly
ACA	+	-	-	-	-	-	Cz
Oxford	+	-	-	+	+	-	Ctt, Fos, Col
M. Oxford	-	-	-	+	+	-	Mox, Col
ASLM	+	-	+	+	+	-	Mox, Cz

MMA : Modify McBride's Agar, LPM : Lithium Chloride Phenylethanol Moxolactam Agar, Mod.V.J. : Modify Vogel Johnson Agar, RAPAMY : Acriflavin Phenylethanol Esculin Mannitol Egg Yolk Emulsion, PALCAM : Polymixin Acriflavin Lithium Chloride Ceftazidime Eskulin Mannitol Agar, ACA : Acriflavin Ceftazidime Agar, Mod. Oxford : Modify Oxford Medium, ASLM : Al-Zorecky Sandine Listeria Medium, Mox : Moxalactam, Nal : Nalidixic asit, Bac : Bacitracine, Cz : Ceftazidime, Poly : Polymyxin B, Cft : Cefotetan, Fos : Fosfomycin, Col : Colistin.

Food and Drug Administration (FDA) Tekniği

FDA tekniğinde, selektif inhibitörler (suplement) ilave edilmeden, hasar görmüş *Listeria* bakterilerinin onarılmasını sağlamak için 4 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmektedir. *Listeria* spp. varlığı yönünden araştırılacak numuneden 25 g ya da ml, 225 ml'lik Listeria Enrichment Broth zenginleştirme ortamında homojenize edilir. Suplement ilave edilmeden 30°C'de 4 saat, suplementli 44 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında zenginleştirme ortamından McBride Agar, Oxford Agar, PALCAM Agar veya LPM Agar gibi selektif bir katı besiyerine ekilir. LPM Agar'da 30°C'de, diğer agarlarda ise 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Selektif agarlarda gelişen tipik en az beş koloniden, Tryptone Soya Yeast Ekstract

Agar'a ve identifikasyon aşamalarına geçilir (Curtis 1999, Hitckins 2003, Donnelly ve Nyachuba 2007).

International Dairy Federation (IDF) Tekniği

IDF tekniğinde, 25 g ya da ml numune, 225 ml IDF Selective Enrichment Broth'da homojenize edilir. 30°C'de 48 saatlik ön zenginleştirmeyi takiben PALCAM ve/veya Oxford Agar'a ekim yapılır. 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Selektif agarlarda gelişen tipik en az beş koloniden, Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'a ve identifikasyon aşamalarına geçilir (Donnelly ve Nyachuba 2007).

International Standardization Organisation (ISO) Tekniği

ISO tekniğinde, yarı selektif ön zenginleştirme için 25 g ya da ml numune, 225 ml ½ gücündeki Fraser Broth'da inkübasyona bırakılır. 30°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben PALCAM ve/veya Oxford Agar'a ekim yapılır. Bunun yanı sıra tam gücündeki 10 ml Fraser Broth içeren bir tüpe zenginleştirme brothundan 0,1 ml aktarılır. 35-37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben PALCAM ve/veya Oxford Agar'a ekim yapılır. Selektif agarlarda 30-37°C'deki inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde tipik en az beş koloniden, Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'a ve identifikasyon aşamalarına geçilir (Curtis 1999, İşleyici ve Sancak 2000).

Soğukta Zenginleştirme Tekniği

İnkübasyonun gerçekleştirildiği 4°C'de *L. monocytogenes*'in ortamdaki sayısı arttığı gibi mikroflorada yer alan diğer bakterilerin gelişimi hiç olmamakta ya da önemsenmeyecek düzeyde olmaktadır (Çelik ve Temiz 1991, Donnelly ve Nyachuba 2007). *Listeria* varlığı yönünden araştırılacak olan 50 g ya da ml numune, 450 ml Nutrient Broth'da homojenize edilir. Homojenizasyon sonrası 4°C'de 8 haftaya kadar inkübasyona bırakılır. Sırasıyla bir, dört ve sekiz hafta sonunda soğukta zenginleştirme ortamından 1 ml, 9 ml selektif buyyon (örn., nutrient buyyon) içeren tüplere aktarılır. 35°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben LPM Agar, Gum-Based Nalidixic Acid Medium ya da modifiye Mcbride's Agar gibi selektif besiyerlerinden birisine ekim yapılır. Selektif besiyerlerinde üreyen kolonilerden tipik olanlar değerlendirilerek identifikasyon aşamalarına geçilir (Çelik ve Temiz 1991, İşleyici ve Sancak 2000). Eld ve ark (1993), listeriozisden ölen hayvanların kadavralarında soğukta zenginleştirme tekniğiyle, IDF tekniğini *L. monocytogenes*'in izolasyon oranları bakımından karşılaştırmak amacıyla kullanmışlardır. Araştırmacılar IDF

tekniğinin, soğukta zenginleştirme tekniğine kıyasla daha hızlı ve spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

1.16.3. Hızlı Teknikler

Mikroorganizmaların, klasik kültür teknikleriyle gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonunun uzun zaman alması önemli bir sorundur. Hızlı teknikler, kısa raf ömrüne sahip gıdaların tüketim noktalarına sunulmadan önce *L. monocytogenes* varlığı bakımından araştırılmalarında önem arz etmektedir (Çelik ve Temiz 1991, İşleyici ve Sancak 2000).

Antijen Antikor Reaksiyonlarına Dayalı Hızlı Teknikler

Genellikle ticari olarak aynı esas temel alınarak üretilen birçok test kiti bulunmaktadır. Bunlar arasında; Unique *Listeria* Tecra, VIP *Listeria* Biocontrol Systems, Clearview *Listeria* Oxoid, *Listeria* Tek Organon Technique, *Listeria* VIA Tecra, Assurance *Listeria* EIA Biocontrol Systems, Transia *Listeria* Diffchamb, Pathalert *Listeria* spp. + *L. monocytogenes* Merck, Vidas bioMerieux ve EIA Foss Electric kitleri sayılabilir (Wagner ve Bubert 1999).

Immuno Magnetic Separation (IMS) Tekniği

Manyetik taşıyıcılar üzerinde tutulmuş antikorların (örn., monoklonal veya poliklonal antikorlar, lektinler ya da aglütininler) hedef mikroorganizma hücrelerini tutabilme prensibine dayanmaktadır. Numuneye ön zenginleştirme yapılır. Antikorları içeren süspansiyon ile karıştılır. Karışım manyetik uygulama ile ayırım ve konsantrasyon işlemine tabi tutulur. Metot ön zenginleştirme işleminden sonra 30 dk. içerisinde tamamlanabilmektedir (İşleyici ve Sancak 2000, Brehm-Stecher ve Johnson 2007). Mercanoğlu ve ark (2003) ve Hibi ve ark (2006), *L. monocytogenes* izolasyonu amacıyla IMS tekniğini kullanmışlardır.

Clearview (Oxoid) Hızlı Test Kiti

Bu yöntemde *Listeria* spp. kontaminasyonunu belirlemek amacıyla H antijeninin B tipi aranır. Numuneden 25 g ya da ml alınır ve ½ yoğunluktaki 225 ml Fraser Broth ile homojenize edilir. 30°C'de 21-24 saat inkübasyona bırakılır. Kültürden 0,1 ml, 10 ml Buffered Listeria Enrichment Broth besiyerine aktarılır. 30°C'de 21-24 saat inkübasyona bırakılır. Tüp sarsılmadan ve karışmamasına özen göstererek üst kısmından 2 ml alınır. O antijenlerinin eliminasyonu amacıyla 80°C'deki su banyosunda 20 dk. tutulur. Soğutulan ekstrakttan 135µl alınarak test

kitinin örnek alma bölmesine aktarılır. 20 dk. içerisinde mavi renk oluşumu test kitinin çalıştığını göstermektedir. Sonuç alma bölmesinde mavi çizgi oluşumu B antijeninin varlığını belirtmektedir. Dolayısıyla örnekte *Listeria* spp. olduğunu ifade etmektedir. Standart bir katı besiyerine ekim yapılarak sonucun doğrulanması ve tür identifikasyonu gerçekleştirilir (Oxoid 2011).

Singlepath (Merck) Hızlı Test Kiti

Numuneden 25 g ya da ml, 225 ml Fraser Broth içerisinde homojenize edilir. *Listeria* spp.'lerin stres faktörlerinden etkilendiği ya da hasar gördüğü tahmin ediliyorsa Fraser Broth besiyeri öncelikle 30°C'de 4 saat suplementsiz inkübe edilir. Sonra suplement ilave edilir. 30°C'de 20 saat ön zenginleştirme yapılır. Kültürden 0,1 ml, 9,9 ml Buffered Listeria Enrichment Broth besiyerine ya da tam güçlü Fraser Broth'a aktarılır. 30°C'de 18-24 saat inkübe edilir. Kültürden tüpe 1-2 ml alınır. 100°C'deki su banyosunda 15 dk. tutulur. Soğutulduktan sonra 160 µl Singlepath *Listeria* kitine uygulanır. 20 dk. sonunda kontrol bölmesinde kırmızı şerit oluşmalıdır. Test bölmesinde de kırmızı şerit görülmesi numunede *Listeria* spp. olduğunu ifade etmektedir. Standart bir katı besiyerine ekim yapılarak sonucun doğrulanması ve tür identifikasyonu gerçekleştirilir (Merck 2011).

Pathalert (Merck) Hızlı Test Kiti

H antijenleri yüksek inkübasyon sıcaklıklarında gelişmemektedir. Dolayısıyla H antijenlerinin tespitine yönelik testlerde yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu yöntemde *Listeria* bakterilerine özgü p60 ektraselüler proteininin tespiti amaçlanmaktadır. Yöntemin *L. monocytogenes* ve *Listeria* spp. tespitine yönelik iki çeşidi vardır. *L. monocytogenes* tespiti için numuneden 25 g ya da ml alınır. ½ yoğunluktaki 225 ml Listeria Enrichment Broth ya da PALCAM Broth besiyerinde homojenize edilir. 37°C'de 16-24 saat inkübasyona bırakılır. Kültürden 0,1 ml, 10 ml tam yoğunluktaki Listeria Enrichment Broth ya da PALCAM Broth besiyerine aktarılır. 37°C'de 22-24 saat inkübasyona bırakılır. Kültürden tüpe 1 ml alınır. O antijenlerinin eliminasyonu amacıyla 95°C'deki su banyosunda 10 dk. tutulur. 14000 rounds per minute (rpm)'de 1 dk. santrifüjlenir. Sıvı kısım mikrotitrasyon pleytlerine aktarılır. ELISA okuyucusunda, 450 nm'de değerlendirilir (İşleyici ve Sancak 2000, Merck 2011).

1.17. *Listeria monocytogenes*'i Genotiplendirme Metotları

Listeriozise neden olan gıda maddesinden izole edilen *L. monocytogenes* izolatının, üretim hattının herhangi bir noktasından izole edilen izolat ile aynı ya da benzer olduğunu ortaya koymak önem arz etmektedir. Kontaminasyon kaynaklarının saptanabilmesine olanak sağlayan bu durum, genotiplendirme metotlarının uygulanmasıyla mümkün olabilmektedir. Genotiplendirmeyle kontaminasyon kaynaklarının tespitinin yanı sıra izolatların klonal ilişkileri de açıklanabilmektedir (Fugett ve ark 2007).

L. monocytogenes'in genotiplendirilmesinde geleneksel fenotipik metotlar (örn., serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme, antibiyotik duyarlılık testi) ve moleküler genotipik metotlar [örn., Arbitrarily-Primed PCR (AP-PCR) (Louıe ve ark 1996), Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) (Dhanashree ve ark 2003), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Lew ve Desmarchelier 1992), Ribotyping (Jeffers ve ark 2001), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Louie ve ark 1996)] kullanılmıştır.

1.17.1. Geleneksel Fenotipik Metotlar

Geleneksel alt tiplendirme yöntemleri iş yükü fazla, uzun zaman alan, değişken sonuçlar verebilen metotlardır.

Serotiplendirme

L. monocytogenes hücre yüzeyinde farklı antijenik yapılar bulunmaktadır. Antijenik yönden farklılığı sağlayan bu yapılar flagella ve fimbria gibi ekstraselüler organeller, membran proteinleri, lipoteikoik asitler gibi birçok farklı yüzey yapıları tarafından üretilmektedir. Serolojik yöntemlerle bu farklılıkları belirlemek mümkündür. Serotiplendirmede esas, O ve H antijenlerinin faktör antiserumları ile *L. monocytogenes*'in alt tiplerinin ortaya konmasıdır (Graves ve ark 2007).

Serotiplendirme amacıyla, günümüze kadar farklı firmalar tarafından (örn., Eurobio, Denka Seiken, Difco Bacto) üretilen her bir antijen türüne spesifik aglutininleri içeren antiserumlar kullanılmıştır. Birçok araştırmada, Denka Seiken Firması'nca üretilen antiserumlar *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirmelerinde kullanılmıştır. Miettinen ve ark (1999) dondurma üretim tesisi işlem hattı, çevresel kaynaklar, alet-ekipman, çiğ süt ve dondurma örneklerinden, Lyytikainen ve ark (2000) ile Borucki ve Call (2003) insan ve hayvanlarda görülen klinik vakalar ve çevresel kaynaklardan, Palumbo ve ark (2003) gıdalardan, çevreden ve klinik vakalardan, Holko ve ark (2002) çiğ süt ve peynir örneklerinden, Dümen ve

ark (2011) süt ve ürünlerinden, Chou ve Wang (2006) deniz ürünlerinden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarını Denka Seiken antiserumlarıyla serotiplendirmişlerdir. Bunun yanı sıra Giovannacci ve ark (1999) domuz kesim yerlerinden, Dauphin ve ark (2001) dondurulmuş füme somon üretimi yapan üç ayrı işletmenin üretim aşamalarının farklı noktaları, işletme çevresi ve alet-ekipmandan elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarını Eurobio Firması'nca, Sağun ve ark (2001) çiğ süt ve otlu peynirlerden, Akpolat ve ark (2004) değişik gıdalardan elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarını Difco Bacto Firması'nca üretilen antiserumlarla serotiplendirmişlerdir.

Bakteriyofaj Tiplendirme (Faj Tiplendirme)

L. monocytogenes izolatları standart bir faj seti kullanılarak direnç ve duyarlılıkları bakımından tiplendirilebilmektedir. Yüksek ayırım gücü nedeniyle faj tiplendirme metotları serotiplendirme ile birlikte, moleküler tiplendirme metotlarından önce sıkça kullanılmıştır (Graves ve ark 2007).

Bakteriyosin Tiplendirme

Bakteriyosinler genellikle sentezlendiği bakterinin genetik yapısına yakın bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterirler. Hedef ve translokasyon sistemlerinin spesifite göstermesi nedeniyle bakteriyosinlerin yalnız benzer reseptör ve translokasyon sistemine sahip olan az sayıda hedefi tanıdığı düşünülmektedir (Akkoç ve ark 2009). Bu özelliklerinden faydalanılarak mikroorganizmaların alt tiplendirmelerinde kullanılabilmektedirler.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

L. monocytogenes izolatları antibiyotiklere farklı duyarlılık ya da direnç cevapları verebilmektedir. Bu farklılık epidemiyolojik olarak önem arz etmektedir. İzolatların bu özelliklerinden faydalanılarak alt tiplendirme yapılabilmektedir (Graves ve ark 2007).

1.17.2. Moleküler Genotipik Metotlar

Moleküler alt tiplendirmelerde yöntemleri *L. monocytogenes*'in epidemiyolojisinin anlaşılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemler son zamanlarda yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu DNA temelli metotlar; bakteriyel DNA restriksiyon sindirim enzimleri kullanılarak, DNA fragmentlerinin bant desenlerinin oluşturulmasını ve bakteriyel alt tanımlamaların yapılmasını amaçlar (Sauders ve Wiedmann 2007).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP, genomik DNA'nın tümünün parçalanmasından elde edilen restriksiyon fragmentlerinin selektif PCR ile amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. AFLP; DNA'nın restriksiyonu ve oligonükleotid adaptörlerinin bağlanması, restriksiyon fragmentlerinin selektif amplifikasyonu ve amplifiye fragmentlerin jel analizinden oluşur. Yöntem, edinilmiş sekans bilgisine gerek duyulmadan herhangi bir kaynaktaki DNA'dan parmak izi üretmek için kullanabilmektedir (Graves ve ark 2007). Ripabelli ve ark (2000) ile Guerra ve ark (2002), AFLP yöntemini kullanarak *L. monocytogenes* izolatlarını tiplendirmişlerdir.

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE)

MEE, metabolik enzimlerin elektroforetik mobilite farklılıklarının ortaya konması esasına dayanmaktadır (Graves ve ark 2007).

MEE yöntemi; insan, hayvan ve çevresel kaynaklardan (Boerlin ve Piffaretti 1991), gıdalardan (Bibb ve ark 1990, Boerlin ve Piffaretti 1991) elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının tiplendirmesinde kullanılmıştır.

Chromosomal DNA Restriction Endonuclease Analysis (REA)

Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kromozomal DNA'nın belirli bölgelerinden kesilmesiyle uygulanan bir metottur. Bu enzimler yüksek özgüllüklerinden dolayı kromozomal DNA'nın istenen bazlardan kesilmesini ve DNA'nın agaroz jel profilinin ifade edilmesini sağlamaktadırlar. Metotta karşılaşılabilen en büyük problem yüzlerce benzer DNA profillerinin karşılaştırılmasında ortaya çıkmaktadır (Graves ve ark 2007).

Nocera ve ark (1990) İsviçre, Casolari ve ark (1990) İtalya'da görülen listeriozis olguları ve gıdalardan, Aguado ve ark (2004), bir sebze işleme tesisinde dondurulmuş hazır gıda, sebze örnekleri ve işletme çevresinden izole ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarını genotiplendirmede REA yöntemini kullanmışlardır.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP; DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesime uğratıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğin yorumlanması esasına dayanmaktadır. RFLP analizi, bakteriyel kromozom ve ekstra kromozomal DNA'nın veya viral genomun restriksiyon profillerini belirlemede kullanılmaktadır (Swaminathan ve Matar 1993).

Yöntem; DNA'nın izolasyonu, DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesi olmak üzere dört temel aşamada gerçekleştirilmektedir (Swaminathan ve Matar 1993).

RFLP yönteminde, PCR ile amplifiye edilen çeşitli suşlara ait hedef sekanslarla, restriksiyon fragmentlerinin oluşturduğu bantların karşılaştırılması yapılmaktadır (Swaminathan ve Matar 1993).

Bazı araştırmacılar (örn., Lew ve Desmarchelier 1992, Vines ve ark 1992) RFLP yöntemini kullanarak *L. monocytogenes* izolatlarını tiplendirmişlerdir.

Ribotyping

Ribotiplendirme, suşların RFLP yöntemiyle tanımlandığı bir çeşit Southern hibridizasyon analiz tipidir. Southern blot analizleriyle yalnızca spesifik kromozomal lokusla bağlantılı olan kısmi restriksiyon fragmentleri belirlenir. Bu nedenle çok az miktardaki DNA fragmenti analiz edilir. Ribotiplendirme, nitroselüloz ya da naylon membran üzerindeki jel matriks üzerinde elektroforetik olarak ayrıştırılmış kromozomal DNA restriksiyon fragmentlerinin taşınmasını içerir. DNA fragmentlerinin immobilizasyonundan sonra 16+23S ribozomal RNA (rRNA) veya rekombinant DNA (rDNA) problarıyla membran uygun bir şekilde işaretlenir. Çünkü, rRNA'ları kodlayan genler oldukça korunmuşlardır. *E. coli* rRNA'sı veya *E. coli*'nin klonlanmış ribozomal operon klonu (rrnB) *L. monocytogenes*'i işaretlemede kullanılabilir. Genelde, ribotip ürünleri, suşların in vitro ve in vivo pasajlarından sonra oldukça dayanıklı ve üretilebilirdirler. Bu nedenle, epidemiyolojik veya filogenetik çalışmalar için en uygun metot olarak kullanılabilmektedir (Graves ve ark 2007).

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Yöntem; araştırılan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş tek bir 9-10 base pair (bp) oligonükleotid parçasının, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanması ve PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır (Graves ve ark 2007).

RAPD tekniğinin PCR aşamasında rastgele dizilimdeki primerler kullanılarak, bu primerlerin RAPD'in yapışma fazı esnasında tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanması sağlanır. Her bir RAPD primeri aynı PCR döngüsünde farklı lokuslardan farklı sayılarda DNA fragmentelerini çoğaltma potansiyeline sahiptir. Diğer bir ifadeyle farklı primerler farklı RAPD polimorfizmlerini üretebilmektedir. Amplifikasyonla elde edilen çoğaltma ürünü, radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek

incelenir. Örneklerin hepsinde bulunan RAPD bantları monomorfik olarak kabul edilir. Diğer örneklerde bulunmayan ya da farklı mobilite sergileyenler polimorfik olarak tanımlanır. Elde edilen RAPD bantlarında sergilenen polimorfizmler, örnekler arasındaki genetik ilişkilerin ortaya konmasında önem arz etmektedir (Devrim ve Kaya 2006).

Bazı araştırmacılar (Örn., Lawrence ve ark 1993, Byun ve ark 2001) RAPD tekniğiyle tiplendirme yapmışlardır.

Repetitive Element Based Subtyping (REB)

PCR'ın tekrarlayan element temelli alt tiplendirme metotu olan bu yöntemde kullanılan primerler kısa tekrarlayan dizilerden oluşan ekstrajenik ya da genel interjenik rRNA oligonükleotidleri özelliklerindedir. Baz dizilimleri, etkili çoğaltılan DNA parçacıkları arasında, iki dizilimin birbirine çok yakın yerleşmesini sağlamak üzere bakteriyel kromozom etrafında birçok bölgede tipik olarak bulunurlar (Graves ve ark 2007). Van Kessel ve ark (2005), tekrarlayan element temelli alt tiplendirme metodunu kullanmışlardır.

Selective Restriction Fragment Amplification (SRFA)

SRFA metodunun esası, genomik DNA'nın restriksiyon enzimiyle kesilmesi sonucu oluşan DNA parçalarının bir grubunun selektif amplifikasyonuna dayanır (Yağcı 2011).

İki varyasyonu bulunmaktadır. Birinci durumda iki farklı restriksiyon enzimi ve amplifikasyon için iki primer kullanılmaktadır. İkinci durumda ise tek enzim ve tek primer kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan yöntemde bakteriyel DNA ekstrakte edilerek saflaştırılmakta ve iki adet restriksiyon enzimiyle kesilmektedir. Restriksiyon ürünü olan DNA segmentleri her bir enzim için hazırlanmış olan adaptörlerle bağlanmaya sokulmaktadır. Oluşan DNA'nın amplifikasyonunu takiben amplifikasyon ürünü jel elektroforezine tabi tutulur (Yağcı 2011).

DNA Macrorestriction Analysis by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

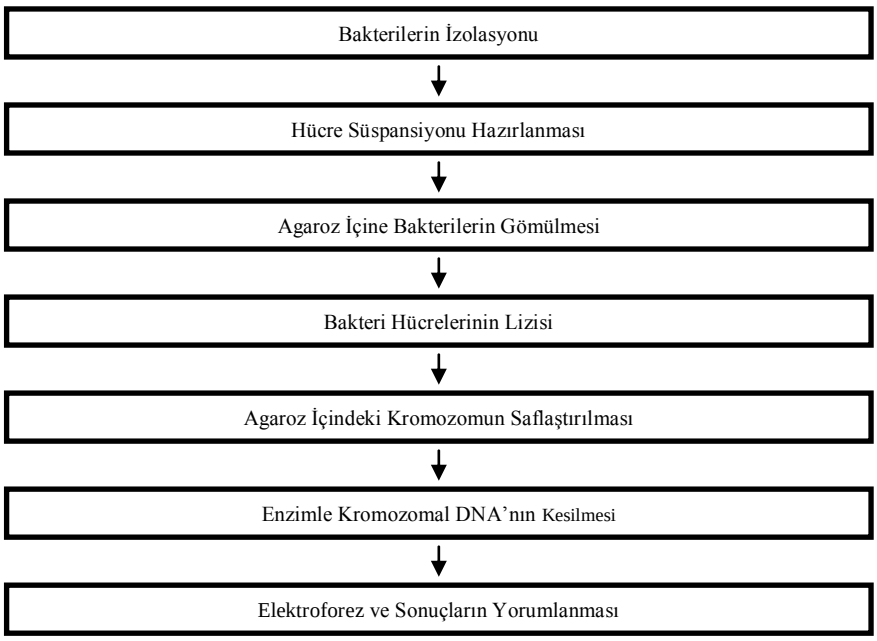
PFGE Uygulamalı DNA Makro Restriksiyon analizi; enzimatik olarak parçalanan ve hücresel proteinleri sindirilen kromozomal DNA içeren bakteri hücrelerinin agaroz jelde gömülerek değişken alanlı jel elektroforezine tabi tutulması ve DNA fragmentlerinin ayrılarak tanınması işlemidir (Graves ve ark 2007).

PFGE Uygulamalı DNA Makro Restriksiyon analizi, 40 kb'den daha büyük DNA fragmentlerinin tanınmasına olanak sağlamaktadır. Genellikle 1 mb'den daha büyük doğrusal çift iplikli DNA molekülleri, jelin por büyüklüğünün doğrusal

DNA'nın jelde göç edebilmesi için yeterli olmamasından dolayı, aynı hızla göç ederler. Bu durum, DNA fragmentlerinin benzer bant profilleri sergilemesine neden olmaktadır. Dolayısıyla fragment uzunlukları farklılıklarının görüntülenmesini engellemektedir. Por büyüklüğü, konsantrasyonu %0,1 olan agaroz kullanılarak artırılabilmekte ancak bu durumda jel dayanıksızlaşarak kırılgan bir yapı almakta ve kullanımı güçleşmektedir. Bu problem, 1984 yılında geliştirilen PFGE tekniği ile çözülmüştür (Graves ve ark 2007, Arı 2008).

Schwartz ve Cantor tarafından geliştirilen PFGE, restriksiyon enzim analizlerinde kullanılan agaroz jel elektroforezinin jel üzerindeki elektrik alanının yönünün değiştirilebilmesine olanak sağlamaktadır. PFGE uygulamasında, DNA molekülleri belirli zaman aralıklarında birbirlerine farklı açıda iki elektriksel alan etkisinde bırakılır. Standart jel elektroforezinden en belirgin farkı, uygulanan elektrik alanının sabit olmaması, ayırma sırasında yönünün ve şiddetinin tekrarlanan biçimde değiştirilebilmesidir. DNA molekülleri bir elektriksel akıma uygun hareket ederken, kısa bir süre sonra diğer akıma uygunluk göstermek zorunda kalırlar. Sonuçta küçük moleküller elektriksel alan değişimlerine daha çabuk uyum sağladıklarından daha hızlı hareket ederler (Graves ve ark 2007, Arı 2008).

Moleküler tiplendirme yöntemleri arasında altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi bir çok aşamadan (Şekil 1.8) (Durmaz ve ark 2007) oluşmaktadır.



Şekil 1.8. Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemi Aşamaları.

PFGE, pek çok gıda kaynaklı patojen için son derece ayrımcı ve tekrarlanabilir DNA temelli bir alt tiplendirme metodudur. ABD'de 1993 yılında *E. coli* O157:H7'nin neden olduğu salgında, klinik karakterizasyon ve gıda izolatlarının araştırılması amacıyla uygulanmıştır. Bölgesel restoran zincirine sahip firma tarafından üretilen hamburger köfteleri ile hastalardan izole edilen izolatlar arasındaki ilişki, PFGE alt tiplendirme çalışmalarıyla ortaya konmuştur. Yirminci yüzyılın başlarına kadar gıda kaynaklı salgınlar, genellikle tek bir üretim yeri, restoran ya da sosyal bir etkinliğe bağlı olarak lokal düzeyde gerçekleşmiştir. Günümüzde ise, gıdaların geniş tüketici kitlelerine ulaştırılabilmesinin kolaylaşmasından, dünyanın birçok farklı bölgesini etkilemektedir. Bu durum, salgınların epidemiyolojilerinin araştırılmasında zorluklara neden olmaktadır (Norton ve Braden 2007).

Gıda kaynaklı salgınların epidemiyolojisini ortaya koymada serotiplendirme, plazmid profillerinin belirlenmesi ve faj tiplendirmesi yöntemleriyle başlayan alt tiplendirme çalışmalarının değerli gelişmeler olduğu kanıtlanmıştır (Norton ve Braden 2007). Ancak bu alt tiplendirme metotlarının önemli dezavantajları vardır. Örneğin, veri normalleştirme ve analizler için yazılım paketleri olmasına rağmen bu metotların standardizasyonu zordur. Laboratuarlar arasında bilgi alış verişi yetersizliği bulunmaktadır. Farklı laboratuarlarda birbirinden farklı metodların uygulanması nedeniyle alt tiplerin karşılaştırılmasında problemler olabilmektedir (Durmaz ve ark 2007, Graves ve ark 2007, Sauders ve Wiedmann 2007). Alt tiplendirme metotlarının etkinliğinin arttırılması için farklı laboratuar sonuçlarının karşılaştırılabilmesi, maliyetleri, zaman gereksinimleri gibi konularda standardizasyon gerekmektedir (Norton ve Braden 2007). Nitekim ABD'de CDC, halk sağlığı ve gıda düzenleme laboratuarları tarafından kullanılabilecek bir ağ (PulseNet) kurmuştur. Bu veritabanı ağı patojen bakteriler için ortak bir kaynak niteliğindedir. PulseNet'in PFGE veritabanları ağı sayesinde, bakterilerin alt tiplendirmelerinde standart metodlar oluşturulabilmektedir. Bu metodların kullanılmasıyla, hızlı bir şekilde internet aracılığıyla farklı yerlerden gıda kaynaklı patojenlerin PFGE profillerini karşılaştırmak mümkün olmaktadır (Graves ve ark 2007).

Halk sağlığı laboratuarları ile işbirliği içerisindeki laboratuarların çalışmaları neticesinde gıda kaynaklı hastalıklarda ve salgınlarda hızlı bir moleküler gözetim amacıyla halk sağlığı laboratuar ağı geliştirmek, PFGE için CDC tarafından bir

standart oluşturulması ve PulseNet veritabanı ağının geliştirilip PFGE profillerinin hızla karşılaştırılabilmesi resmi amaç halini almıştır. Katılımcı laboratuarların sertifikalı PFGE analizlerini yapabilmesi ve sonuçları karşılaştırabilmeleri mümkün olmaktadır. PulseNet genişleyerek ABD'deki tüm halk sağlığı laboratuarları ve USDA, FSIS, FDA, CFSAN gibi çeşitli büyük ülke sağlık laboratuarlarında yerini almıştır. PulseNet *L. monocytogenes*'inde dahil olduğu beş gıda patojenini rutin olarak izlemektedir. PulseNet ağları Kanada, Avrupa, Latin Amerika, Pasifik ve Çin olmak üzere yapılandırılmıştır (Norton ve Braden 2007).

PulseNet veritabanı ağına üye laboratuarlar tarafından yapılan rutin analiz sonuçlarının ve *L. monocytogenes* alt tiplendirme verilerinin tek bir kaynakta toplanması, listeriozis salgınlarının epidemiyolojilerini ortaya koymayı kolaylaştırmıştır (Graves ve ark 2007).

PulseNet tarafından rutin olarak 1998 yılında başlatılan gözetimler için izolatların analizlerinde 30 saat içinde sonuç almaya imkan veren standart bir metot geliştirmiştir (Norton ve Braden 2007). Kuruluşundan itibaren PulseNet, halk sağlığı laboratuarlarında *L. monocytogenes* izolatlarının rutin alt tiplendirmeleri çalışmalarında elde edilen izolatları kaydetmektedir (Painter ve Slutsker 2007).

Günümüzde PFGE metodu listeriozis vakalarında küme algılama, epidemiyolojik araştırmalar ve gıda üretim yerlerinin izleme prosedürleri bakımından yaygın bir biçimde *L. monocytogenes*'in moleküler alt tiplendirmesinde kullanılır hale gelmiştir (Graves ve ark 2007).

Brosch ve ark (1991) *L. monocytogenes*'in alt tiplendirmesinde 4b suşlarını değerlendirerek ilk kez PFGE metodunun yararlılığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, ApaI, SmaI ve NotI enzimlerini kullanarak diğer tiplendirme metotlarından farksız olduğunu ve suşlar arasındaki ilişkinin PFGE ile gösterilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Graves ve ark 2007).

Okwumabua ve ark (2005), insan listeriozislerinin epidemiyolojilerini belirlemek amacıyla hayvansal kaynaklı gıdalar ile menenjit, meningoensefalit, ensefalit, mastit ve abort vakalarından izole ettikleri 21 *L. monocytogenes* izolatı arasındaki genetik bağlantıları PFGE tekniğiyle ortaya koymuşlardır. İzolatlardan beşini 1/2a, altısını 1/2b, dokuzunu 4b ve bir izolatı atipik olarak tespit etmişlerdir. Keçi, koyun ve büyükbaş beyinlerinden izole edilen izolatlar arasında PFGE bantları bakımından benzerlik olduğunu fakat diğer izolatlar arasında benzerlik bulunmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar dendogram analizleri sonucunda elde

ettikleri serotiplere göre kümelenmiş izolat desenlerini CDC Ulusal PulseNet veritabanında yer alan insan listeriozisleri ile ilişkili izolatların PFGE tipleriyle karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri 21 izolatın altısının (%29) ABD'de değişik coğrafi bölgelerden tespit edilen insan listeriozis salgınlarından izole edilmiş PFGE kalıplarıyla ortak soydan geldiklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar hayvansal kaynaklı gıdaların *L. monocytogenes* enfeksiyonunda önemli bir rezervuar olabileceğini ve PFGE kalıplarının PulseNet veritabanlarında biriktirilmesinin enfeksiyonun epidemiyolojisinin anlaşılabilir kılınması bakımından ön koşul olduğunu ifade etmişlerdir.

Zhang ve ark (2007), tüketime hazır et ürünleri ve çiğ tavuk etlerinden elde ettikleri 167 *L. monocytogenes* izolatını PFGE tekniğiyle genotiplendirmişlerdir.

Neves ve ark (2008), Portekiz'de insanlardan elde edilen izolatların, İngiltere, ABD ve İsviçre'de meydana gelen salgınlardaki izolatlarla özdeş olduğunu PFGE tekniğiyle ortaya koymuşlardır.

Dauphin ve ark (2001), dondurulmuş füme somon üretimi yapan üç ayrı işletmenin üretim aşamalarının farklı noktaları, işletme çevresi ve alet-ekipmandan topladıkları numunelerde *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. Elde ettikleri izolatların genotiplendirmelerini ApaI ve SmaI enzimlerini kullanarak PFGE tekniğiyle gerçekleştirmişlerdir.

Senczek ve ark (2000), bir et işleme tesisinin farklı işleme alanlarından ve et ürünlerinden iki yılda elde ettikleri 81 adet *L. monocytogenes* izolatının genotiplendirmesini ApaI ve SmaI enzimlerini kullanarak PFGE tekniğiyle yapmışlardır.

Giovannacci ve ark (1999), domuz kesim yerlerinden elde ettikleri 287 *L. monocytogenes* izolatı; Gravesen ve ark (2000), domuz eti ve ürünleri ve domuz eti işleme tesislerinden elde ettikleri 48 *L. monocytogenes* izolatı arasındaki klonal ilişkileri belirlemek için ApaI enzimiyle PFGE tekniğini kullanmışlardır.

Chou ve Wang (2006), deniz ürünlerinden elde ettikleri 71 *L. monocytogenes* izolatını, insanlarda görülen listeriozis olgularından elde edilen 57 klinik izolatla genetik ilişkileri bakımından karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar klonal ilişkileri ortaya koymak için ApaI ve AscI enzimleriyle PFGE tekniğini uygulamışlardır.

Hamdi ve ark (2007), Cezayir'de süt üretim çiftliklerinden aldıkları sütler ve süt tankerlerinden elde ettikleri 11 *L. monocytogenes* izolatını ApaI ve AscI enzimlerini kullanarak PFGE tekniğiyle genotiplendirmişlerdir.

Yde ve Genicot (2004), Belçika'da 2001 yılında insanlarda görülen listeriozis vakalarından elde ettikleri 48 *L. monocytogenes* izolatı arasındaki klonal ilişkileri belirlemek için ApaI ve AscI enzimleriyle PFGE tekniğini uygulamışlardır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Çalışma, salamura beyaz peynir üretiminin yapıldığı dört farklı işletmede gerçekleştirildi. İşletmelerde yapılan gözlemler ve literatür bilgilere dayanarak, üretim prosesinde yer alan 16 farklı noktadan numuneler toplandı (Çizelge 2.1). Numuneler birer ay arayla üç kez alındı. Her işletmeden 48, toplamda 192 numune *L. monocytogenes* varlığı bakımından incelendi.

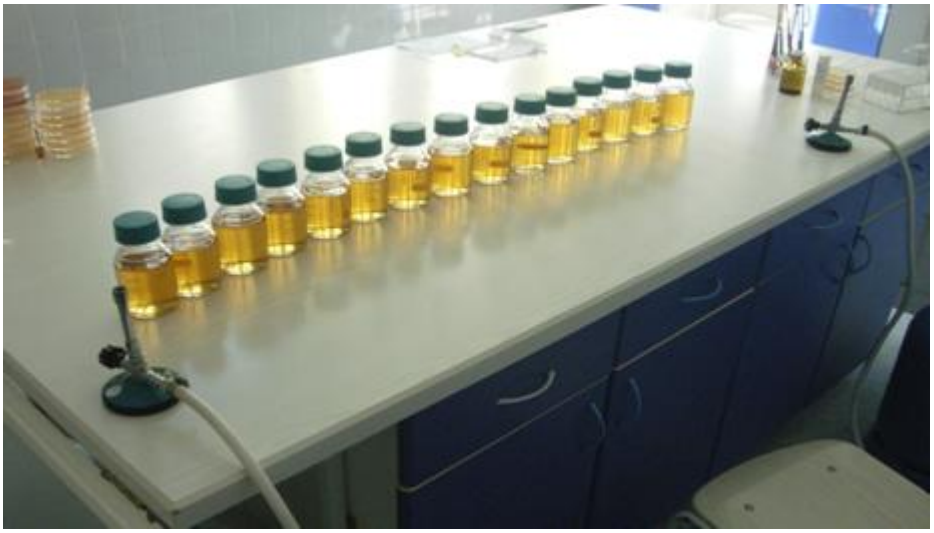
Çizelge 2.1. Numune Alınan Noktalar.

Hammadde, ara ürün ve son ürün	İşletmeye gelen çiğ süt
	Pastörize süt
	Peynir teknesindeki mayalanmamış süt
	Ara ürün peynir pıhtısı
	Peynir altı suyu
	Teleme
	Son ürün (tenekelerde satışa hazır durumdaki peynir)
Katkı maddeleri ve ingrediyenler	Starter kültür
	Maya
	Kalsiyum klorür
Alet-ekipman ve çevresel kaynaklar	Süt toplama tanklarının iç yüzeyi
	Peynir teknelerinin iç yüzeyi
	Cendere bezi
	Baskı kasaları
	Salamura suyu
	Duvar-zemin yüzeyi

2.1.1. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Gereçler ve Hazırlanışları

Listeria Enrichment Broth

Listeria Enrichment Broth Base (Merck-KGaA 64271 Darmstadt, Germany-1.11951) besiyerinden 36 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda (Köttermann D-3162) eritilerek pyrex şişelere 225'er ml dağıtıldı (Resim 2.1). Otoklavda (DH-WAC 010080-Daihan Scientific-WiseClave^{TM}) 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. 500 ml besiyeri için *Listeria* selektif zenginleştirme suplementinin (Merck-1.11781) bir flakonu 1 ml steril distile suda çözündürüldü.



Resim 2.1. Pyrex Şişelere Dağıtılmış Listeria Enrichment Brothlar.

Oxford Agar

Oxford Listeria Selective Agar Base (Merck-1.07004) besiyerinden 58,50 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Bir flakon selektif suplement (Merck-1.07006), 5 ml etil alkol (Merck-1.00983) - distile su karışımıyla sulandırıldı. 500 ml besiyerine 1 ml suplement eklendi. Aseptik koşullar altında steril petrilere (LP Italiana SPA-9005A-AA) dökülen besiyeri, 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi (Resim 2.2).



Resim 2.2. Oxford, Kanlı ve Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'ın Buzdolabında Muhafazası.

Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar

Tryptone Soya Agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England-CM 131) besiyerinden 40 g ve yeast ekstrakttan (Merck-1.03753) 6 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize

edildi. Aseptik koşullar altında steril petrilere dökülen besiyeri, 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Tryptone Soya Agar

Tryptone Soya Agar (Oxoid-CM 131) besiyerinden 40 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Aseptik koşullar altında steril petrilere dökülen besiyeri, 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Brain Heart Infusion Agar

Brain Heart Infusion Agar (Merck-1.13825) besiyerinden 52 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Aseptik koşullar altında steril petrilere dökülen besiyeri, 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Tryptic Soy Broth

Tryptic Soy Broth (Merck-1.05459) besiyerinden 30 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine (Isolab 077.03.001) farklı miktarlarda (1,5-5ml) aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Brain Heart Broth

Brain Heart Broth (Merck-1.10493) besiyerinden 37 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine farklı miktarlarda (1,5-5ml) aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Nutrient Broth

Nutrient Broth (Merck-1.05443) besiyerinden 8 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Tryptone Soya Yatık Agar

Tryptone Soya Agar (Oxoid-CM 131) besiyerinden 40 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Brain Heart Infusion Yatık Agar

Brain Heart Infusion Agar (Merck-1.13825) besiyerinden 52 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.



Resim 2.3. Tryptone Soya ve Brain Heart Infusion Yatık Agarları.

Brucella Broth Saklama Besiyeri

Brucella Broth (Becton Dickinson Company, Sparks MD 21152 USA-BD-211088) besiyerinden 28 g ve agardan (Merck-1.01614) 1,6 g, 850 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra 150 g gliserin (Merck-5.00190) ilave edilerek karıştırıldı. Eppendorf tüplerine 5 ml aktarıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Katalaz Solüsyonu

Katalaz testinde %3'lük H_2O_2 kullanıldı. 3 ml H_2O_2 (Merck-1.08600) üzerine 97 ml distile su ilave edildi.

Oksidaz Testi

Oksidaz test çubukları (Oxoid-BR0064A) kullanıldı.

Sulfate Indole Motility Medium

Sulfate Indole Motility Medium (Merck-1.05470) besiyerinden 30 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü ve su banyosunda eritildi. Vida kapaklı test tüplerine 10'ar ml aktarıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Kanlı agar

Blood Agar Base (Merck-1.10886) besiyerinden 40 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Defibrine kandan besiyerine 50 ml eklendi. Aseptik koşullar altında steril petrilere dökülen besiyeri, 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Nitrate Broth

Nitrate Broth (Merck-1.10204) besiyerinden 16,5 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Griess Ilosvay Solüsyonu (A)

Griess Ilosvay (A) solüsyonu, 1 g sülfanilik asit (Merck-1.00686), 100 ml 5N asetik asitte (Merck-1.00056) çözündürülerek hazırlandı.

Griess Ilosvay Solüsyonu (B)

Griess Ilosvay (B) solüsyonu, 1 g α-naftilamin (Merck-8.22291), 100 ml 5N asetik asitte çözündürülerek hazırlandı.

Metil Red-Voges Proskauer Broth

MR-VP Broth (Merck-1.05712) besiyerinden 17 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Karbonhidrat Fermentasyon Test Besiyerleri

L. monocytogenes'in biyokimyasal identifikasyonu amacıyla dekstroz (Merck-8346), eskulin (Merck-1.00842), maltoz (Merck-1.05910), mannitol (Merck-1.05982), ksiloz (Merck-1.08689) ve ramnoz (Merck-1.047369) karbonhidratları kullanıldı.

Buffered Peptone Water (Oxoid CM 1049) besiyerinden 20 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. İçerisine %0,01 konsantrasyonunda olacak şekilde fenol red (Merck-1.07241) katıldıktan sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarılarak otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Dekstroz, eskulin, maltoz, ramnoz, mannitol ve ksiloz karbonhidratlarının %5'lik solüsyonları hazırlanarak otoklavda

121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Karbonhidrat testleri aşamasında her bir steril karbonhidrat solüsyonundan steril indikatörlü peptonlu su besiyerine %1 oranında aktarıldı.

Gram Boyama Solüsyonları

Kristal Viyole Çalışma Solüsyonu

Koyu renkli muhafaza şişesine kristal viyole stok solüsyonundan (40 g kristal viyole, Merck-1.01408 + 400 ml etil alkol) 40 ml, amonyum oksalat stok solüsyonundan (16 g Amonyum oksalat, Merck-101190 + 1600 ml distile su) 160 ml karıştırılarak süzüldü.

Lugol Çalışma Solüsyonu

Koyu renkli muhafaza şişesine lugol stok solüsyonundan (25 g iyot kristalleri, Merck-1.04763 + 50 g potasyum iyodür, Merck-1.05051 + 500 ml distile su) 60 ml, distile sudan 220 ml ve %5'lik sodyum bikarbonattan 60 ml eklenerek karıştırıldı.

Safranin

0,5 g Safranin O (Merck-1.15948), 10 ml etil alkol ve 100 ml distile su ile eritildi. Bir gün bekletildi ve koyu renkli şişelere süzüldü.

2.1.2. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonunda Gereçler ve Hazırlanışları

Primerler

Gouws ve Liedemann (2005)'ın bildirdikleri hemolizin (*hly*) geni primerleri, 732 bp uzunluğunda bir bölgeyi amplifiye eden tür spesifik primer olarak Bioneer Firması'na (1000 Atlantic Avenue Alameda, CA 94501-1147) sentezlettirildi. Firmanın önerdiği miktarlarda steril bidistile su ile sulandırıldı.

•Primer A 5'- CAT TAG TGG AAA GAT GGA ATG -3'

•Primer B 5'- GTA TCC TCC AGA GTG ATC GA -3'.

dNTP Set

Fermentas Firması'nın (798 Cromwell Park Drive, Suites R-S Glen Burnie, Maryland, USA) dNTP seti (≠ R0181 Lot: 00072998) kullanıldı.

•dATP 100mM

•dCTP 100mM

•dGTP 100mM

•dTTP 100mM

Taq DNA polimeraz

Fermentas Firması'nın Taq DNA Polymerase **(**≠ EP0402 Lot: 00064242) enzimi kullanıldı.

Gen Ruler

Fermentas Firması'nın GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (≠ SM0321 Lot: 00072044) solüsyonu kullanıldı.

Elektroforez Buffer Yürütme solüsyonu (1X Tris Borate EDTA-TBE Buffer)

10X TBE buffer stok solüsyonundan (108 g tris base, AppliChem-Ottoweg 4 DE-64291 Darmstadt Germany, A2264 + 55 g borik asit, Merck-1.12015 + 20 ml 0,5 M Etilen Diamin Tetra Asetik Asit-EDTA, Merck-1.08418 + 1000 ml distile su) 100 ml alındı ve 900 ml distile su ile karıştırıldı.

Etidyum Bromid

20 mg etidyum bromid (Sigma, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen Germany, E 7637), 1,98 µl distile suyla sulandırıldı.

Agaroz Jel Solüsyonunun Hazırlanması

Jel hazırlamak için 2,7 g agaroz (Sigma A 9539)**,** 150 ml 1X TBE solüsyonunda çözündürüldü. Mikrodalga (Beko MD 1505) fırında eritildi. 50-60°C'ye soğutuldu ve 15 µl etidyum bromid eklendi.

2.1.3. *Listeria monocytogenes* İzolatlarını Serotiplendirmede Gereçler ve Hazırlanışları

Sodyum Klorid

Sodyum klorid (Merck-106400)

***Listeria* Antiserum Seti**

Antisera *Listeria* Set (Denka Seiken, Nihonbashi Kayabacho, Chuo-ku Tokyo 103-0025, Japan- 294616)

Listeria As O I/II 294548

Listeria As O I 294531

Listeria As O IV 294555

Listeria As O V/VI 294562

Listeria As O VI 294579

Listeria As O VII 294586

Listeria As O VIII 294593

Listeria As O IX 294609

Listeria As H-A 294494

Listeria As H-AB 294500

Listeria As H-C 294517

Listeria As H-D 294524

2.1.4. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının PFGE İle Genotiplendirilmelerinde Gereçler ve Hazırlanışları

Lizozim Stok Solüsyon

Lizozim solüsyon 10 mg/ml (Merck-71412-3)

Proteinaz K Stok Solüsyon

Proteinaz K (rekombinant) PCR grade 5X1ml (Fermentas-EO0492)

Sodyum Dodesil Sülfat

Sodyum dodesil sülfat (Sigma-L4390)

Ultra Pure DNA Grade Agaroz

Pulsed Field Certified Agaroz (Bio Rad, Maxted Road Hemel Hempstead, Herts HP2 7DX United Kingdom-162-0138)

Low Melt Agaroz

Low Melt Agaroz (Bio Rad-161-3112)

λ DNA Ladder

Lambda DNA/EcoRI Marker (Fermentas-SM0281)

Plug Molds

Plug Mold (Bio Rad-1703706)

Tris

Tris Base (AppliChem-A2264)

EDTA

Titriplex (Merck-1.08418)

Sarkosil

Sarkosil (Sigma-L7414)

TE Buffer

TE Buffer Molecular Biology Grade 100X (Merck-574793)

ApaI Restriksiyon Enzimi

ApaI restriksiyon enzimi (Fermentas-ER 1411)

AscI Restriksiyon Enzimi

AscI restriksiyon enzimi (Fermentas-ER 1801)

2.1.5. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testi Gereçleri ve Hazırlanışları

Müeller Hinton Broth

Müeller Hinton Broth (Merck-1.10293) besiyerinden 21 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi.

Müeller Hinton Agar

Müeller Hinton Agar (Merck-1.05437) besiyerinden 34 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edildi. Aseptik koşullar altında steril petrilere dökülen besiyeri, 37°C'de 24 saat sterilite kontrolü yapılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Antibiyotik Test Diskleri

L. monocytogenes izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla Ampisilin (Oxoid-CT 0003B-AMP 10 µg), Eritromisin (Oxoid-CT 0020B-E 15 µg), Gentamisin (Oxoid-CT 0024B-CN 10 µg), Kloramfenikol (Oxoid-CT 0013B-C 30 µg), Penisilin (Oxoid-CT 0043B-P 10 IU), Sefalotin (Oxoid-CT 0010B-KF 30 µg), Streptomisin (Oxoid-CT 0047B-S 10 µg), Tetrasiklin (Oxoid-CT 0054B-TE 30 µg), Vankomisin (Oxoid-CT 0058B-VA 30 µg), Sülfametoksazol/Trimethoprim (Oxoid-CT 0052B-SXT 25 µg) antibiyotik test diskleri kullanıldı.

2.1.6. Liyofilize Referans Suşlar

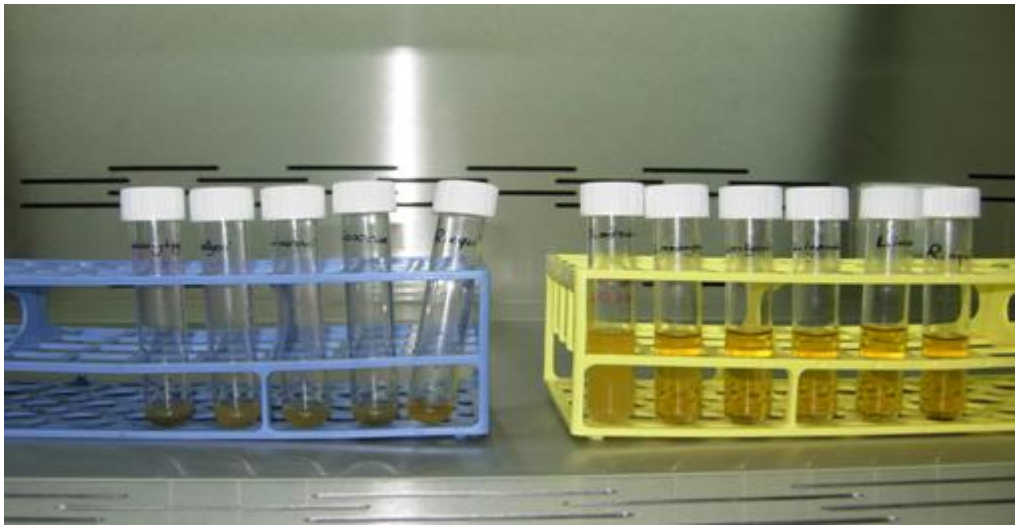
Biyokimyasal ve moleküler identifikasyonda kontrol amacıyla *L. monocytogenes* 4b (American Type Culture Collection, ATCC 13932), *L. ivanovii* (ATCC 19119), *L. innocua* 6a (ATCC 33090), *L. seeligeri* (ATCC 35967), *Rhodococcus equi* (ATCC 6939), *S. aureus* (ATCC 25923) (Resim 2.4) referans suşları kullanıldı.



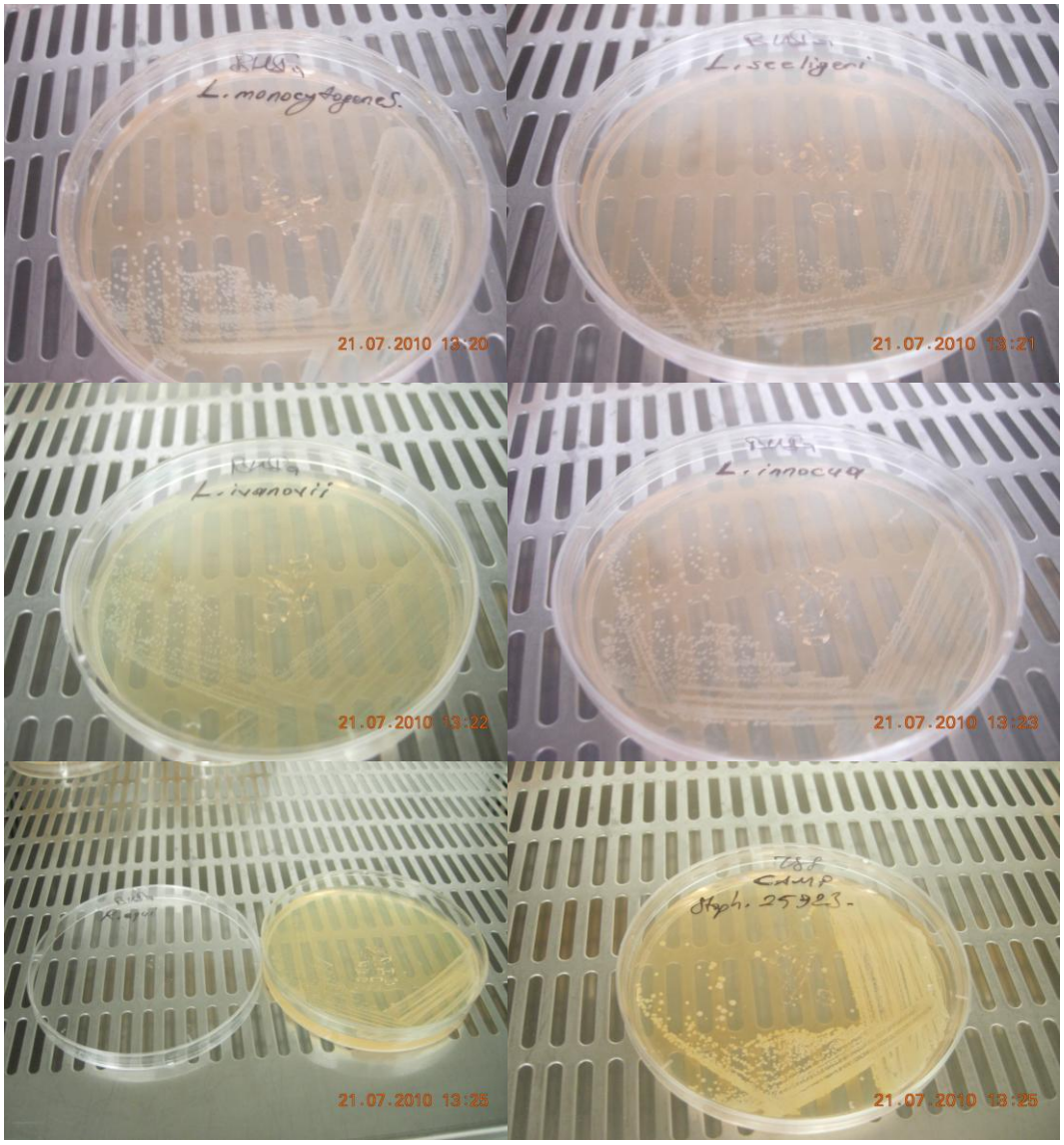
Resim 2.4. Liyofilize Referans Suşlar.

2.1.7. Liyofilize Referans Kültürlerin Aktive Edilmesi ve Stoklama

Biyogüvenlik kabininde (Chemocell LRCx-U.V) *Listeria* spp. ve *R. equi* liyofilize referans suşları, 1,5 ml Brain Heart Broth bulunan test tüplerine aktarıldı (Resim 2.5). 37°C'de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. *S. aureus* referans suşu için aynı işlemler Tryptic Soy Broth içerisinde gerçekleştirildi. Canlandırılan suşlar araştırma süresince kullanılmak amacıyla broth ve agarlarda çoğaltıldı (Resim 2.6). Uzun süreli muhafaza için, yatık agarlara (Resim 2.7) ve %15 gliserinli Brucella Broth içeren eppendorf tüplerine aktarıldı. Eppendorf tüpler, kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi.



Resim 2.5. Referans Suşların Brain Heart ve Tryptic Soy Brothlarda Pasajlanması.



Resim 2.6. Tryptone Soya ve Brain Heart Infusion Agar Besiyerlerinde Üremiş Referans Suşlar.



Resim 2.7. Referans Suşların Yatık Agarlarda Muhafazası.

2.2. Yöntem

İşletmelerden alınan numuneler soğuk zincir altında laboratuara getirildikten sonra ilk aşamada *L. monocytogenes*'in kültürel yöntemle izolasyonu ve identifikasyonu, ikinci aşamada izolatların PCR ile doğrulanması, üçüncü aşamada antiserumlarla serotiplendirmeleri, dördüncü aşamada PFGE tekniğiyle genotiplerin tespiti gerçekleştirildi.

2.2.1. Numune Alım Metodu

Hammadde, peynir ve katkı maddelerinden en az 200 g numune aseptik koşullar altında sterilize pyrex şişelere alındı. Yüzeylerden ve çevresel materyallerden numuneler eküvyonlu svap (Cultiplast SWAB CE 0051) yardımıyla alındı. Ortalama 50 cm^2'lik bir alan hesaplanarak 25 ml Listeria Enrichment Broth içeren tüplere aktarıldı (Harrigan 1998, Erkmen 2007).

2.2.2. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyonu

L. monocytogenes'in izolasyon ve identifikasyonunda FDA (Hitckins 2003) tarafından önerilen metot kullanıldı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyon ve İdentifikasyon Aşamaları.

2.2.3. Örnek Hazırlama

Örnekler numune alma, taşıma ve depolama aşamalarında soğuk zincir altında tutularak laboratuara getirildi. Aseptik koşullarda steril homojenizatör poşetlerine alınan 25 g katı ve sıvı numuneler üzerine 225 ml Listeria Enrichment Broth eklendikten sonra homojenizatörde (Lab-Blender 400-BA6021) (Resim 2.8) 2 dk. homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası örnekler pyrex şişelere (Resim 2.9) aktarıldı.



Resim 2.8. Örnek Hazırlama İşlemleri.



Resim 2.9. Örnek Aktarılmış Listeria Enrichment Brothlar.

2.2.4. Ön Zenginleştirme

Örnekleri içeren Listeria Enrichment Broth'larda 30°C'de 4 saat ön zenginleştirme (Resim 2.10) yapıldı. Sonrasında Listeria Enrichment Broth selektif suplementi eklenerek 44 saat selektif zenginleştirme (Resim 2.11) yapıldı.



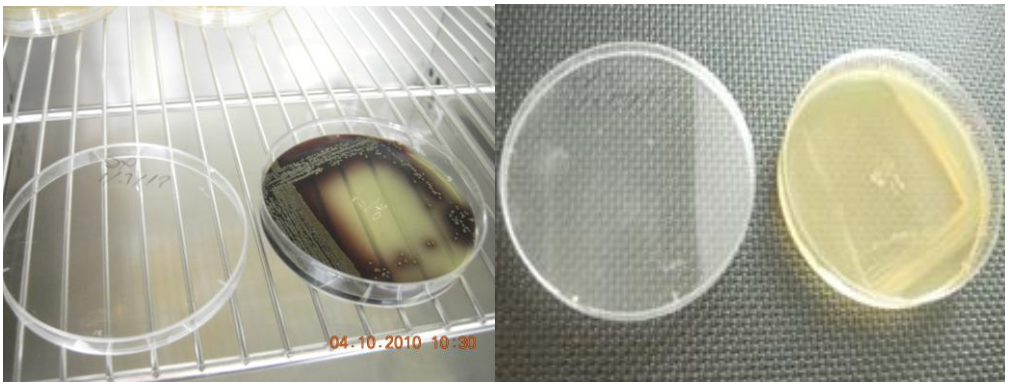
Resim 2.10. Örneklerin Suplementsiz Listeria Enrichment Brothlarda Selektif Olmayan Ön Zenginleştirmeleri.



Resim 2.11. Örneklerin Suplement İlave Edilmiş Listeria Enrichment Brothlarda Selektif Ön Zenginleştirmeleri.

2.2.5. İzolasyon

Ön zenginleştirme sonrası Oxford agara çizilerek ekim yapıldı ve 35°C'de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. Eskulin içeren Oxford agarda 2-3 mm çapında siyah-kahverengi haleli, ortası çökük siyah-yeşil kümeler tarzında gözlenen şüpheli kolonilerden 5 tanesi Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'a koloniler tek düşecek şekilde çizilerek ekildi (Resim 2.12) ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edildi.



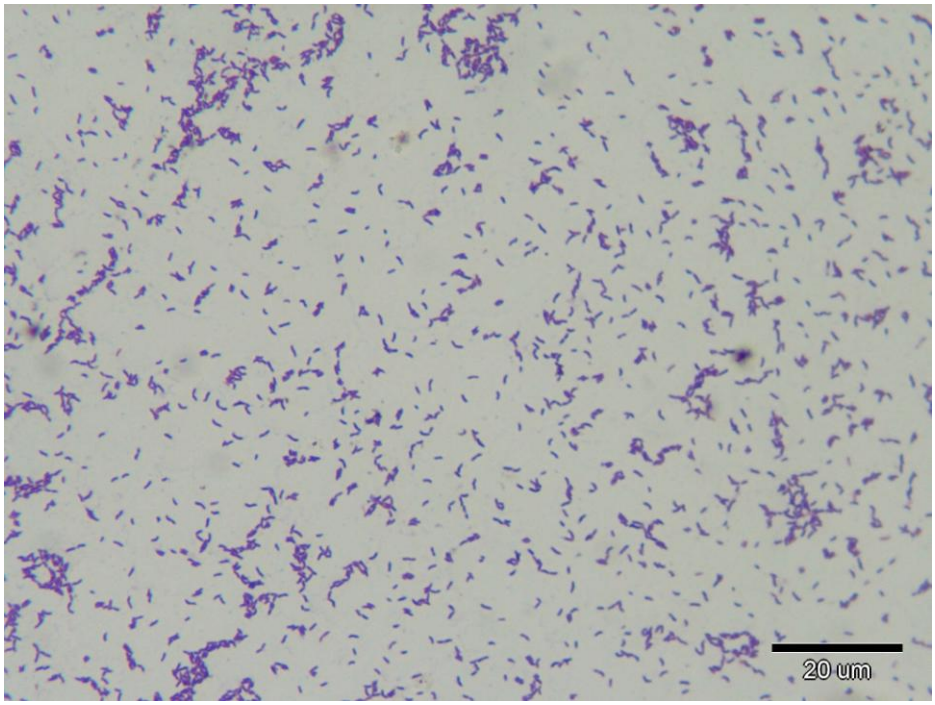
Resim 2.12. Oxford ve Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'da
Listeria Şüpheli Kolonilerin Görüntüleri.

2.2.6. *Listeria monocytogenes*'in Biyokimyasal ve Fizyolojik İdentifikasyonu

Tryptone Soya Yeast Ekstract agarda üreyen koloniler, tipik *Listeria* kolonileri olup olmadığı yönünden incelendi. Bu amaçla şüpheli kolonilere öncelikle Gram boyama, katalaz, oksidaz ve Sulfate Indole Motility medium besiyerinde hareket testi uygulandı. Tür düzeyinde identifikasyon amacıyla kanlı agarda hemoliz, nitrat redüksiyon testi, MR-VP testi, karbonhidrat fermentasyon testleri ve Christe Atkins Munch Peterson (CAMP) testi uygulandı.

Gram boyama

Şüpheli kolonilerden hazırlanan preparat kristal viyole ile 1 dk. boyandı. Distile suyla yıkandıktan sonra lugol ile 30 sn. muamele edildi. Preparat saf etil alkol ile 10-15 sn. dekolorasyon işlemine tabi tutuldu. Distile suyla yıkandı. Safranin ile 30 sn. boyandı. Mikroskopta (Boeco BM-180) 100'lük objektifte immersiyon yağı (Merck-1.04699) yardımıyla incelendi. Mor renkle boyanmış Gram pozitif, kısa çubuk ya da kokobasil tarzında görünen (Resim 2.13) bakteri hücreleri *Listeria* şüpheli olarak değerlendirildi.



Resim 2.13. *Listeria* Şüpheli Kolonilerin Gram Boyama Mikroskobik Görüntüsü.

Katalaz testi

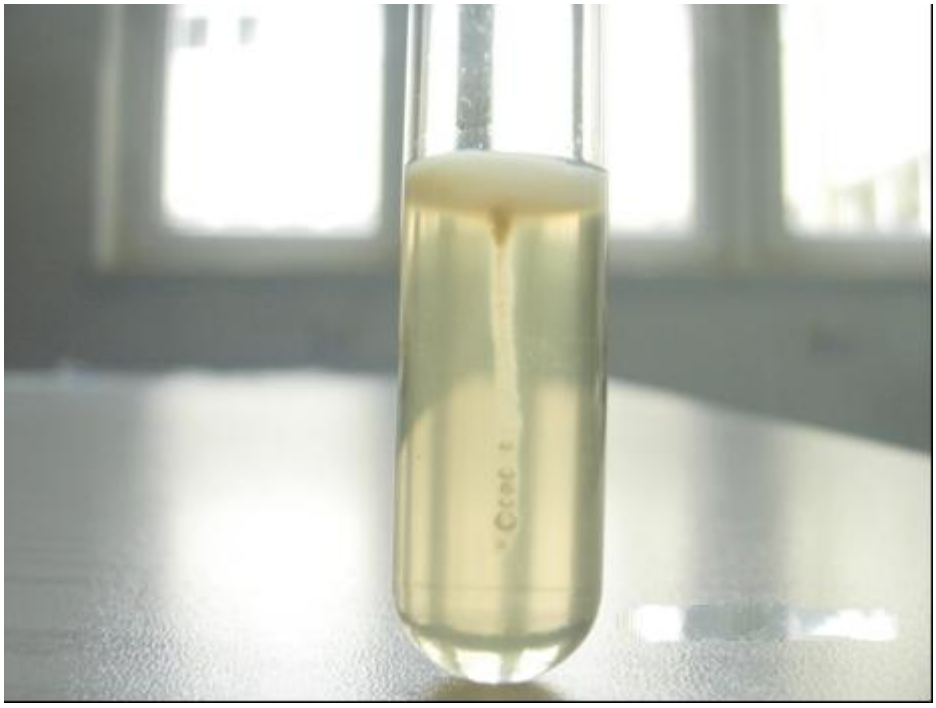
Lam üzerine %3'lük H_2O_2 solüsyonundan birkaç damla alındı. İğne uçlu öze yardımı ile şüpheli *Listeria* kolonisinden alınarak karıştırıldı. Gaz oluşumu katalaz reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi.

Oksidaz testi

Şüpheli *Listeria* kolonisinden öze yardımı ile bir koloni oksidaz test kiti üzerine alındı. Renk değişimi gözlenmemesi oksidaz reaksiyonu negatif ve *Listeria* pozitif olarak değerlendirildi.

Hareket testi

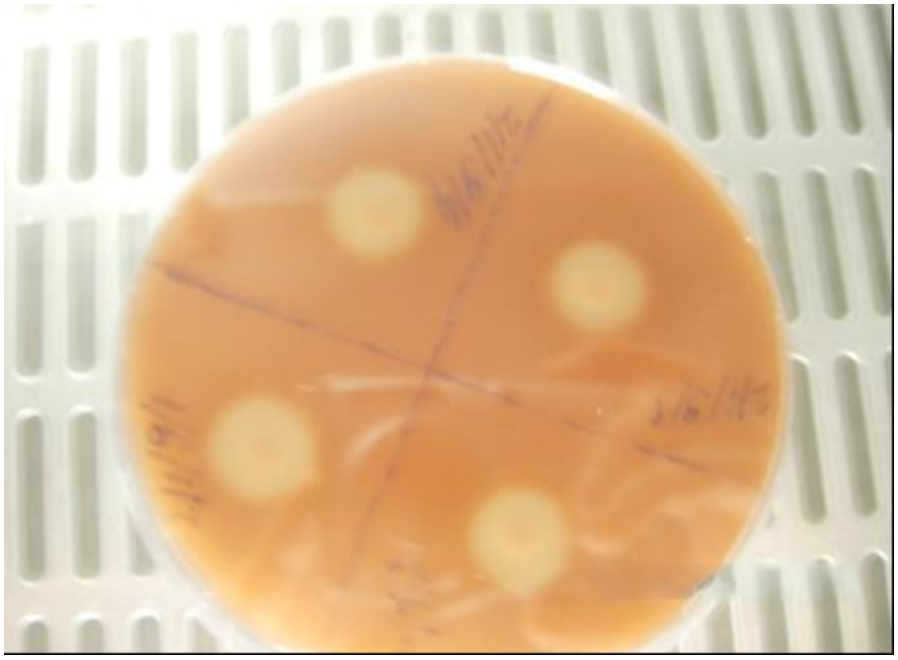
İğne uçlu öze yardımı ile şüpheli *Listeria* kolonisinden yarı katı Sulfate Indole Motility medium besiyerine dik olarak batırılıp inoküle edildi ve 25°C'de 2-5 gün inkübasyona bırakıldı. Şemsiye tarzındaki üremeler (Resim 2.14) hareket pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 2.14. Sulfate Indol Motility Medium Besiyerinde
Şemsiye Görünümünde Üremeler.

Kanlı agarda hemoliz

Tryptone Soya Yeast Ekstract Agar'da üremiş kolonilerden iğne uçlu öze yardımıyla alınarak besiyeri tabanına yakın fakat tabana değmeyecek şekilde agarı parçalamadan kanlı agara ekim yapıldı. Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*, negatif kontrol olarak *L. innocua* referans suşları kullanıldı. 24-48 saat inkübe edildi. Kanlı agarda üreyen koloniler hemoliz özellikleri bakımından ışık altında incelendi. Ekim çevresinde hemoliz zonu oluşturan koloniler (Resim 2.15) şüpheli olarak değerlendirildi.



Resim 2.15. Kanlı Agarda Hemoliz Görüntüsü.

Nitrat redüksiyon testi

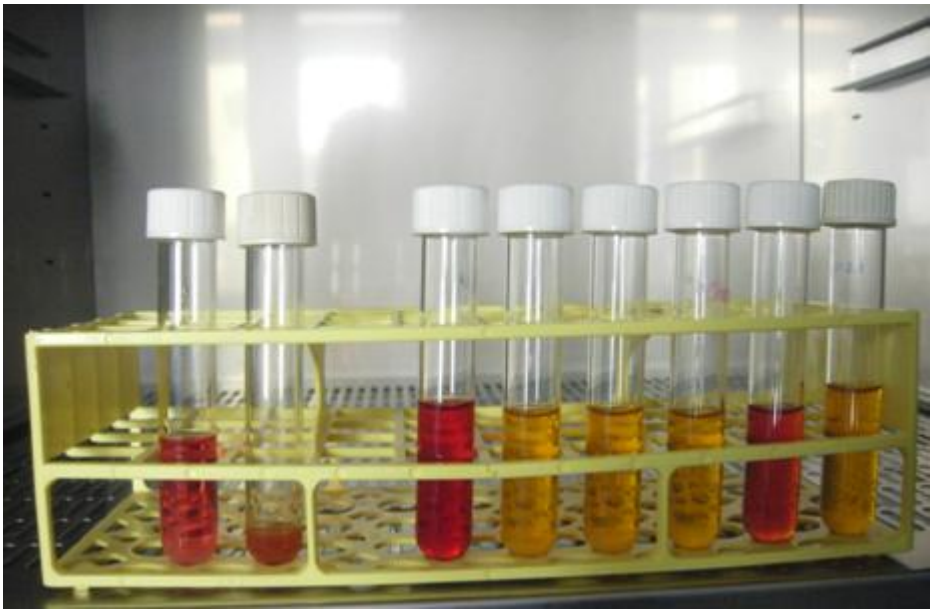
Şüpheli kolonilerden Nitrate Broth'a inokule edildi ve 35°C'de 2-5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda önce 0,2 ml A test çözeltisi ve sonra 0,2 ml B test çözeltisi ilave edildi. Çözeltilerin broth yüzeyinde temas ettiği kısımda kırmızı renk oluşması nitratın nitrite indirgendiğini dolayısıyla nitrat redüksiyon testinin pozitif olduğunu göstermektedir. Rengin oluşmadığı durumlarda çinko tozu (Biomerieux, 100 Rodolphe Street Durham, NC 27712, USA-70380) ilave edilerek 5 dakika beklendi. Kırmızı viyole renk oluşması nitratın hala mevcut olduğunu ve nitrite dönüşmediğini gösterir.

Metil Red-Voges Proskauer testi

MR-VP besiyerine şüpheli kültürler inokule edildi ve 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Metil Red indirgenmesini belirlemek amacıyla dört damla Metil Red solüsyonu damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak değerlendirildi. Voges Proskauer testi için ise 0,5 ml O'Meare ayıracı konulup 37°C'de su banyosunda 4 saat bırakıldı, pembe renk oluşumu pozitif olarak kabul edildi.

Karbonhidrat fermentasyon testleri

Steril %5'lik dekstroz, eskulin, maltoz, ramnoz, mannitol ve ksiloz karbonhidrat çözeltilerinin her birinden steril karbonhidrat besiyerine 1 ml aktarıldı. Şüpheli kolonilerden bu tüplere inokulasyon yapıldıktan sonra 35°C'de 2-7 gün inkübe edildi (Resim 2.16). Sonuçlar, Çizelge 2.2'ye göre değerlendirildi.



Resim 2.16. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri.

Çizelge 2.2. *Listeria monocytogenes*'in Karbonhidrat Fermentasyon Reaksiyonları.

Biyokimyasal Testler	Glikoz	Eskulin	Mannitol	Ksiloz	Ramnoz	Maltoz
Listeria monocytogenes	+/-	+	-	-	+	+

CAMP testi

Koyun kanlı agar plağına β-hemolitik *S. aureus* (ATCC 25923) ve *R. equi* (ATCC 6939) kültürlerinden birbirine karşıt olacak ekildi. *R. equi* ve β-hemolitik *S. aureus* arasında kalan kısma birbirine paralel ve iki yandaki bu iki mikroorganizmanın çizimlerine temas etmeyecek şekilde şüpheli izolatlar çizim yöntemiyle (Resim 2.17) ekildi. 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Plaklardaki hemoliz Çizelge 2.3'e göre değerlendirildi.



Resim 2.17. CAMP Testi Reaksiyonları.

Çizelge 2.3. *Listeria monocytogenes*'in CAMP Testi Hemoliz Reaksiyonları.

Hemoliz artışı	*Staphylococcus aureus* (S)	*Rhodococcus equi* (R)
Listeria monocytogenes	+	-*

* : Bazı suşlar S ve R pozitif olabilir.

2.2.7. İzolatların Muhafazası

Brucella Broth saklama besiyeri içeren eppendorf tüplerine alınan *L. monocytogenes* izolatları (Resim 2.18), moleküler identifikasyon, serotiplendirme, PFGE ve antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere -86°C'de muhafaza edildi.



Resim 2.18. Boncuklu Eppendorf Tüplerde Brucella Broth Saklama Besiyeri.

2.2.8. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu

Örneklerin Hazırlanması

Brucella Broth saklama besiyeri içeren eppendorf (Greiner bio-one, Maybachstrasse 2, 72636 Frickenhausen, Germany) tüplerindeki numunelerden elde edilen izolatlar ve referans suş (*L. monocytogenes*, ATCC 13932) çözündürüldü. Nutrient Broth içeren vida kapaklı test tüplerine aktarıldı. 37°C'de inkübe edildi. Bakteri yoğunluğu McFarland cihazında (DEN-1B McFarland Densitometer) optik dansitesi (OD) 4'e ayarlandı.

DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu amacıyla Fermentas Genomic DNA Purification kiti (≠K0512 Lot:00071751) kullanıldı. Nutrient Broth'da üretilen OD'si 4'e ayarlanan örneklerden 1 ml alındı ve santrifüj (VWR Micro-centrifuge tubes 211-0015) tüplerine aktarıldı. Örnekler 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüje (Nüve NF 1200 R) edilerek süpernatantı atıldı. Bakteri pelleti ekstraksiyon aşamaları için kullanıldı. Bakteri pelleti üzerine otomatik pipetle (Nichiryo-Nichipet EX) 200 µl steril distile su eklendi ve vorteksle (Labart MVS-1) hafifçe karıştırıldı. Üzerine 400 µl lizis solüsyonu (Fermentas ≠K0512 Lot: 00066035) eklenerek ısıtıcı blokta (Bioneer MyGenie 96 Thermal Block-Cycler) 65°C'de 5 dk. bekletildi. Üzerine 600 µl kloroform (Merck-1.02445) eklendi. Emülsiyon üç-beş kez yavaşça ters düz edilerek karıştırıldı. Sonrasında örnekler 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüje edildi. DNA içeren üstteki sıvı faz yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu (Fermentas ≠K0512 Lot: 00064865) eklendi. Oda sıcaklığında 1-2 dk. belli aralıklarla yavaşça ters düz edilerek karıştırıldı. 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüje edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. DNA pelleti 100 µl 1,2 M NaCl (Fermentas ≠K0512 Lot: 00066034) ile hafifçe vortekslenerek çözündürüldü. Üzerine 300 µl soğuk etanol (Merck-1.00983) eklenerek DNA'nın presipite olması amacıyla -20°C'de (Vestel FT 280 derin dondurucu) 10 dk. bekletildi. Sonrasında 10.000 rpm'de 4 dk. santrifüje edildi. Etanol içeren sıvı kısım dökülerek pellet 100 µl steril distile suyla çözündürüldü. Kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi (Fermentas 2011).

PCR Mix Hazırlama

Bu amaçla hazır PCR premiksleri (Bioneer AccuPower Multiplex PCR Premix) kullanıldı. Premiks, Top DNA polymerase, dNTP set, reaksiyon sıvısı, $MgCl_2$, stabilizer ve tracking dye'dan oluşmaktadır. Premiks tüplerine ekstrakte DNA'lardan 2,5'ar µl, Primer A ve B'lerden 1 µl ve 20 µl steril distile sudan eklendi.

Primerler

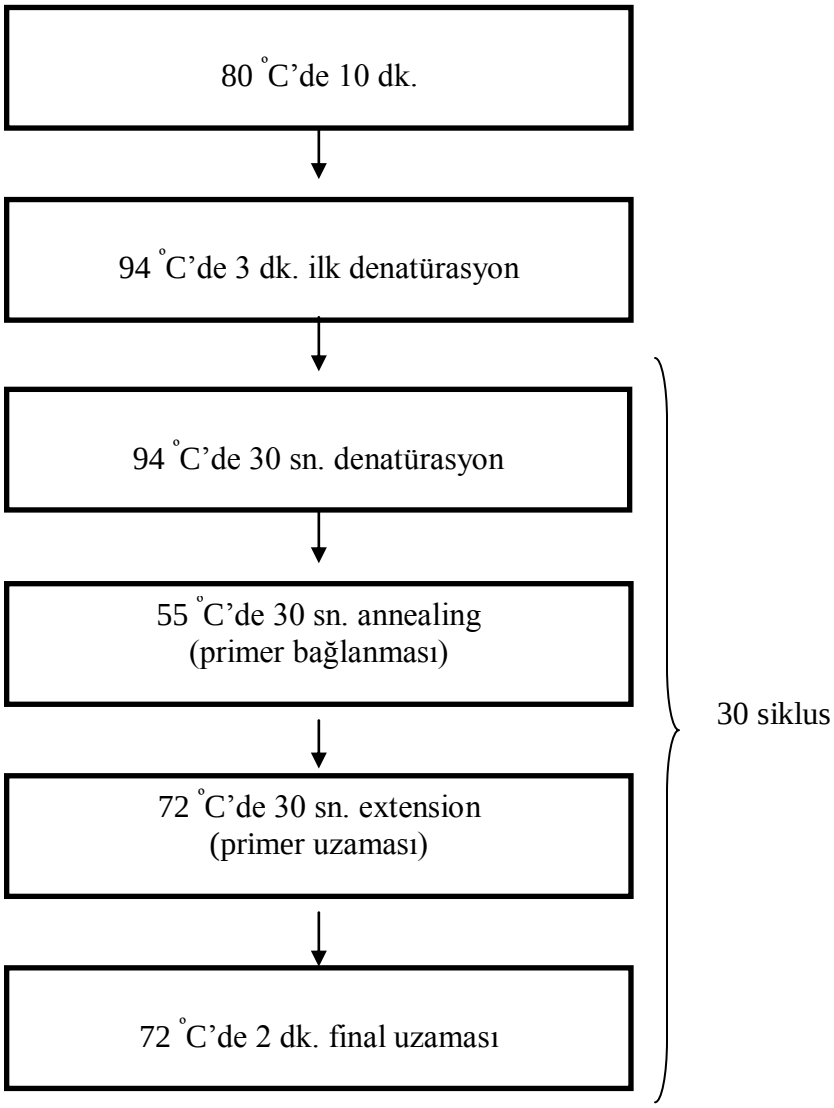
PCR analizlerinde, Gouws ve Liedemann (2005)'ın bildirdikleri *hly* geni primeri kullanıldı. Primer A (5'- CAT TAG TGG AAA GAT GGA ATG -3') ve Primer B (5'- GTA TCC TCC AGA GTG ATC GA -3') sentezlettirildi. Bu primer, 732 bp uzunluğunda bir bölgeyi amplifiye etmektedir.

Agaroz Jel Dökme

Elektroforez tankının (ThermoScientific OWL Easy Cast B2) tarak yerleştirilmiş küvetine agaroz jel döküldü. Jelin katılaşması için 40-45 dk. bekletildi.

PCR Amplifikasyonu

Gouws ve Liedemann (2005)'ın bildirdikleri thermal cycler koşulları esas alındı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. PCR ile Moleküler İdentifikasyonda Thermal Cycler Koşulları.

Elektroforez

Elektroforez tankı kuyucuklarına, amplifiye DNA, pozitif kontrol (*L. monocytogenes* 4b, ATCC 13932), negatif kontrol (steril distile su) örneklerinden 5'er µl yüklendi. Loading dye (Fermentas 6X DNA Loading Dye ≠R0611 Lot : 00066284) ve marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ≠SM0321 Lot : 00050227) karışımından 5 µl alınarak kuyucukların her iki başına aktarıldı.

Elektroforezde (ThermoScientific-EC 300XL2) 90 volt, 40 miliamperde, 1 saat yürütüldü.

Ultra Viyole (U.V) Transilluminatör

Yürütme sonunda *L. monocytogenes* için spesifik *hly* geni varlığını gösteren amplifiye DNA örnekleri U.V transilluminatörde (Dnr Bio-Imaging Systems MiniBISPro) görüntülendi.

2.2.9. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Serotiplendirmeleri

Denka Seiken Firması'nca üretilen her bir antijen türüne spesifik aglutininleri içeren antiserumlar kullanıldı.

• Lam Aglütinasyon Metoduyla O Antijeninin Belirlenmesi

Referans suş (*L. monocytogenes* 4b, ATCC 13932) ve *L. monocytogenes* izolatları Brain Heart Broth'a ekildi. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında Brain Heart Infusion Agar'a geçilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Brain Heart Infusion Agar'da üreyen koloniler sodyum klorit içerisine aktarıldı. Süspansiyonlar 121°C'de 30 dk ısıtıldıktan sonra 3000 rpm'de santrifüje edildi. Presipitat, aglutinasyon testleri için 1 ml sodyum klorit içerisinde bekletildi (Denka Seiken 2000).

Polivalant Tip O Antiserumu İle Lam Aglutinasyonu

Lam üzerine OI/II, OV/VI antiserumları ve fizyolojik tuzlu su (kontrol) damlatıldı. Bakteri süspansiyonlarından bir öze dolusu eklendi. Lam geriye ve dışa doğru eğerek karıştırıldı. 1 dk. içerisinde şekillenen aglutinasyonlar pozitif kabul edildi.

Monovalant Tip O Antiserumu İle Lam Aglutinasyonu

Bakteri süspansiyonları polivalant antiserumların hepsinde aglutinasyon oluşturduğunda, monovalant antiserumlarla da reaksiyonları gözlemlendi.

OI/II antiserumu ile pozitif değerlendirilen izolatlar OI ve OIV antiserumlarıyla test edildi. OV/OVI antiserumlarıyla pozitif değerlendirilen izolatlar OVI, OVII, OVIII ve IX antiserumlarıyla test edildi.

Aglutinasyon oluşturan antiserumun adı izolatların sahip olduğu O antijeninin adı olarak kabul edildi.

• Tüp Aglütinasyon Metoduyla H Antijeninin Belirlenmesi

L. monocytogenes izolatları yarı katı Brain Heart Broth içeren tüplere aktarıldı. İzolatlar, üç kez yapılan pasajlamadan sonra, H antijeni bakımından kontrol edildi.

İzolatlar Brain Heart Broth içeren tüplere aktarılarak 30°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında fizyolojik tuzlu su ve %1 formalin ile bakteriyel süspansiyon hazırlandı.

Steril tüplere her bir izolat için iki damla H antiserumu konuldu. Üzerine 0,5 ml bakteri süspansiyonundan eklendi. Kontrol grubu olarak antiserum içermeyen tüp kullanıldı. Tüpler homojenizasyon için karıştırıldı. 52°C'lik su banyosunda 1 saat boyunca bekletildi. İnkübasyon sonrasında aglütinasyon gözlenen tüpler pozitif kabul edildi (Denka Seiken 2000).

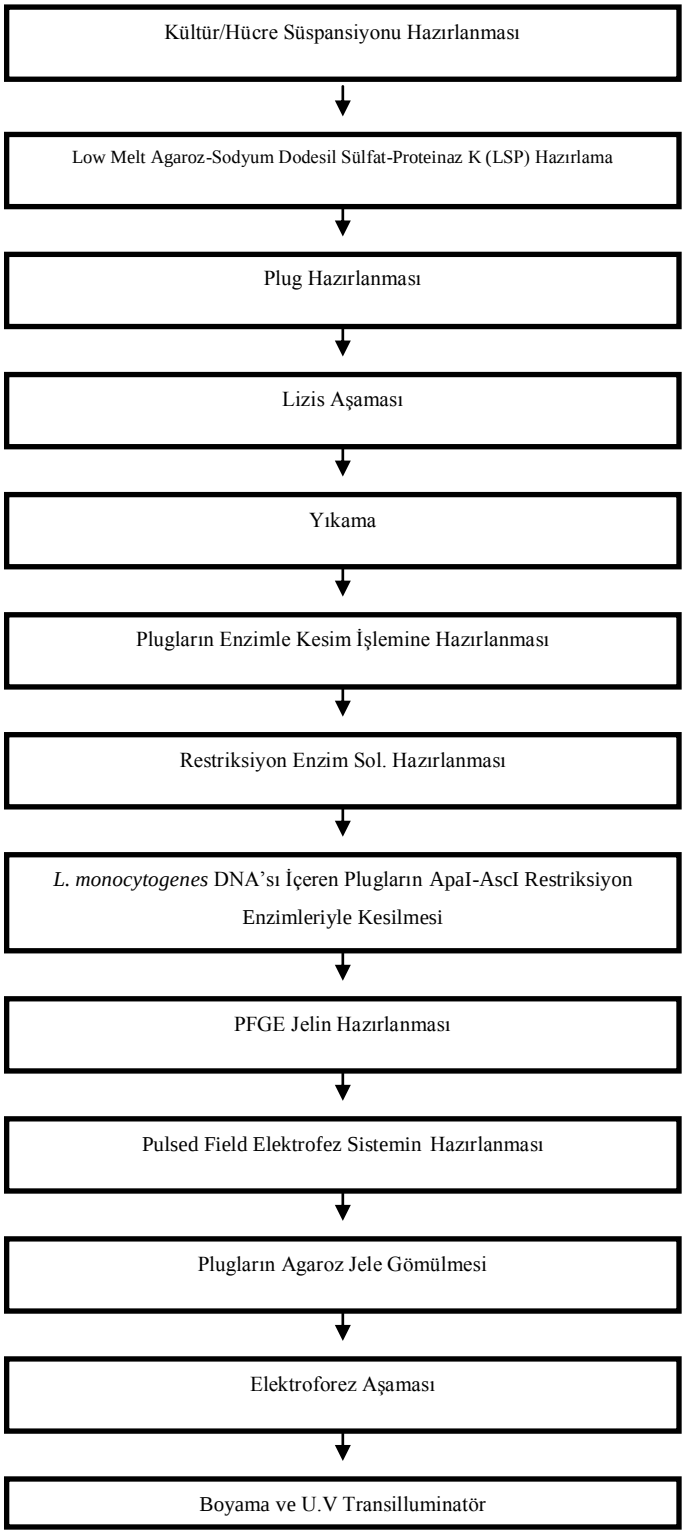
Aglutinasyon oluşturan antiserumun adı izolatların sahip olduğu H antijeninin adı olarak kabul edildi. Oluşan aglutinasyonlar Çizelge 2.4'e göre değerlendirildi.

Çizelge 2.4. *Listeria monocytogenes*'in O ve H Antijenlerinin Aglutinasyon Oluşturduğu Antiserumlar.

Serotip	O antijeni	H Antijeni
1/2a	I, II, (III)	AB
1/2b	I, II, (III)	ABC
1/2c	I, II, (III)	BD
3a	II, (III), IV	AB
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
4a	(III), (V), VII, IX	ABC
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	ABC
4b	(III), V, VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III), (V), VI, VIII	ABC
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII	ABC

2.2.10. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Genotiplendirmeleri

L. monocytogenes izolatlarının genotiplendirmelerinde CDC PulseNet'in standardize edilmiş (Şekil 2.3) PFGE metodu uygulandı (CDC PulseNet 2004).



Şekil 2.3. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Genotiplendirme Metodu Aşamaları.

Kültür/Hücre Süspansiyonu Hazırlanması

Araştırmanın diğer aşamalarında kullanılan *L. monocytogenes* referans suşu (ATCC 13932) yanında *L. monocytogenes* EGD Special *Listeria* Culture Collection 5835 referans suşu ve elde edilen *L. monocytogenes* izolatları çözündürüldü. Brain Heart Infusion Agar'a ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda koloniler steril öze yardımıyla içerisinde 3 ml TE buffer bulunan falkon tüplere aktarıldı. Tüplerdeki bakteriyel süspansiyonun yoğunluğu 610 nm'de 1.3 OD'ye (~Mc Farland 7.0) ayarlandı. Her bir süspansiyondan 240 µl alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 60 µl lizozim solüsyonundan eklenerek pipetaj yapıldı. Sonrasında 37°C'de su banyosunda 10 dk. bekletme aşamasına geçildi.

%1,2 Low Melt Agaroz + %10 Sodyum Dodesil Sülfat, SDS + 0,2 mg/ml Proteinaz K (LSP) Solüsyonu Hazırlanması

• %1,2 Low Melt Agaroz : 0,12 g low melt agaroz tartıldı ve 10 ml steril distile suda çözündürüldü ve kullanılıncaya kadar 55°C su banyosunda bekletildi.

LSP solüsyonu, PulseNet metodunda (Çizelge 2.5) bildirilen numune sayıları ve bileşen miktarları dikkate alınarak, 13 numune için hazırlandı.

Çizelge 2.5. Numune Sayısına Göre LSP Solüsyonu Bileşenlerinin Oransal Miktarları (CDC PulseNet 2004).

Numune Sayısı	SDS (%10)	Low Melt Agaroz (%1,2)	Proteinaz K (20mg/ml)
1	30 µl	267 µl	3 µl
11	330 µl	2,9 ml	33 µl
13	390 µl	3,5 ml	39 µl
16	480 µl	4,3 ml	48 µl
25	750 µl	6,7 ml	75 µl

• SDS'den 390 µl alınarak 50 ml'lik polipropilen vida kapaklı tüplere aktarıldı. Tüpler 55°C'deki su banyosuna konuldu. Üzerine %1,2 low melt agarozdan 3,5 ml, proteinazdan K'dan 39 µl eklendi. LSP solüsyonu, kullanılıncaya kadar 55°C'deki su banyosunda bekletildi.

Plug Hazırlanması

Su banyosunda bekletilen her birinde 300 µl hücre ve lizozim süspansiyonu bulunan tüplere 300 µl LSP solüsyonu eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Hemen sonra plug çukurlarına, hava kabarcığı oluşturulmamasına özen gösterilerek, uygun miktarlarda doldurulduve buzdolabında 15 dk. bekletilerek dondurulduu.

Lizis Aşaması

Lizis Solüsyonu: 50mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; %1 Sarkosil, 0,15 mg/ml proteinaz K.

Metotda belirtilen miktarlar (Çizelge 2.6) gözetilerek çalışmada 13 numunelik solüsyonlar hazırlandı.

Çizelge 2.6. Numune Sayısına Göre Lizis Solüsyonu Bileşenleri Miktarı (CDC PulseNet 2004).

Numune Sayısı	50mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; %1 Sarkosil	Proteinaz K (20mg/ml)
1	4 ml	30 µl
10	40 ml	300 µl
13	52 ml	390 µl
15	60 ml	450 µl
20	80 ml	600 µl

•52 ml X 0,05 M Tris : 1 M Tris X V

V : 2,6 ml 1 M Tris

•52 ml X 0,05 M EDTA : 1 M EDTA X V

V : 2,6 ml 1 M EDTA

•52 ml X %1 Sarkosil : %2 Sarkosil X V

V : 26 ml Sarkosil

• 2,6 + 2,6 + 26 : 31,2 ml

52 - 31,2 : 20,8 ml steril distile su.

Lizis solüsyonu 50 ml'lik polipropilen vida kapaklı tüplere her bir plug için 4'er ml porsiyonlandı. Pluglar lizis solüsyonuna aktarılarak çalkalayıcılı inkübatörde (GFL 3031) 54°C'de 200 rpm'de 2 saat bekletildi.

Yıkama

İnkübasyon sonunda, tüpte bulunan lizis solüsyonu pluglara zarar vermeden uzaklaştırıldı. Sıcaklığı 54°C'ye ayarlanmış 15 ml steril distile su eklendi. Çalkalayıcılı inkübatörde 54°C'de 200 rpm'de 10 dk. bekletildi. Steril su uzaklaştırılarak aynı işlem bir kez tekrarlandı. Sonrasında steril su uzaklaştırılarak sıcaklığı 54°C'ye ayarlanmış 15 ml TE buffer eklendi. Çalkalayıcılı inkübatörde 54°C'de 200 rpm'de 15 dk. bekletildi. TE buffer ile yıkama işlemi dört tekrar olarak gerçekleştirildi. Restriksiyon işlemine hazır hale getirilen pluglar kullanılıncaya kadar 5 ml TE buffer içerisinde buzdolabında muhafaza edildi.

Plugların Enzimle Kesim İşlemine Hazırlanması

Enzimlere ait buffer, steril bidistile su ile aşağıda belirtilen hacimlerde sulandırıldı.

• 195 µl Buffer + 1755 µl steril bidistile su

Her bir plug için mikrosantrifüj tüplerine 150 µl sulandırılmış buffer eklendi. Buzdolabında muhafaza edilen pluglar lam üzerinde 1/4 oranında kesilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 37°C'deki su banyosunda 10 dk. bekletildi.

Restriksiyon Enzim Solüsyonunun Hazırlanması

AscI ve ApaI restriksiyon enzimi solüsyonları üretici firma önerileri doğrultusunda aşağıda belirtilen miktarlarda sulandırılarak hazırlandı.

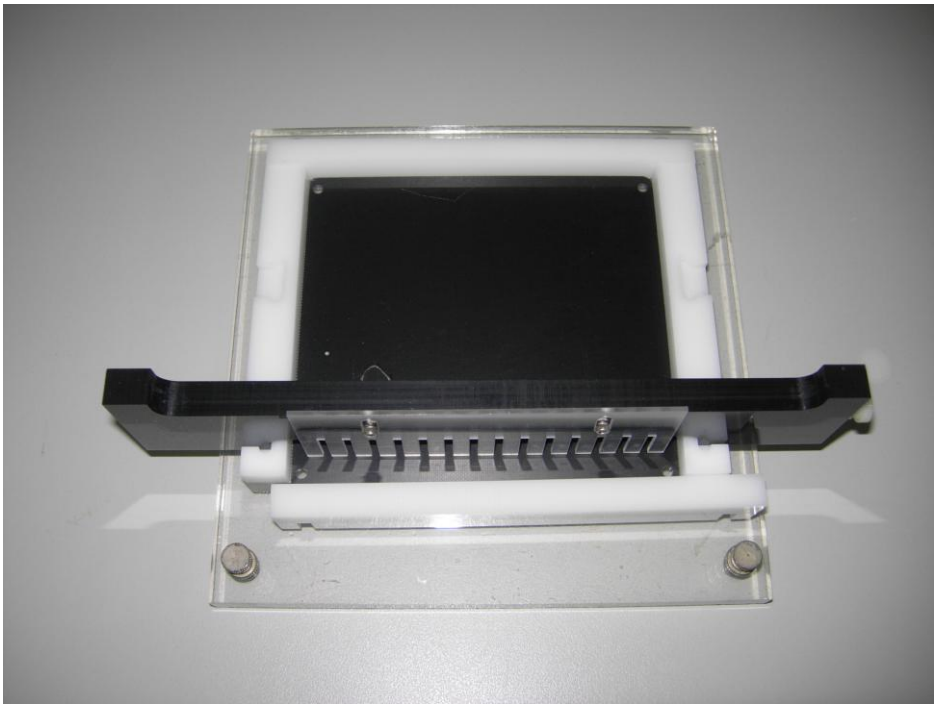
• 1690 µl steril distile su + 195 µl enzim buffer + 65 µl enzim

***L. monocytogenes* DNA'sı İçeren Plugların ApaI ve AscI Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi**

Mikrosantrifüj tüplerindeki buffer uzaklaştırıldı. Her bir tüpe 150 µl enzim solüsyonu eklendi. Tüpler 30°C'deki su banyosunda 5 saat bekletildi.

PFGE Jelin Hazırlanması

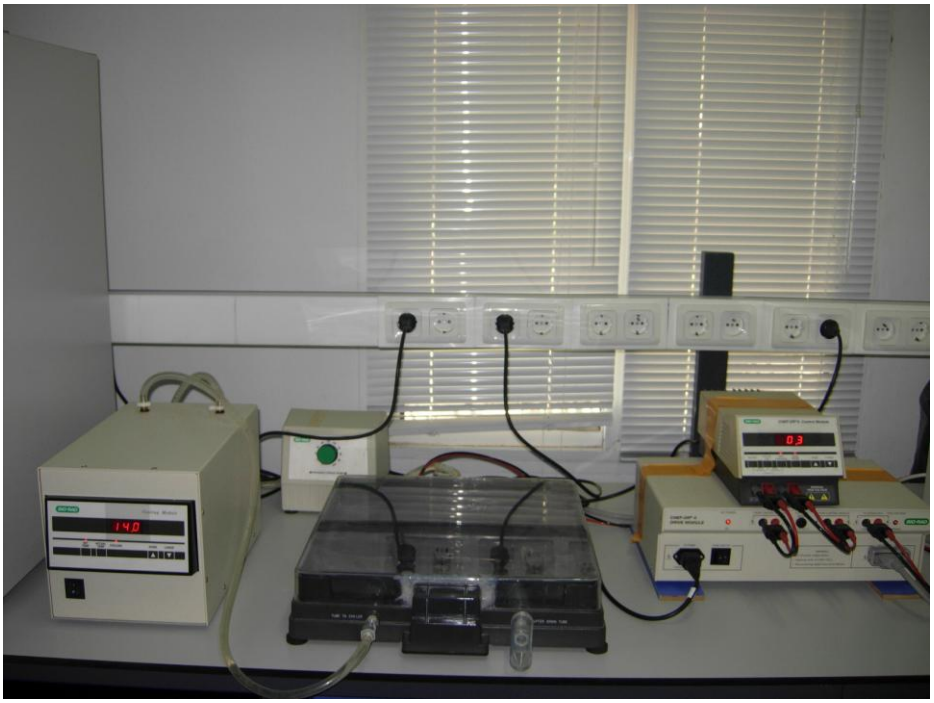
Ultra pure DNA grade agarozdan 2,5 g, 250 ml 0,5 X TBE ile sulandırıldı. Mikrodalga fırında tamamen çözündürülerek 53°C'deki su banyosunda bekletildi. Jel döküm ünitesine (Resim 2.19) döküldü. Soğuması için 30 dk. oda sıcaklığında tutuldu.



Resim 2.19. Jel Döküm Ünitesi.

Pulsed Field Elektrofez Sistemin Hazırlanması

Elektroforez tankına 2,2 l 0,5 X TBE solüsyonu eklendi. Cihazın (Resim 2.20) güç kaynağı açılarak soğutma modulü sıcaklığı 14°C'ye, pompa ayarı 70'e ayarlandı.



Resim 2.20. Pulsed Field Elektrofez Sistemi Cihazı.

Plugların Agaroz Jele Gömülmesi

Mikrosantrifüj tüplerinden enzim solüsyonu uzaklaştırıldı. Her bir plug için 0,5 X TBE solüsyonu eklendi. Solüsyon içinden spatül yardımıyla alınan pluglar PFGE jel kuyucuklarına hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi. Kuyucuklarda kalan boşluklar %1 ultra pure DNA grade agarozla kapatıldı ve agaroz jel PFGE cihazına yerleştirildi.

Elektroforez Aşaması

Elektroforez koşulları, düşük mW 30 kb, yüksek mW 700 kb olarak ayarlandı ve 19 saat yürütüldü.

Boyama Aşaması

Etidyum bromid solüsyonundan 40 µl, 400 ml distile suyla sulandırıldı. Elektroforez sonrası jel ayrı bir kısma alınarak 0,5 X TBE solüsyonu içerisine aktarıldı. Etidyum bromidden 10 µl eklendi ve 30 dk. boyandı. Jel, distile su ile (30 dk. aralıklarla değiştirilerek) üç kez yıkandı.

U.V Transilluminatör

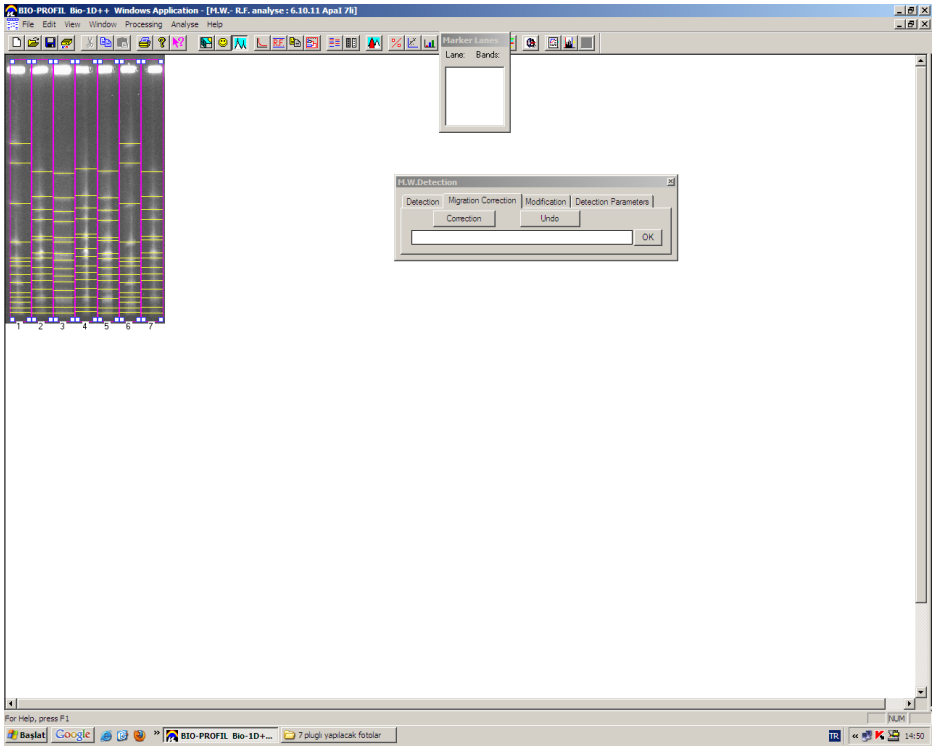
Boyama sonrasında, *L. monocytogenes* DNA'sı içeren plugların ApaI ve AscI restriksiyon enzimleriyle kesilerek pulsed-field jel elektroforezinde yürütülmesiyle elde edilen DNA bantları, Bio-Rad VersaDoc 4000MP (Resim 2.21) jel görüntüleme sisteminde incelendi.



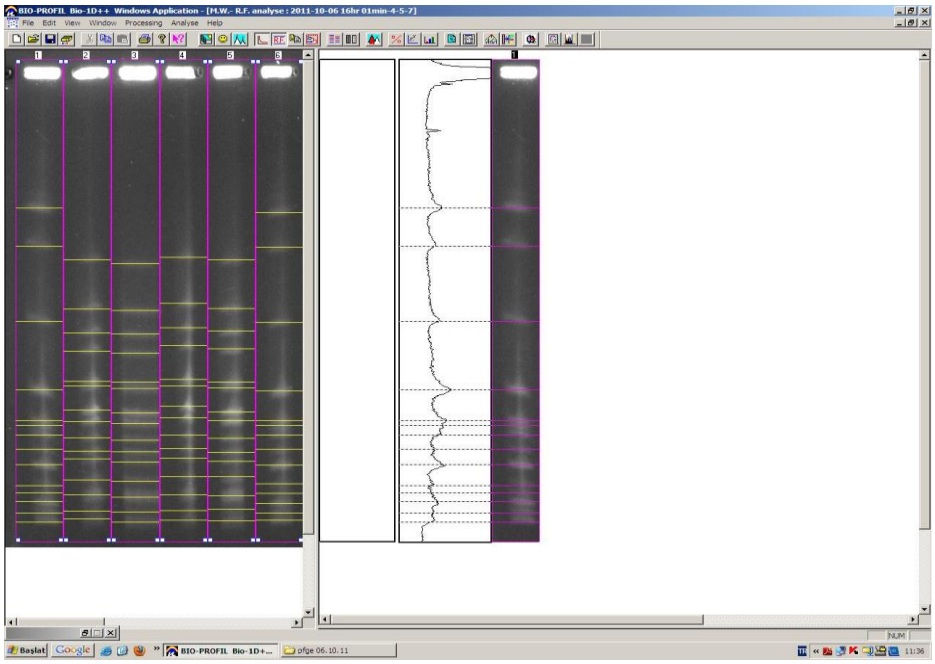
Resim 2.21. Jel Görüntüleme Sistemi.

Bant Profillerinin Oluşturulması

İzolatlara ait bant görüntüleri kullanılarak BIO 1D++ jel analiz programıyla bant aralıkları seçildi (Resim 2.22) ve unweighted pair group (UPGMA) metodu kullanılarak dendogram bant profilleri (Resim 2.23) oluşturuldu. Dendogram analizinde iki enzim içinde eşdeğer coefficient yüzde değeri (%0,7) kullanıldı. İzolatlar klonal ilişkileri bakımından incelendi.



Resim 2.22. İzolatların Bant Aralıklarının Seçimi.



Resim 2.23. İzolatların Dendogram Bant Profillerinin Oluşturulması.

2.2.11. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla ampisilin, eritromisin, gentamisin, kloramfenikol, penisilin, sefalotin, streptomisin, tetrasiklin, vankomisin ve sülfametoksazol/trimethoprim antibiyotik diskleri kullanıldı. *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) kurallarına uygun olarak, disk difüzyon metoduyla yapıldı. İzolatlar Tryptone Soya Agar'a ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen kolonilerden üç-beş adet Müeller Hinton Broth içeren vida kapaklı test tüplerine aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben kültürün bulanıklığı, McFarland cihazında 0,5 standart bulanıklığa ayarlandı. Bulanıklığı ayarlanan kültürlerden, Müeller Hinton Agar besiyerinin tüm yüzeyine yayılarak ekim yapıldı. Standart antibiyotik diskler birbirine 3-4 cm, petri kenarına 1 cm uzaklıkta petri plaklarına (120X120 mm) pens yardımı ile yerleştirilerek besiyeri ile teması sağlandı. İnkübasyondan sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü ve elde edilen zon çapları NCCLS tarafından bildirilen zon tablosuna (Çizelge 2.7) göre değerlendirildi (NCCLS 1990).

Çizelge 2.7. Antibiyotik İnhibisyon Zon Çapları

Antibiyotik	Konsantrasyon	Zon Çapı (mm) Direnç	Orta Duyarlı	Duyarlı
Ampisilin	10 µg	≤ 19	-	≥ 20
Gentamisin	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Eritromisin	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23
Tetrasiklin	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Kloramfenikol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Sefalotin	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Streptomisin	10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
Vankomisin	30 µg	≤ 9	10-11	≥ 12
Penisilin	10 U	≤ 19	-	≥ 20
Sülfametoksazol-Trimethoprim	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16

2.2.12. İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS paket programı (SPSS Version 16) kullanılarak ‘‘ki kare’’ testiyle gerçekleştirildi.

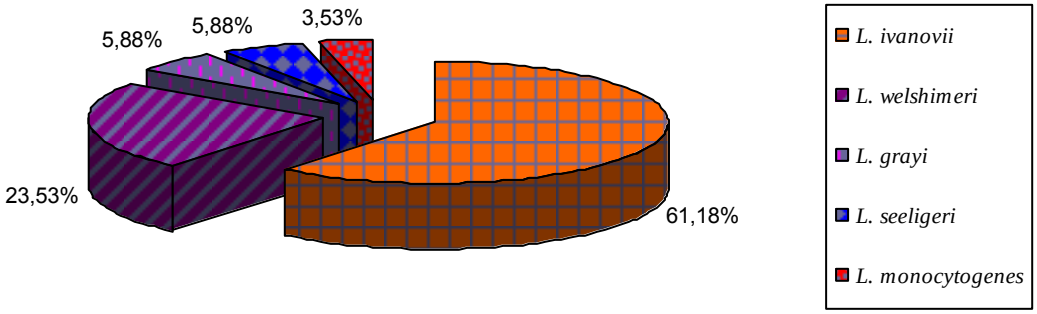
3. BULGULAR

Araştırmada, salamura beyaz peynir üretiminin yapıldığı dört işletmeden Haziran-Eylül 2010 tarihleri arasında numuneler toplandı. Numuneler, salamura beyaz peynir üretim prosesinde yer alan 16 farklı noktadan elde edildi. Her bir işletmeden birer ay arayla üç kez numune alındı. Toplamda 192 numune, *L. monocytogenes* kontaminasyonu bakımından incelendi. Numunelerde *Listeria* spp. varlığı, FDA tarafından önerilen metotla araştırıldı. Kültürel yöntemle elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının, *hly* gen sekansı araştırılarak PCR ile moleküler identifikasyonu, Denka Seiken'in antiserumlarıyla serotiplendirmeleri, CDC Pulse Net Alt Tipleme Ağı PFGE metoduyla genotiplendirmeleri gerçekleştirildi. İzolatların disk difüzyon metoduyla antibiyotik duyarlılık profilleri belirlendi.

3.1. Kültürel İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Toplam 192 numuneden 17'sinin (%8,85) *Listeria* spp. ile kontamine olduğu tespit edildi. İşletmelerde *Listeria* spp. ile kontamine örneklerin oranı; A işletmesi %16,66 (8/48), B işletmesi %8,33 (4/48), C işletmesi %10,41 (5/48) olarak bulundu. D işletmesi örneklerinde *Listeria* spp. ile kontaminasyon saptanmadı. *Listeria* spp. ile kontamine numunelerin, işletmelere göre dağılımı bakımından ortaya çıkan farklılıkların istatistiksel olarak önem arz etmediği ($p>0,05$) tespit edildi.

Kontamine 17 numunedeki *Listeria* türlerini belirlemek amacıyla, her bir numuneden beşer izolat incelendi. İncelenen 85 izolatın 52'si (%61,18) *L. ivanovii*, 20'si (%23,53) *L. welshimeri*, beşi (%5,88) *L. grayi*, beşi (%5,88) *L. seeligeri* ve üçü (%3,53) *L. monocytogenes* olarak identifiye edildi (Şekil 3.1). İzolatların işletmelere göre tür bazında dağılımı Çizelge 3.1'de gösterildiği gibidir.

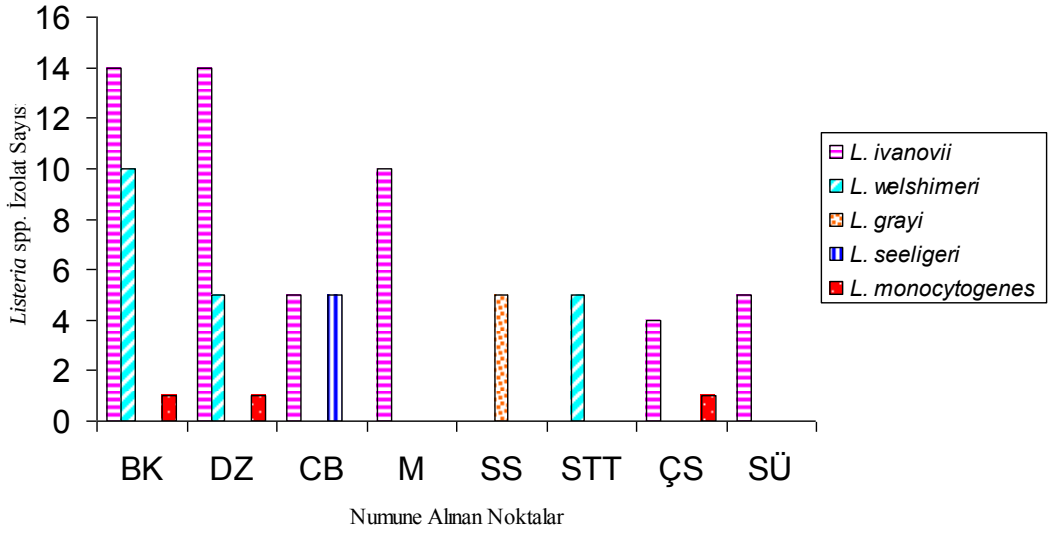


Şekil 3.1. İzolatların *Listeria* Türlerine Göre Oranları.

Çizelge 3.1. *Listeria* spp. İzolatlarının İşletmelere Göre Dağılımı.

	A İşletmesi	B İşletmesi	C İşletmesi	D İşletmesi	Toplam
Listeria monocytogenes	2	-	1	-	3
Listeria ivanovii	23	10	19	-	52
Listeria seeligeri	5	-	-	-	5
Listeria welshimeri	10	5	5	-	20
Listeria grayi	-	5	-	-	5
Toplam	40	20	25	-	85

Üretim prosesinin 16 farklı noktasının sekizinde (pastörize süt, mayalanmamış süt, peynir pıhtısı, teleme, starter kültür, kalsiyum klorür, peynir teknelerinin iç yüzeyi ve peynir altı suyu) *Listeria* spp. izole edilmedi. İzolatlar, sekiz farklı noktadan (çiğ süt tank yüzeyi, çiğ süt, baskı kasaları, duvar-zemin, cendere bezi, maya, salamura suyu ve son ürün) elde edildi. Dört farklı işletmeden, üç farklı zamanda alınan numunelerde kontaminasyon yoğunluğu ve kontamine bulunma sayıları bakımından bu sekiz nokta sırasıyla; baskı kasaları (5), duvar-zemin (4), cendere bezi (2), maya (2), salamura suyu (1), çiğ süt tank yüzeyi (1), çiğ süt (1) ve son ürün (1) olarak belirlendi (Şekil 3.2). *Listeria* spp. ile kontamine bulunan noktaların, kontamine bulunma sayıları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önem arz etmediği ($p>0,05$) tespit edildi.



Şekil 3.2. *Listeria* spp. İzolatlarının Numune Noktalarına Göre Dağılımı.
BK: Baskı kasaları, DZ: Duvar-zemin yüzeyi, CB: Cendere bezi, M: Maya, SS: Salamura suyu, STT: Süt toplama tanklarının iç yüzeyi, ÇS: Çiğ süt, SÜ: Son ürün.

İzolatların elde edildiği 17 numuneden 14'ü tek bir *Listeria* türüyle, üçü (çiğ süt, baskı kasaları ve duvar-zemin) iki *Listeria* türüyle (*L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*) kontamine bulundu. *L. monocytogenes* izolatları A işletmesi baskı kasaları (1) ve duvar-zemin (1), C işletmesi çiğ süt (1) örneklerinden; *L. ivanovii* izolatları A işletmesi baskı kasaları (4), cendere bezi (5), duvar-zemin (9) ve son ürün (5), B işletmesi baskı kasaları (5) ve maya (5), C işletmesi baskı kasaları (5), duvar-zemin (5), maya (5) ve çiğ süt (4) örneklerinden; *L. welshimeri* izolatları A işletmesi baskı kasaları (10), B işletmesi duvar-zemin (5), C işletmesi çiğ süt tank yüzeyi (5) örneklerinden; *L. grayi* izolatları B işletmesi salamura suyu (5) örneğinden; *L. seeligeri* izolatları A işletmesi cendere bezi (5) örneğinden elde edildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. İşletmelerin Salamura Beyaz Peynir Üretim Hattının Farklı Noktalarından Elde Edilen *Listeria* spp. İzolatları.

Numune Noktaları	A İşletmesi					B İşletmesi					C İşletmesi					D İşletmesi*
	LM	LI	LW	LG	LS	LM	LI	LW	LG	LS	LM	LI	LW	LG	LS	
ÇS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	
PS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SÜ	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	5	-	-	-	
STT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	
PT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CB	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BK	1	4	10	-	-	-	5	-	-	-	-	5	-	-	-	
DZ	1	9	-	-	-	-	-	5	-	-	-	5	-	-	-	
SS	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	
PAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TOPLAM	2	23	10	-	5	-	10	5	5	-	1	19	5	-	-	

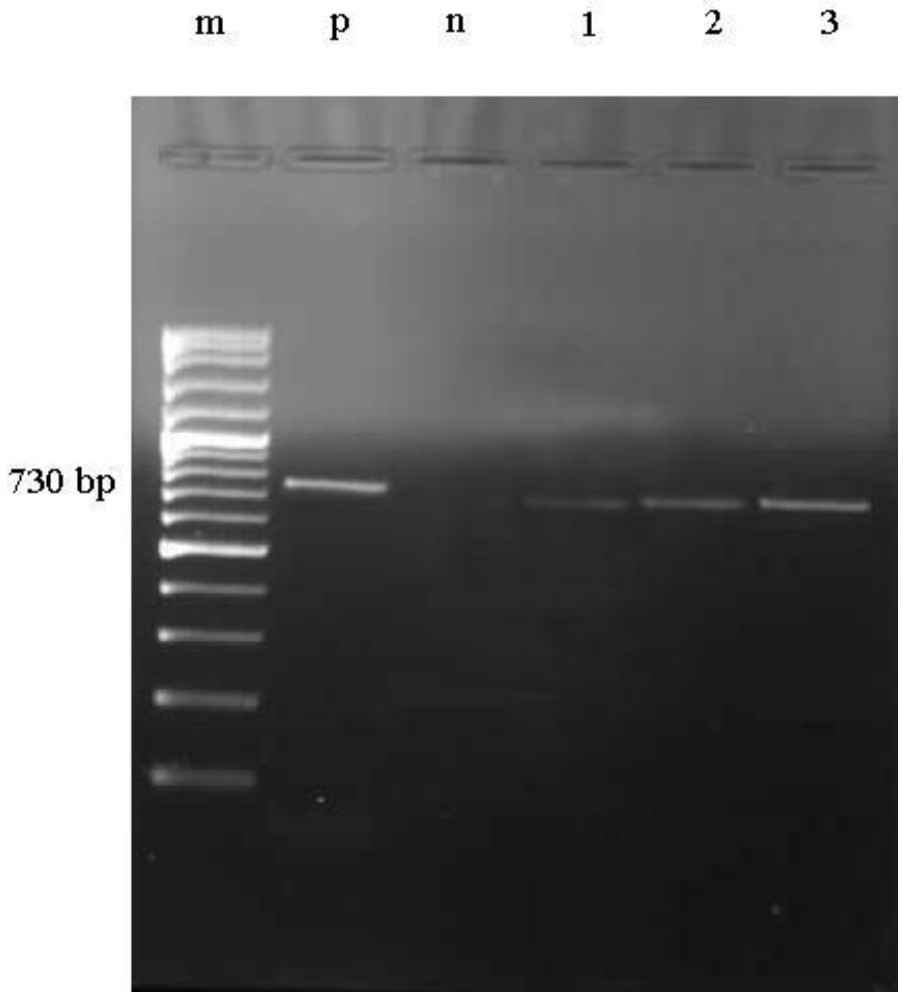
ÇS: Çiğ süt, PS: Pastörize süt, MS: Mayalanmamış süt, PP: Peynir pıhtısı, TEL: Teleme, SÜ: Son ürün SK: Starter kültür, KK: Kalsiyum klorür, M: Maya, STT: Süt toplama tanklarının iç yüzeyi, PT: Peynir teknelerinin iç yüzeyi, CB: Cendere bezi, BK: Baskı kasaları, DZ: Duvar-zemin yüzeyi, SS: Salamura suyu, PAS: Peynir altı suyu.

* D işletmesi örneklerinden *Listeria* spp. izole edilmedi.

LM: *Listeria monocytogenes*. LI: *Listeria ivanovii*. LW: *Listeria welshimeri*. LG*: Listeria grayi*. LS: *Listeria seeligeri*.

3.2. PCR Bulguları

Kültürel izolasyon ve identifikasyonu yapılan *L. monocytogenes* izolatlarının, *hly* gen sekansı araştırılarak PCR ile moleküler identifikasyonu yapıldı. İzolatların hepsinin, *L. monocytogenes hly* genine sahip olduğu belirlendi (Resim 3.1).



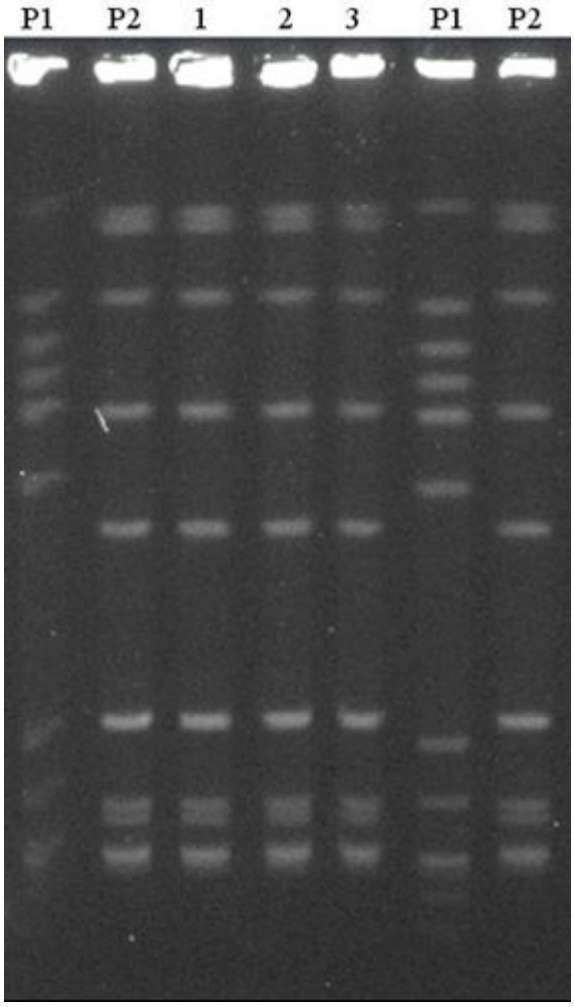
Resim 3.1. Spesifik *hly* Geni İçeren Amplifiye
DNA Örneklerinin U.V Transilluminatör Görüntüsü.
m: 100 bp DNA marker. p: pozitif kontrol (*L. monocytogenes* ATCC 13932). n: negatif kontrol.
1: C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat. 2: A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat.
3: A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat.

3.3. Serotiplendirme Bulguları

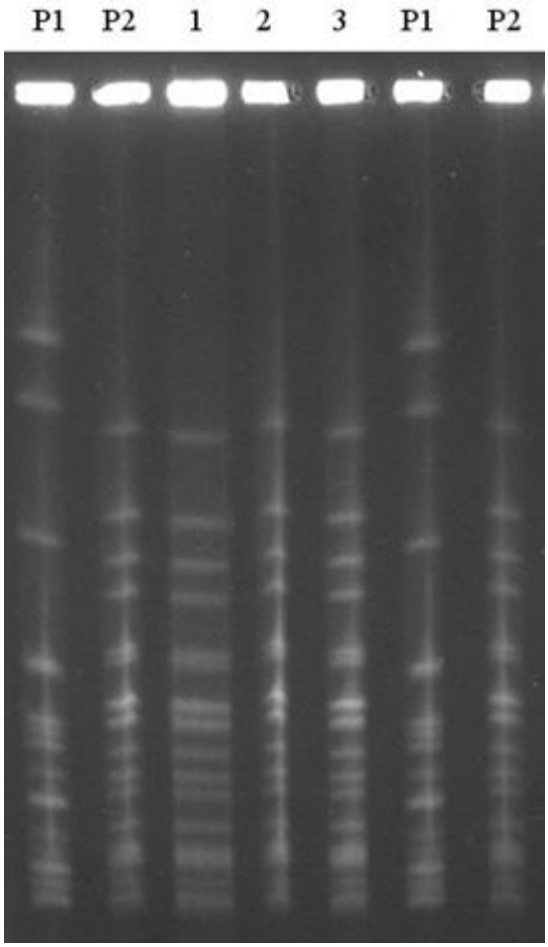
Araştırmada elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının, O (OI/II, OI, OIV, OV/OVI, OVI, OVII, OVIII, OIX) ve H (A, AB, C, D) antijenlerine karşı kullanılan antiserumlarla yapılan serotiplendirmede, hepsinin 4b serotipine dahil olduğu belirlendi.

3.4. PFGE Bulguları

PFGE tekniğiyle izolatların genotiplendirmelerinde, ApaI ve AscI restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra pulsed-field jel elektroforezinde elde edilen DNA bantları, U.V transilluminatörde görüntülendi (Resim 3.2 ve Resim 3.3). BIO 1D++ jel analiz programıyla U.V transilluminatör görüntülerinin bant aralıkları seçildi ve UPGMA programıyla dendogram analizleri gerçekleştirildi.

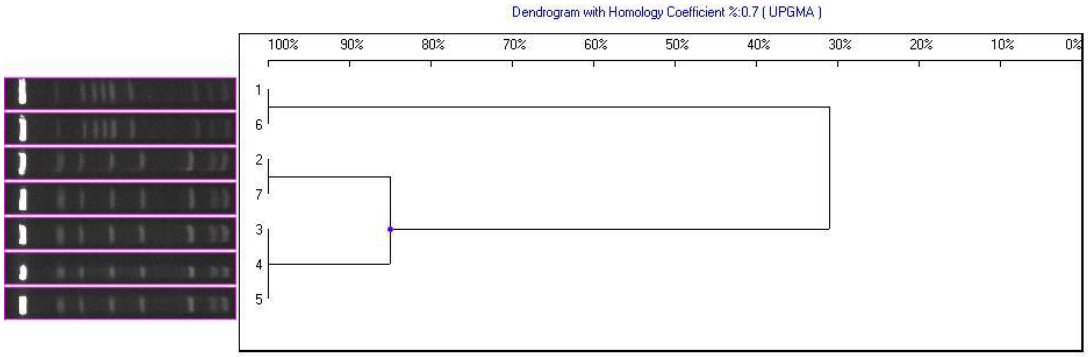


Resim 3.2. AscI Enzimi Kullanılarak Elde Edilen
U.V Transilluminatör Görüntüsü
P1: *L. monocytogenes* EGD 5835 P2: *L. monocytogenes* ATCC 13932.
1: A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat. 2: A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat.
3: C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat.



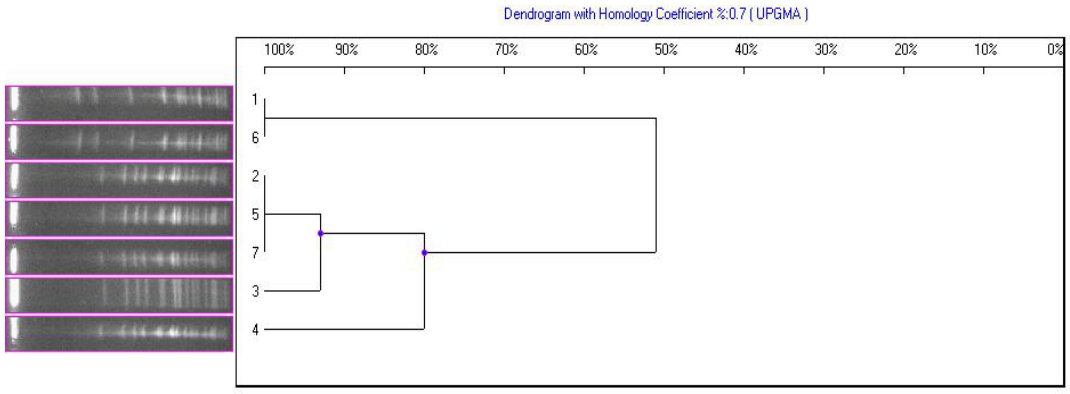
Resim 3.3. ApaI Enzimi Kullanılarak Elde Edilen
U.V Transilluminatör Görüntüsü
P1: *L. monocytogenes* EGD 5835. P2: *L. monocytogenes* ATCC 13932.
1: A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat. 2: A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat.
3: C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat.

UPGMA analiz programıyla oluşturulan PFGE dendogram profilleri, klonal ilişkileri bakımından incelendi. İzolatların kendi aralarındaki ve *L. monocytogenes* EGD ve ATCC referans suşlarıyla homolojileri değerlendirildi. AscI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu elde edilen PFGE dendogram profillerinde (Resim 3.4) üç pulsetip oluştuğu gözlemlendi. EGD ve ATCC referans suşlarının duplike bantları ve izolatlar kendi aralarında %100 homoloji gösterdi. İzolatların ATCC suşuna olan homolojileri ~%85 olarak tespit edildi. İzolatların, EGD suşuna olan homolojileri ~%33 bulundu.



Resim 3.4. AscI Enzim Uygulamalı PFGE Dendogram Profilleri.
1: *L. monocytogenes* EGD 5835. 2: *L. monocytogenes* ATCC 13932. 3: A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat. 4: A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat. 5: C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat. 6: *L. monocytogenes* EGD 5835. 7: *L. monocytogenes* ATCC 13932.

ApaI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu elde edilen PFGE dendogram profillerinde (Resim 3.5), dört pulsetip oluştuğu gözlemlendi. EGD ve ATCC referans suşlarının duplike bantları, kendi aralarında %100 homoloji gösterdi. Bunun yanı sıra C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolatla ATCC suşu arasında da %100 homoloji saptandı. A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolatla, A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolatın, ATCC suşuna homolojileri sırasıyla ~%94 ve ~%80 olarak saptandı. İzolatlarla EGD suşu arasındaki homoloji ~%52 olarak tespit edildi.



Resim 3.5. ApaI Enzim Uygulamalı PFGE Dendogram Profilleri.
1: *L. monocytogenes* EGD 5835. 2: *L. monocytogenes* ATCC 13932. 3: A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat. 4: A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat. 5: C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat. 6: *L. monocytogenes* EGD 5835. 7: *L. monocytogenes* ATCC 13932.

3.5. Antibiyotik Duyarlılık Bulguları

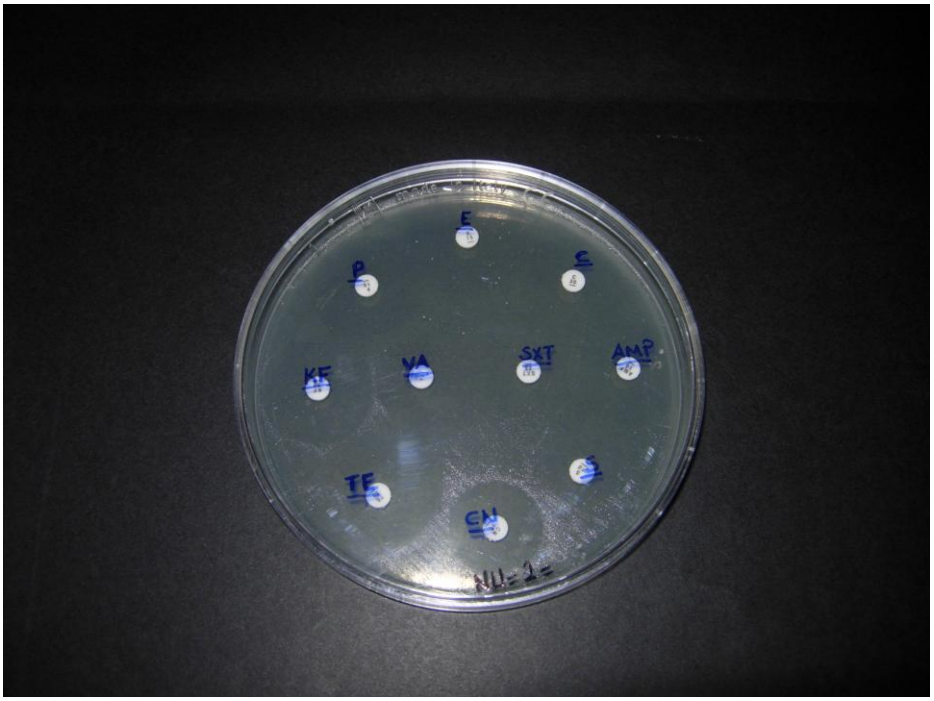
Antibiyogram testi sonucu, *L. monocytogenes* izolatlarının hepsi yedi antibiyotiğe (ampisilin, gentamisin, tetrasiklin, sefalotin, vankomisin, penisilin ve sülfametoksazol/trimethoprim) duyarlı bulundu (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Analiz Sonuçları.

Antibiyotik	Konsantrasyon	İzolatlar K	L	M
Ampisilin	10 µg	S	S	S
Gentamisin	10 µg	S	S	S
Eritromisin	15 µg	S	R	R
Tetrasiklin	30 µg	S	S	S
Kloramfenikol	30 µg	S	M	S
Sefalotin	30 µg	S	S	S
Streptomisin	10 µg	S	M	M
Vankomisin	30 µg	S	S	S
Penisilin	10 U	S	S	S
Sülfametoksazol/ Trimethoprim	25 µg	S	S	S

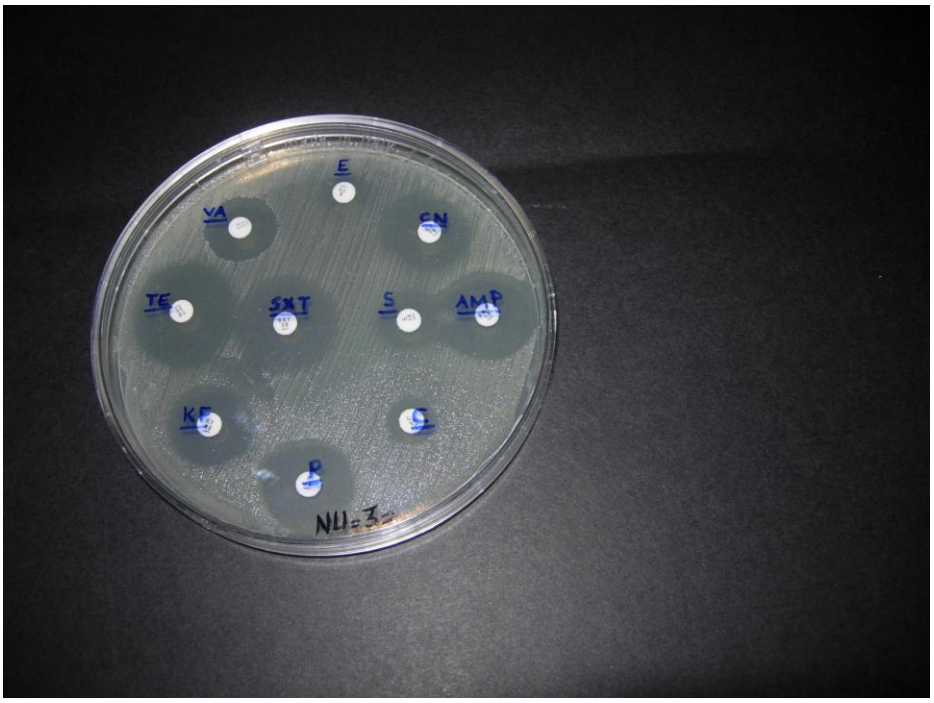
S: Duyarlı. R: Dirençli. M: Orta Düzeyde Duyarlı.
K: A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat. L: A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat. M: C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat.

A işletmesi duvar-zemin numunesinden elde edilen *L. monocytogenes* izolatı on antibiyotiğin hepsine duyarlı bulundu (Resim 3.6).



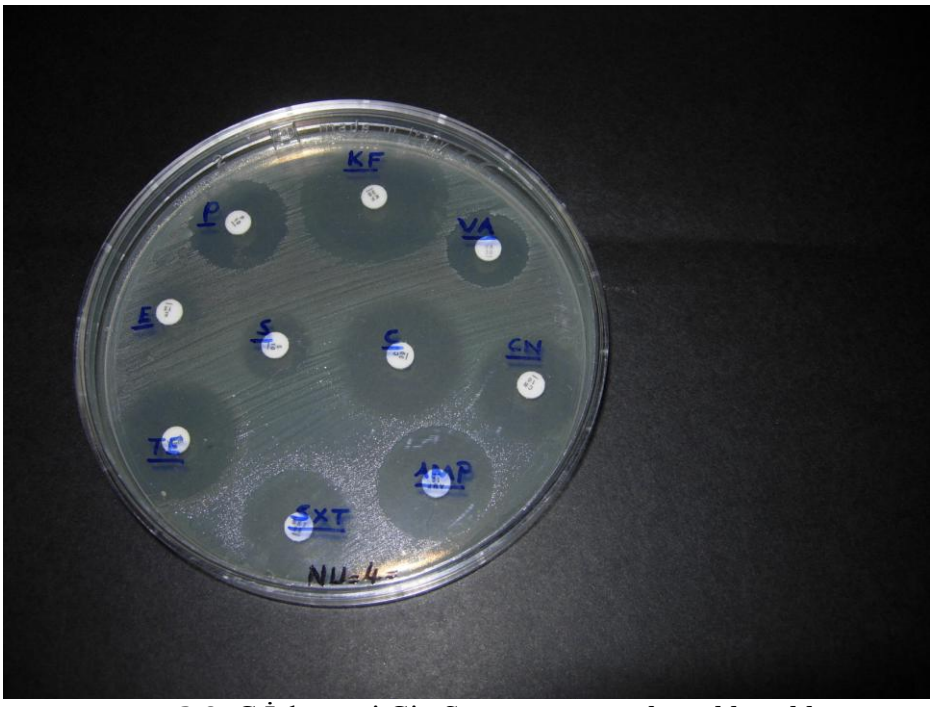
Resim 3.6. A İşletmesi Duvar-Zemin Numunesinden Elde Edilen *Listeria monocytogenes* İzolatı Antibiyogram Görüntüsü.
E: Eritromisin. P: Penisilin. C: Kloramfenikol. KF: Sefalotin. VA: Vankomisin.
SXT: Sülfametoksazol/Trimethoprim. AMP: Ampisilin.
TE: Tetrasiklin. S: Streptomisin. CN: Gentamisin.

A işletmesi baskı kasaları numunesinden elde edilen *L. monocytogenes* izolatı bir antibiyotiğe (eritromisin) dirençli, iki antibiyotiğe (kloramfenikol ve streptomisin) orta düzeyde duyarlı bulundu (Resim 3.7).



Resim 3.7. A İşletmesi Baskı Kasaları Numunesinden Elde Edilen *Listeria monocytogenes* İzolatı Antibiyogram Görüntüsü.
E: Eritromisin. P: Penisilin. C: Kloramfenikol. KF: Sefalotin. VA: Vankomisin.
SXT: Sülfametoksazol/Trimethoprim. AMP: Ampisilin.
TE: Tetrasiklin. S: Streptomisin. CN: Gentamisin.

C işletmesi çiğ süt numunesinden elde edilen *L. monocytogenes* izolatı bir antibiyotiğe (eritromisin) dirençli, bir antibiyotiğe (streptomisin) orta düzeyde duyarlı bulundu (Resim 3.8).



Resim 3.8. C İşletmesi Çiğ Süt Numunesinden Elde Edilen *Listeria monocytogenes* İzolatı Antibiyogram Görüntüsü.
E: Eritromisin. P: Penisilin. C: Kloramfenikol. KF: Sefalotin. VA: Vankomisin.
SXT: Sülfametoksazol/Trimethoprim. AMP: Ampisilin.
TE: Tetrasiklin. S: Streptomisin. CN: Gentamisin.

4. TARTIŞMA

Salamura beyaz peynirlerde kontaminasyona sebep olan *L. monocytogenes*'in dominant genotiplerinin ortaya konulması amacıyla, farklı işletmelerde salamura beyaz peynir üretim prosesinin değişik noktalarından, kültürel yöntem ve PCR ile identifiye edilen *L. monocytogenes* izolatları PFGE yöntemiyle genotiplendirildi.

4.1. Kültürel İzolasyon ve İdentifikasyon

Araştırmada, dört işletmede, üretim prosesinde 16 farklı noktadan, üç değişik zamanda toplanan 192 numunenin incelenmesi sonrasında numunelerin 17'sinden (%8,85) *Listeria* spp. izole edildi. A işletmesinde incelenen örneklerin sekiz, B işletmesinde dört ve C işletmesinde beş tanesi *Listeria* spp. ile kontamine bulundu. D işletmesi örneklerinde *Listeria* spp. ile kontaminasyon tespit edilmedi.

Süt ve değişik peynir çeşitlerinde yapılan çalışmalarda, *Listeria* spp. ile kontaminasyon oranlarının %0-41,66 aralıklarında değiştiği saptanmıştır. Araştırmada elde edilen bulgular, özellikle çiğ süt ve son ürün peynirin kontaminasyonu bakımından irdelendiğinde, günümüze kadar yapılan birçok çalışmayla benzerlik arz etmektedir. Nitekim, çiğ sütlerde *Listeria* spp. ile kontaminasyon oranını, Massa ve ark (1990) İtalya'da %0, Moshtaghi ve Mohamadpour (2007) İran'da %2,2, Waak ve ark (2002) İsveç'te %3,3, Beckers ve ark (1987) Hollanda'da %4,7, Kalorey ve ark (2008) Hindistan'da 6,75, Rea ve ark (1992) İrlanda'da %8,3, Carlos ve ark (2001) Meksika'da %23 olarak tespit etmişlerdir. Türkiye'de çiğ süt numunelerinin *Listeria* spp. ile kontaminasyon oranını, Aslantaş ve Yıldız (2003) %0,93, Aygün ve Pehlivanlar (2006) %2,12, Sağun ve ark (2001) %2,4, Taşçı ve ark (2009) %2,4, Uysal ve Anğ (2003) %3,1, Arda ve ark (1996) %4,6, Vardar-Ünlü ve ark (1998) %6, Issa ve ark (2009) %6,76 olarak saptamışlardır.

Rudolf ve Scherer (2001), değişik ülkelerden temin ettikleri krem peynir numunelerinin %18,2'sinde, Silva ve ark (2003) Brezilya'da Minas Frescal peynirinin %31'inde *Listeria* spp. izole etmişlerdir. Güner ve Telli (2011), Türkiye'nin değişik bölgelerinde yöresel olarak üretilen yarı-sert peynirlerin %41,66'sında, Çetinkaya ve ark (1999) şavak, tulum ve çökelek peyniri numunelerinin %0,88'inde, Gülmez ve Güven (2001) çeçil peyniri numunelerinin %7,5'inde, Kara ve ark (1999) civil peyniri numunelerinin %6,25'inde, Arda ve ark

(1996) sert peynirlerin %5'inde, Arslan ve Özdemir (2008) ev yapımı beyaz peynirlerin %33,1'inde *Listeria* spp. tespit etmişlerdir.

Araştırmada elde edilen bulgular sonucunda, hammaddenin ve peynirin *Listeria* spp. ile kontaminasyon ihtimalinin yüksekliği birçok araştırmacının (Rea ve ark 1992, Carlos ve ark 2001, Taşçı ve ark 2009, Vardar-Ünlü ve ark 1998, Issa ve ark 2009) bulgularıyla desteklenmektedir. Araştırmalar sonucunda çiğ süt ve süt ürünlerinde değişik düzeylerde *Listeria* spp. izole edilmesinde; barınak ve sağım hijyeni farklılıklarının (Aslantaş ve Yıldız 2003), hayvanların beslenme şekillerinin (Erol 2007, Taşçı ve ark 2009), çiğ sütün işletmeye kabulü ve üretim prosesleri bakımından işletmelerde bir standart olmamasının (Bolat 2006) etkili olduğu düşünülmektedir. Peynir üretimi sırasında pastörizasyon işlemi uygulanmasına rağmen, işletmeye kabul edilmiş kontamine çiğ sütün ısıl işleme kadar olan safhalarda üretim çevresine, alet-ekipmana bulaşması neticesinde buralardan farklı noktalara direkt ve endirekt kontaminasyon şekillenebilmektedir. Nitekim Pritchard ve ark (1994), sütün elde edildiği çiftliklerle bitişik dizayn edilmiş süt işletmelerinin %100'ünde üretim hattının farklı noktalarından *Listeria* spp. izole etmişlerdir. Benzer şekilde Sanaa ve ark (1993) peynirlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonunun temel kaynağının çiğ sütler olduğunu, Sağun ve ark (2001) üretim aşamasında diğer kaynaklardan da (örn., toprak, feçes, su, yem, personel, alet-ekipman) kontaminasyon şekillenebileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra Öktem ve ark (2006), salamura beyaz peynir üretim hattı boyunca hijyenik koşulların oluşturulmasının ve çapraz kontaminasyonların önlenmesinin *Listeria* spp. ari peynir üretiminde önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca, bakterinin ubiquiter özelliği (Uhitil ve ark 2004, Erol 2007) ve birçok farklı yüzeyde (örn., paslanmaz çelik, cam, ahşap, plastik, karton) biofilm oluşturabilmesinin (Senczek ve ark 2000, Lado ve Yousef 2007, Montanez-Izquierdo ve ark 2011) çapraz kontaminasyonların görülme sıklığını artıran sebepler olduğu düşünülmektedir.

Araştırmada, kontamine numunelerdeki *Listeria* türlerini belirlemek amacıyla, her bir numuneden beşer, toplamda 85 izolatın incelenmesi sonucunda, 52 *L. ivanovii*, 20 *L. welshimeri*, beş *L. grayi*, beş *L. seeligeri* ve üç *L. monocytogenes* türü identifiye edildi (Çizelge 3.1). Bulguların incelenmesi sonucunda, *L. monocytogenes* kontaminasyonunun diğer *Listeria* türlerine göre daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 3.1). Ayrıca diğer *Listeria* türleri üç işletmenin sekiz farklı noktasından izole edilmesine karşın *L. monocytogenes* izolatları yalnızca

iki işletmenin üç farklı noktasından izole edildi. Araştırmada elde edilen bu bulguları destekler şekilde, Waak ve ark (2002) 294 çiğ süt numunesinde, Issa ve ark (2009) 350 çiğ süt numunesinde, Ahrabi ve ark (1997) 100 çiğ süt numunesinde *L. monocytogenes*'i diğer *Listeria* türlerinden daha düşük düzeyde tespit etmişlerdir. Ancak, *L. monocytogenes*'in insanlarda patojen özelliği gösteren tek tür olması (Hitckins 2003, Bhunia 2008) ve düşük sıcaklık derecelerinde de üreyerek sütlerin işletmelere kabulüne kadar çoğalabilmesinin (Aslantaş ve Yıldız 2003) önem arz ettiği düşünülmektedir. Birçok araştırmada *L. monocytogenes* diğer *Listeria* türlerinden daha düşük düzeyde tespit edilmesine karşın bazı araştırmalarda yüksek düzeyde saptanmıştır. Nitekim Rea ve ark (1992) 589 çiğ süt numunesinde, Arda ve ark (1996) 370 çiğ süt numunesinde, Vardar-Ünlü ve ark (1998) 100 çiğ süt numunesinde, Gaya ve ark (1998) 774 çiğ süt numunesinde, Carlos ve ark (2001) 1300 çiğ süt numunesinde, Sağun ve ark (2001) 250 çiğ süt numunesinde, Uysal ve Anğ (2003) 221 çiğ süt numunesinde, Moshtaghi ve Mohamadpour (2007) 500 çiğ süt numunesinde, Kalorey ve ark (2008) 2060 çiğ süt numunesinde *L. monocytogenes*'i diğer *Listeria* türlerinden daha yüksek düzeyde tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Güner ve Telli (2011) 120 adet Van Otlu, Carra, Konya küflü ve Urfa tulum peynirinde, Arda ve ark (1996) 185 adet sert peynir numunesinde, Uysal ve Anğ (2003) 271 adet salamura beyaz peynir numunesinde, Arslan ve Özdemir (2008) 142 adet ev yapımı beyaz peynir numunesinde *L. monocytogenes*'le kontaminasyon oranını diğer *Listeria* türlerinden daha fazla bulmuşlardır. Dominant *Listeria* türleri bakımından çeşitli araştırmalarda ortaya çıkan bu farklılıkların başlıca, çalışmaların yapıldığı çevrelerde iklimin ve hayvan beslemenin farklılığından (Sanaa ve ark 1993, Sağun ve ark 2001) kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Numunelerin alındığı 16 farklı noktanın sekizinde (çiğ süt tank yüzeyi, çiğ süt, baskı kasaları, duvar-zemin, cendere bezi, maya, salamura suyu ve son ürün) *Listeria* spp. izole edildi. Bu noktaların her biri için alınan 12'şer numunenin kontaminasyon sıklığı; baskı kasaları (5), duvar-zemin (4), cendere bezi (2), maya (2), salamura suyu (1), çiğ süt tank yüzeyi (1), çiğ süt (1) ve son ürün (1) olarak tespit edildi (Şekil 3.2). İzolatların elde edildiği 17 numunenin 14'ü tek bir *Listeria* türüyle, üçü iki *Listeria* türüyle kontamine bulundu. *L. monocytogenes* izolatları A işletmesi baskı kasaları ve duvar-zemin, C işletmesi çiğ süt örneklerinden elde edildi (Çizelge 3.2). Bu bulgular değerlendirildiğinde, salamura beyaz peynir üretiminde pastörizasyon işlemi uygulansa dahi *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes*

kontaminasyonundan ari peynir üretimi için çiğ sütlerin mikrobiyolojik kalitesinin arttırılmasının (Öksüz 1996, Evrensel ve ark 2003) yanı sıra kritik kontrol noktalarının büyük bir dikkatle uygulanmasının (Sarımehmetoğlu ve Kaymaz 1994, Arıcı ve ark 1999, Kasımoğlu 1999, Evrensel ve ark 2003, El-Hofi ve ark 2010), çiğ sütler (Sanaa ve ark 1993, Evrensel ve ark 2003, Temelli ve ark 2006), çevresel kaynaklar (Sağun ve ark 2001, Erol 2007) ile üretim ortamından (Arvanitoyannis ve Mavropoulos 2000, Issa ve ark 2009, Fox ve ark 2011) olabilecek kontaminasyonlara karşı her türlü önlemin alınması ve rutin kontrollerin titizlikle yapılmasının önem arz ettiği (Öktem ve ark 2006) kanaatine varılmıştır.

4.2. PCR

Araştırmada, kontamine numunelerden elde edilen 85 izolatın hepsi *L. monocytogenes hly* geni varlığı bakımından PCR ile incelendi. Kültürel yöntemle identifikasyonu yapılan üç *L. monocytogenes* izolatının hepsinin *hly* genine sahip olduğu ve 732 bp'de bant verdiği tespit edildi (Resim 3.1). Bunun yanı sıra biyokimyasal testlerle diğer *Listeria* türlerine ait olduğu saptanan izolatlar PCR'da negatif sonuç verdi. Benzer şekilde Ahrabi ve ark (1997), Türkiye'nin değişik bölgelerinden elde ettikleri 100 çiğ süt numunesinde *Listeria* spp. varlığını araştırmışlardır. Şüpheli kolonilerden beşer izolatı biyokimyasal testlerle tür düzeyinde identifiye ettikten sonra izolatların hepsine PCR yöntemini uygulayarak sonuçları biyokimyasal testlerle karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, biyokimyasal testlerle identifiye edilen *L. monocytogenes* izolatlarının hepsinin PCR yöntemiyle de bant verdiğini bunun yanı sıra biyokimyasal testlerle diğer *Listeria* türlerine ait olduğu saptanan izolatların PCR'da negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Kalorey ve ark (2008), Hindistan'da 2060 çiğ süt numunesinden kültürel yöntemle elde ettikleri *Listeria* spp. izolatlarının identifikasyonunu PCR ile moleküler olarak gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, 105 *L. monocytogenes* izolatının 90 tanesinin *L. monocytogenes* olarak saptandığını, diğer *Listeria* spp. türlerine ait izolatların PCR'da negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmadaki amaca benzer şekilde, Aznar ve Alancon (2003) değişik gıdalardan, Dümen ve ark (2011) süt ve ürünlerinden, Lakicevic ve ark (2010) bir gıda işleme tesisinin alet-ekipman ve çevresel noktalarından aldıkları örneklerde kültürel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu yapılan *L. monocytogenes* izolatlarını PCR'la moleküler düzeyde inceleyerek, kültürel sonuçların doğruluğunu kontrol etmişlerdir. Araştırmacılar PCR'ın bu amaç için duyarlılığı yüksek (Aznar ve

Alancon 2003), hızlı, güvenilir ve özgül (Ahrabi ve ark 1997) olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Holko ve ark (2002), çiğ süt ve peynir numunelerinde *L. monocytogenes* varlığını tespit etmek amacıyla, kültür ve PCR tekniğini karşılaştırmışlardır. Çalışmadaki bulgulara benzer olarak, her iki yöntemle elde ettikleri sonuçların benzerlik arz ettiğini ancak PCR'ın daha kısa sürede sonuç verdiğini ileri sürmüşlerdir.

Wieckowska ve ark (1998), *hly*A geni primerini kullanarak, çiğ süt numunelerinde *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar, PCR'ın çiğ sütlerde *L. monocytogenes* varlığının araştırılmasında etkin olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Gouws ve Liedemann (2005), değişik gıdalarda *L. monocytogenes* varlığını, kültürel yöntem, API *Listeria* test kiti ve PCR ile araştırmışlardır. Numunelerin, kültürel yöntemle %74'ünü, API metoduyla %44'ünü, PCR'la %37'sini pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar, PCR çalışması sonucu elde ettikleri verilerin daha hassas olduğunu ve yanlış pozitif reaksiyonları engellediğini ileri sürmüşlerdir.

4.3. Serotiplendirme

Araştırmada elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının, O (OI/II, OI, OIV, OV/OVI, OVI, OVII, OVIII, OIX) ve H (A, AB, C, D) antiserumlarla yapılan serotiplendirilmesinde, hepsinin 4b serotipine dahil olduğu belirlendi. İnsan listeriozisine neden olan dominant serotiplerin 4b, daha az olarak da 1/2a ve 1/2b serotipleri olmasının (Erol 2007) yanı sıra 4b serotipinin son yıllarda Avrupa'da görülen listeriozis salgınlarında dominant olarak saptanması ve sporadik ve epidemik listeriozis vakalarının yaklaşık 2/3'ünden sorumlu olması (Lunden ve ark 2004) dikkate alındığında, araştırmada elde edilen sonuçların önem arz ettiği düşünülmektedir.

Araştırmada elde edilen bu bulgulardan farklı olarak Holko ve ark (2002) çiğ süt ve peynir örneklerinden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının 4ab, Dümen ve ark (2011) İstanbul ve Trakya Bölgesi'nde süt ve ürünlerinden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının 4d, Giovannacci ve ark (1999) domuz kesim yerlerinden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının 1/2a, 1/2c ve 3a, Dauphin ve ark (2001) dondurulmuş füme somon üretimi yapan üç ayrı işletmenin üretim aşamalarının farklı noktaları, işletme çevresi ve alet-ekipmandan elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotipine dahil olduğunu tespit

etmişlerdir. Araştırma sonuçlarındaki bu farklılıkların, bölgesel değişikliklere ait serotip dağılımından (Dümen ve ark 2011) kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.4. PFGE

PFGE tekniğiyle izolatların genotiplendirmelerinde, ApaI ve AscI restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra pulsed-field jel elektroforezinde elde edilen DNA bantlarına ait U.V transilluminatör görüntülerinin (Resim 3.2, Resim 3.3), BIO 1D++ jel analiz programıyla DNA bant aralıkları seçildi. Oluşan profiller, klonal ilişkileri bakımından UPGMA programıyla değerlendirildi.

AscI restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen PFGE dendogram profilinde (Resim 3.4) ATCC ve EGD referans suşlarının duplike bantları %100 homoloji gösterdi. Benzer şekilde izolatlardan elde edilen bantlarında kendi aralarında %100 homoloji gösterdiği belirlendi. İzolatların, ATCC ve EGD suşlarına olan homolojileri sırasıyla ~%85 ve ~%33 olarak saptandı. ApaI restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen PFGE dendogram profilinde (Resim 3.5), ATCC ve EGD referans suşlarının duplike bantları kendi aralarında %100 homoloji gösterdi. İzolatların ATCC suşuna homolojileri, C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolatta %100, A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolatta ~%94, A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolatta ~%80 olarak belirlendi. EGD suşu ile izolatlar arasındaki homoloji ~%52 olarak bulundu. İzolatlar kendi aralarında değerlendirildiğinde, A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolata ~%94, A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat diğer iki izolata ~%80 homoloji gösterdi.

AscI ve ApaI enzimiyle yapılan kesim sonucu elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, üç *L. monocytogenes* izolatının araştırmada kullanılan ve menenjitli bir çocuğun omurilik sıvısından elde edilmiş ATCC suşuna olan homolojisinin, araştırmadaki diğer kontrol suşu olan ve tavşanlardaki akut menenjit vakalarından elde edilen EGD suşuna göre daha yüksek bulunması, araştırmada elde edilen izolatların insanlarda sporadik ve epidemik listeriozise neden olan suşlara genetik yakınlıklarının daha fazla olduğunu düşündürmektedir. İzolatlar ile kontrol suşları (ATCC ve EGD) arasındaki homoloji farklılıkları, araştırmada elde edilen izolatlar ve ATCC suşunun 4b serotipi ve Grup IIa soy grubuna, EGD suşunun ise 1/2a serotipi ve Grup Ia soy grubuna (Rocourt ve Buchrieser 2007) dahil olmasıyla da açıklanabilir. Bu durum, beklenildiği gibi izolatların ATCC suşuyla olan genetik yakınlıklarının fazla olmasını destekler niteliktedir.

ApaI enzimiyle yapılan kesim sonucu elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, farklı işletmelerin farklı noktalarından elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının kendi aralarında ve ATCC suşuyla yakın, EGD suşuyla uzak homolojileri olduğu tespit edildi. Çiğ sütten elde edilen izolatın ATCC suşuyla %100 homoloji göstermesi, sütün üretim merkezinde direkt ve endirekt kontaminasyonunun bir göstergesi olabilir. A işletmesi duvar-zemin ve baskı kasalarından elde edilen izolatların, ATCC suşuna karşı gösterdikleri homolojinin çiğ sütten elde edilen izolata göre düşük çıkmasının, çevresel stres faktörlerine karşı adapte olabilmeleri amacıyla genetik yapılarında oluşturdukları değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu bulguları destekler şekilde Liu (2008), *L. monocytogenes* soylarının farklı çevre koşullarına adaptasyonlarını kolaylaştıran gen bölgelerinin farklı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

AscI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu 7-9 adet fragment ve üç pulsetip, ApaI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu 14-15 adet fragment ve dört pulsetip elde edildi. Ayrıca ApaI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu elde edilen dendogram analizlerinde, farklı noktalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının homolojileri, AscI'a göre daha düşük bulundu. Bunun yanı sıra ApaI enzimiyle elde edilen sonuçlarda, C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat diğer iki izolattan pulsetip olarak ayrıldı. AscI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolatla, A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat %100 homoloji gösterdi. Ancak ApaI enzimiyle elde edilen dendogram profillerinde bu iki izolat %80 homoloji gösterdi. Elde edilen bu sonuçlar, ApaI enzimiyle yapılan kesimde, DNA'ların daha sık alanlarda kesildiği, daha fazla DNA fragmenti ve pulsetip oluştuğu, dolayısıyla ApaI enziminin DNA'yı küçük boyutta fragmentlere ayırmasıyla klonal ilişkileri daha duyarlı nitelediğini göstermektedir. Bulguları destekler nitelikte Hamdi ve ark (2007), Cezayir'de süt ve süt tanklarından elde ettikleri 11 *L. monocytogenes* izolatını ApaI ve AscI enzimlerini kullanarak PFGE tekniğiyle genotiplendirmişlerdir. Araştırmacılar, ApaI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu 11-19 adet fragment, AscI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu 9-10 adet fragment elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra ApaI ve AscI enzimleriyle yaptıkları restriksiyon sonucu elde ettikleri dendogram profillerinde, beş ve dört adet pulsetip saptadıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Yde ve Genicot (2004), Belçika'da 2001 yılında insanlarda görülen listeriozis vakalarından elde ettikleri 48 *L. monocytogenes* izolatı arasındaki klonal ilişkileri ortaya koymak

amacıyla ApaI ve AscI enzimlerini kullanarak PFGE tekniğini uygulamışlardır. Araştırmacılar, ApaI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu 8-21 adet fragment, AscI enzimiyle yapılan restriksiyon sonucu 6-12 adet fragment elde edildiğini, dendogram profillerinde sırasıyla 38 ve 34 adet pulsetip saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bunun yanı sıra aynı çalışmada, üç yaşlı hastada görülen listeriozis olgularından elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarında, ApaI enzimiyle restriksiyon sonucu AscI'ya göre dört adet farklı bant oluştuğunu bildirmişlerdir. Neves ve ark (2008), Portekiz'de insanlardan elde ettikleri 80 *L. monocytogenes* izolatında AscI enzimiyle 7-16 adet fragment, ApaI enzimiyle 11-16 adet fragment elde etmişlerdir. Chou ve Wang (2006), insanlar, yayın balığı ve diğer deniz ürünlerinden elde ettikleri sırasıyla 57, 35 ve 36 *L. monocytogenes* izolatında, ApaI enzimiyle elde edilen pulsetip sayısının (sırasıyla 48, 29 ve 21), AscI enzimiyle elde edilen pulsetip sayısından (sırasıyla 41, 28 ve 21) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

CDC PulseNet tarafından yayınlanan, *L. monocytogenes* izolatlarının genotiplendirmeleri standart PFGE metodunda, ApaI ve AscI restriksiyon enzimlerinin kullanılması önerilmektedir. Fakat günümüze kadar PFGE ile yapılan genotiplendirme amaçlı çalışmalarda, her iki enzimle kesme işlemi yapılabildiği gibi özellikle ApaI enzimi yalnız başına ya da diğer farklı enzimlerle (örn., EcoRI, SmaI) birlikte kullanılarak kesme işlemi yapılmıştır. Giovannacci ve ark (1999) domuz kesim yerlerinden elde ettikleri 287 *L. monocytogenes* izolatının, Gravesen ve ark (2000) gıdalar, klinik vakalar ve çevreden elde ettikleri 48 *L. monocytogenes* izolatının genotiplendirilmelerinde ApaI enzimini öncelikli olarak kullandıklarını, Gianfranceschi ve ark (2002) ApaI enziminin *L. monocytogenes* izolatlarının genotiplendirilmelerinde en yüksek ayırt edici nitelikteki enzim olduğunu ifade etmişlerdir. Senczek ve ark (2000) bir et işleme tesisinin farklı işleme alanlarından ve et ürünlerinden iki yılda elde ettikleri 81 adet, Katsuda ve ark (2000) gıdalardan, çevreden ve klinik vakalardan elde ettikleri 12 adet, Dauphin ve ark (2001) dondurulmuş füme somon üretimi yapan üç ayrı işletmenin üretim aşamalarının farklı noktaları, işletme çevresi ve alet-ekipmandan elde ettikleri 59 adet *L. monocytogenes* izolatının genotiplendirmesini ApaI ve SmaI enzimlerini birlikte kullanarak yapmışlardır. Lukinmaa ve ark (2004) Finlandiya'da 1997-1999 yılları arasında klinik vakalar ve çeşitli gıda üretim yerlerinden elde edilen 188 *L. monocytogenes* izolatının genotiplendirmelerinde ApaI enzimiyle birlikte EcoRI enzimini kullanmışlardır.

4.5. Antibiyotik Duyarlılık

Araştırmada elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının ampisilin, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, sefalotin, streptomisin, vankomisin, penisilin ve sülfametoksazol/trimethoprim antibiyotiklerine duyarlılık profilleri belirlendi. İzolatların hepsi ampisilin, gentamisin, tetrasiklin, sefalotin, vankomisin, penisilin ve sülfametoksazol/trimethoprime duyarlı bulundu (Çizelge 3.3). Benzer şekilde Choi ve ark (2001) Kore'de 410 gıda numunesinden izole ettikleri sekiz adet *L. monocytogenes* izolatını ampisilin, kloramfenikol, sefalotin, gentamisin, streptomisin ve trimethoprim-sülfametoksazole, Godreuil ve ark (2003) Fransa'da insanlarda görülen listeriozis olgularından elde ettikleri 488 *L. monocytogenes* izolatının beş tanesini ampisilin, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, streptomisin, vankomisin ve trimethoprime, Navratilova ve ark (2004) 2000-2002 yılları arasında çeşitli gıda maddelerinden elde ettikleri 70 *L. monocytogenes* izolatını ampisilin, sefalotin, gentamisin, penisilin, tetrasiklin ve vankomisine, Hansen ve ark (2005) Danimarka'da 1958-2001 yılları arasında insanlarda görülen listeriozis vakalarından elde edilen 106 *L. monocytogenes* izolatını ampisilin, gentamisin, sülfametoksazol, trimethoprim, eritromisin, vankomisin, kloramfenikol ve tetrasikline, Vitas ve ark (2007) İspanya'da 1995-2005 yılları arasında gıdalardan ve klinik vakalardan elde ettikleri 440 *L. monocytogenes* izolatını ampisilin, penisilin, eritromisin, sefalotin, gentamisin, kloramfenikol ve trimethoprime, Şireli ve Gücükoğlu (2008) Ankara'da farklı gıda numunelerinden elde ettikleri on *L. monocytogenes* izolatını kloramfenikol, trimethoprim ve tetrasikline, Dümen ve ark (2011) İstanbul ve Trakya Bölgesi'nde süt ve ürünlerinden elde ettikleri 20 *L. monocytogenes* izolatını kloramfenikol, vankomisin ve gentamisine duyarlı bulmuşlardır. Araştırmada elde edilen bulgulardan farklı olarak, Facinelli ve ark (1991) İtalya'da gıda örneklerinden izole ettikleri 98 *L. monocytogenes* izolatının dördünde streptomisin ve sülfametoksazole, birinde kloramfenikole, Srinivasan ve ark (2005) dört süt üretim çiftliğinden izole ettikleri 38 *L. monocytogenes* izolatının hepsinde streptomisin ve trimethoprime, büyük çoğunluğunda ampisiline, yarısında tetrasiklin, penisilin ve kloramfenikole, Harakeh ve ark (2009) Lübnan'da üretilen peynir çeşitlerinden izole ettikleri 23 *L. monocytogenes* izolatında penisilin ve ampisiline direnç tespit etmişlerdir. Rodas-Suarez ve ark (2006), balık ve diğer deniz ürünlerinden elde ettikleri 68 *L. monocytogenes* izolatında, bazı antibiyotiklere dirençli bulunma oranlarını sırasıyla sefalotin (%26,7), ampisilin (%23,7), penisilin

(%22,5), trimethoprim/sülfametoksazol (%12,7), eritromisin (%12,1), tetrasiklin (%6,4) ve gentamisin (%2,3) olarak saptamışlardır. Benzer şekilde Conter ve ark (2009), gıdalar ve gıda üretim çevrelerinden elde ettikleri 120 *L. monocytogenes* izolatının 14 tanesinde bazı antibiyotiklere (örn., ampisilin, trimethoprim-sülfametoksazol, vankomisin ve tetrasiklin) farklı oranlarda direnç tespit etmişlerdir.

Araştırmada, A işletmesi duvar-zeminden elde edilen izolat on antibiyotiğin hepsine duyarlı (Resim 3.6), A işletmesi baskı kasalarından elde edilen izolat eritromisine dirençli, kloramfenikol ve streptomisine orta düzeyde duyarlı (Resim 3.7), C işletmesi çiğ sütten elde edilen izolat eritromisine dirençli, streptomisine orta düzeyde duyarlı (Resim 3.8) bulundu. Listeriozisin tedavisinde penisilin, trimethoprim/sülfametoksazol, tetrasiklin, kloramfenikol ya da eritromisin kullanılması (Navratilova ve ark 2004) dikkate alındığında, araştırmada elde edilen üç izolattan ikisinde eritromisine direnç saptanmasının önem arz ettiği düşünülmektedir. *L. monocytogenes*'in, Gram pozitif bakterilere karşı etkili antibiyotiklere (örn., ampisilin, penisilin yada bunların aminoglikozidlerle kombinasyonu, trimethoprim, trimethoprim/sülfametoksazole, tetrasiklin, eritromisin, gentamisin) duyarlılık gösterdiği (Yücel ve ark 2005) bilinmesine karşın bu bakteride 1988 yılında ilk kez antibiyotik dirençliliği tespit edilmesi ve sonrasında gıdalar ve sporadik vakalardan çoklu dirençlilik özelliklerine sahip izolatların saptanması (Charpentier ve Courvalin 1999, Conter ve ark 2009) eritromisine karşı tespit edilen direnci destekler niteliktedir.

Araştırmada elde edilen izolatların hiçbirisinde çoklu direnç tespit edilmedi. Conter ve ark (2009) çoklu dirençlilik gösteren *L. monocytogenes* suşlarının izolasyonunun yaygın olmadığını fakat farklı kaynaklardan elde edilen izolatların çoklu direnç özelliklerine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Antibiyotik direnç genlerini taşıyan enterokokal ve streptokokal plazmidler ve transpozonların, *Enterococcus* ve *Streptococcus*'tan *Listeria*'ya transfer edilmesi (Charpentier ve Courvalin 1999, Conter ve ark 2009), *L. monocytogenes* izolatlarında çoklu direnç görülebileceğini destekler niteliktedir. Antibiyotik direnç genlerinin aktarımı sonucu *L. monocytogenes*'in direnç özelliklerinde görülen genetik farklılaşma nedeniyle, *L. monocytogenes* izolatları farklı ekolojiler ve/veya coğrafik bölgelerde, antibiyotik direnç özellikleri bakımından tür içerisinde önemli oranda değişkenlik gösterebilmektedirler (Dümen ve ark 2011). Bunun yanı sıra birçok faktörün (örn., çevre, coğrafik bölge, kontamine gıdada gelişen saprofitlerin sayısı ve oranı), genetik

varyasyonları ve *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençliliklerini etkilediği bildirilmiştir (Rodas-Suarez ve ark 2006, Dümen ve ark 2011).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada, salamura beyaz peynir üretim prosesinin üç farklı noktasından ve özellikle çiğ sütten *L. monocytogenes* izole edilmesi, salamura beyaz peynir üretimi sırasında kontaminasyon riskinin yüksekliğini göstermektedir.

Araştırmada elde edilen üç izolatın, en patojen ve en yaygın 4b serotipine dahil olması halk sağlığı bakımından önem arz etmektedir.

Baskı kasalarından elde edilen izolatın eritromisine dirençli, kloramfenikol ve streptomisine orta düzeyde duyarlı, çiğ sütten elde edilen izolatın eritromisine dirençli, streptomisine orta düzeyde duyarlı olarak tespit edilmesi antibiyotik direnci bakımından önem arz etmektedir.

PFGE ile genotiplendirme sonrası çiğ sütten elde edilen izolatın, insanlarda görülen menenjit vakasından izole edilmiş ATCC suşuna %100, duvar-zemin ve baskı kasalarından elde edilen izolatlarında sırasıyla ~%94 ve ~%80 homoloji göstermesi, peynir kaynaklı listeriozis riskinin yüksekliğini göstermektedir.

Yukarıda ifade edilen araştırmanın başlıca bulguları değerlendirilerek, halk sağlığı ve *L. monocytogenes* epidemiyolojisi açısından şu öneriler yapılabilir;

Güvenli gıda üretiminin bir ön gereksinim koşulu olan birincil üretimin kontrol altına alınması, *L. monocytogenes*'den ari peynir üretimi noktasında önem arz etmektedir. Bu amaçla, hayvanların bakım ve besleme koşullarının düzeltilmesi, sağlık kontrollerinin sık aralıklarla yapılması gerekmektedir. Ayrıca, işletmelerde temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin, fiziki planlamanın ve personel eğitiminin en üst düzeyde gerçekleştirilmesi ve periyodik aralıklarla kontrolünün yapılması önem arz etmektedir.

L. monocytogenes'in epidemiyolojisine etkin veriler kazandırılması, hastalığın tedavisinde etkili antibiyotiklerin kullanılması ve antibiyotik direncinin engellenmesi amacıyla genotiplendirme çalışmalarına hız verilmesi için PulseNet değerlendirme ağının genişletilerek bütün ülkelerin epidemiyolojik bilgi paylaşımına dahil olması önem arz etmektedir.

L. monocytogenes'in antibiyotik direnç özellikleri ve dolayısıyla tedavi prosedürlerinin belirlenmesinde, epidemiyolojik bilgi paylaşımı ve pulsetip değerlendirme ağının kurulması önem arz etmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Listeria monocytogenes'in Salamura Beyaz Peynir Üretim Hattında Kontaminasyon Kaynaklarının Belirlenmesi ve PFGE Metodu İle Genotiplendirilmesi

Nihat TELLİ

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2012

Araştırmada, dört işletmeden salamura beyaz peynir üretim prosesinin 16 noktasından toplam 192 numune, *L. monocytogenes* kontaminasyonu bakımından incelendi. Numunelerde *Listeria* spp. varlığı, kültürel ve PCR yöntemiyle araştırıldı. Antiserumlarla serotiplendirilen izolatlar, PFGE yöntemiyle genotiplendirildi. İzolatların on antibiyotiğe duyarlılıkları disk difüzyon metoduyla belirlendi.

192 numuneden 17'sinin (%8,85) *Listeria* spp. ile kontamine olduğu tespit edildi. Kontamine numunelerden üçünde *L. monocytogenes* izole edildi. *L. monocytogenes* izolatları; A işletmesi baskı kasaları ve duvar-zemin, C işletmesi çiğ süt örneklerinden elde edildi.

L. monocytogenes izolatlarının hepsinin 4b serotipine dahil olduğu belirlendi. *L. monocytogenes* izolatlarının AscI restriksiyon enzimiyle genotiplendirilmelerinde, ATCC ve EGD suşuna olan homolojileri sırasıyla ~%85 ve ~%33 olarak saptandı. ApaI restriksiyon enzimiyle ATCC suşuna olan homoloji, C işletmesi çiğ süt izolatında %100, A işletmesi duvar-zemin izolatında ~%94, A işletmesi baskı kasaları izolatında ~%80 olarak belirlendi. EGD suşu ile izolatlar arasındaki homoloji ~%52 olarak bulundu.

İzolatların hepsi ampisilin, gentamisin, tetrasiklin, sefalotin, vankomisin, penisilin ve sülfametoksazol/trimethoprime duyarlı bulundu. Bunun yanı sıra A işletmesi duvar-zemin örneğinden elde edilen izolat on antibiyotiğin hepsine duyarlı, A işletmesi baskı kasaları ve C işletmesi çiğ süt örneklerinden elde edilen izolatlar eritromisine dirençli bulundu.

Sonuç olarak, salamura beyaz peynir üretim prosesinde yer alan farklı noktalardan *L. monocytogenes* izole edilmesi, salamura beyaz peynirlerin kontaminasyonu ve halk sağlığı bakımından önem arz etmektedir. Birincil üretimden tüketime kadar olan bütün aşamaların gıda güvenliği açısından kontrol altına alınması, beyaz peynir kaynaklı listeriozis riskinin azaltılması bakımından önem arz etmektedir. *L. monocytogenes*'in epidemiyolojisine etkin veriler kazandırılması, listeriozisin tedavisinde etkili antibiyotiklerin kullanılması ve antibiyotik direncinin engellenmesi amacıyla genotiplendirme çalışmalarına hız verilmesi ve PulseNet değerlendirme ağının genişletilerek bütün ülkelerin epidemiyolojik bilgi paylaşımına dahil olması önem arz etmektedir.

Anahtar Sözcükler : Salamura beyaz peynir; *L. monocytogenes*; PCR; Serotiplendirme; PFGE.

7. SUMMARY

Detection of Contamination Sources of *Listeria monocytogenes* in Pickled White Cheese Production Process Line and Genotyping With PFGE Method.

In this study, totally 192 samples collected from 16 different points of production processes of pickled white cheese from four different establishments were investigated for presencing of contamination with *L. monocytogenes*. Presence of *Listeria* spp. in samples was examined using cultural and PCR methods. The isolates serotyped using antisera were genotyped by PFGE method. Isolates were evaluated to determine the susceptibility to ten antibiotics using disc diffusion method.

17 out of 192 samples (8,85%) were found contaminated with *Listeria* spp. Three of the samples from contaminated samples were identified as *L. monocytogenes. L. monocytogenes* were isolated from pressure equipments and wall-surfaces of establishment A, from raw milk samples of establishment C.

It was determined that all of the isolates of *L. monocytogenes* were among 4b serotype. The homology levels of *L. monocytogenes* isolates to ATCC and EGD strains which were genotyping with AscI restriction enzyme were determined as ~85% and ~33%. The homology level of the isolates restricted with ApaI enzyme to ATCC strain was determined as 100% in raw milk isolates from establishment C, ~94% in wall-surface isolates and ~80% in pressure equipments from establishment A. The homology level of all isolates to EGD strain were determined as ~52%.

All of the isolates were found susceptible to ampiciline, gentamycine, tetracycline, cephalotine, vancomycine, peniciline, sulphametoxasol/trimethoprime. Isolates from wall-surface samples in establishment A were found susceptible to all of ten antibiotics. Isolates from pressure equipments in establishment A and raw milk samples in establishment C were found resistant to eritromycine.

As a result, isolation of *L. monocytogenes* in different points of pickled white cheese production processes poses a major risk to public health and contamination of pickled white cheeses. From primary production to consumption, the controlling of all the processes throughout food production line for the production of safety food present a major importance for reducement of listeriosis risk sourced in pickled white cheese. It is important that the genotyping studies should be increased to add active data to *L. monocytogenes* epidemiology and to utilise effective antibiotics in treatment of listeriosis and to prevent antibiotic resistance for extention and also addition of PulseNet evaluation network into worldwide epidemiologic database for these purposes.

Key Words : Pickled white cheese; *L. monocytogenes*; PCR; Serotyping; PFGE.

8. KAYNAKLAR

1.Ahrabi SS, Ergüven S, Günalp A. Çiğ Sütlerde *Listeria* Türlerinin İnsidansı ve *Listeria monocytogenes*'in Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hızlı Tanısı. Mikrobiyol Bült. 1997; 31: 263-68.

2.Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a Vegetable Processing Plant by RAPD and REA. Int J Food Microbiol. 2004; 90: 341-47.

3.Akkaya L, Alişarlı M. Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. Varlığının Belirlenmesi. YYÜ Vet Fak Derg. 2006; 17, 1-2: 87-91.

4.Akkoç N, Şanlıbaba P, Akçelik M. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. EÜ Fen Bil Ens Derg. 2009; 25, 1-2: 59-70.

5.Akpolat NÖ, Elçi S, Atmaca S, Gül K. *Listeria monocytogenes* in Products of Animal Origin in Turkey. Vet Res Com. 2004; 28: 561-67.

6.Arda G, Özsoy MF, Koçak N, Çavuşlu Ş, Keskin K, Yenen OŞ. Süt ve Süt Ürünlerinde *Listeria* Araştırılması. Klimik Derg. 1996; 9, 3: 152-55.

7.Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması. Alınmıştır: Temizkan G, Arda N, editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Üçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Kitabevleri Ltd. Şti. 2008. p. 101-09.

8.Arıcı M, Demirci M, Gündüz HH. *Listeria monocytogenes*'in İnek ve Koyun Sütünden Yapılan Salamura Beyaz Peynirlerin İmalat, Olgunlaşma ve Depolama Aşamalarındaki Durumu. Tr J Agriculture and Forestry. 1999; 23, Ek Sayı 5: 1133-37.

9.Arslan S, Özdemir F. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria* spp. in Homemade White Cheese. Food Cont. 2008; 19, 4: 360-63.

10.Arvanitoyannis IS, Mavropoulos AA. Implementation of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Kasseri/Kefalotiri and Anevato Cheese Production Lines. Food Control. 2000; 11: 31-40.

11.Aslantaş Ö, Yıldız P. Kars İlinde Çiğ Sütlerden *Listeria monocytogenes* İzolasyonu. FÜ Sağ Bil Derg. 2003; 17, 1: 11-15.

12.Aygün O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in the Raw Milk and Dairy Products in Antakya, Turkey. Food Cont. 2006; 17, 8: 676-79.

13.Aznar R, Alarcon B. PCR Detection of *Listeria monocytogenes*: A Study of Multiple Factors Affecting Sensitivity. J Appl Microbiol. 2003; 95: 958-66.

14.Bacterioweb. http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/fphoto.html. Erişim Tarihi: 30.09.2011.

15.Bahk J, Marth EH. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: Cliver DO, editors. Foodborne Diseases. 1st ed. San Diego: Academic Press; 1990. p. 248-57.

16.Banwart GJ. Basic Food Microbiology. Third Edition. Connecticut, Avi Publishing Company, 1983.

17.Barbuddhe S, Hain T, Chakraborty T. Comparative Genomics and Evolution of Virulence. In: Liu D, editors. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Press; 2008. p. 311-35.

18.Barza M. Listeriosis and Milk. The New England J Med. 1985; 312, 7: 438-40.

19.Beckers HJ, Soentoro PSS, Delfgou-van Asch EHM. The Ocurrence of *Listeria monocytogenes* in Soft Cheeses and Raw Milk and its Resistance to Heat. Int J Food Microbiol. 1987; 4, 3: 249-56.

20.Berktaş M, Bozkurt EN, Bozkurt H, Alişarlı M, Güdücüoğlu H. Et ve Et Ürünlerinden *Listeria monocytogenes*' in İzolasyonu. Van Tıp Derg. 2006; 13, 2: 36-41.

21.Bhunia AK. Foodborne Microbial Pathogens. First Edition. New York, Springer Science Business Media, 2008. p. 165-82.

22.Bibb WF, Gelin BG, Weaver R, Schwartz B, Plikaytis BD, Reeves MW, Pinner RW, Broome CV. Analysis of Clinical and Food-Borne Isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Application of the Method to Epidemiologic Investigations. Appl Environ Microbiol. 1990; 56, 7: 2133-41.

23.Bilgehan H, Serter F. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji. Üçüncü Baskı, İzmir, Ege Üniversitesi Matbaası, 1978, p. 307.

24.Boerlin P, Piffaretti JC. Typing of Human, Animal, Food, and Environmental Isolates of *Listeria monocytogenes* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 1991; 57, 6: 1624-29.

25.Bolat S. Ankara Yöresinde Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerde *Salmonella*-Bazı Patojen Bakterilerin Bulunma Sıklığı ve Proteolitik Lipolitik Aktiviteleri. Ankara, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
26.Borucki MK, Call DR. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. J Clin Microbiol. 2003; 41, 12: 5537-40.
27.Brehm-Stecher B, Johnson EA. Rapid Methods for Detection of *Listeria*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition, New York: CRC Pres; 2007. p. 257-81.
28.Brosch R, Buchrieser C, Rocourt J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* Serovar 4b by Use of Low-Frequency Cleavage Restriction Endonucleases and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Res Microbiol. 1991; 142: 667-75.
29.Bunning VK, Donnelly CW, Peeler JT, Briggs EH, Bradshaw JG, Crawford RG, Beliveau, CM, Tierney JT. Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* within Bovine Milk Phagocytes. Appl Environ Microbiol. 1988; 54, 2: 364-70.
30.Buxton A, Fraser G. Animal Microbiology. Immunology, Bacteriology, Mycology, Diseases of Fish and Laboratory Methods. 1st Edition. Oxford London, Blackwell Scientific Publications, 1977.
31.Byun SK, Jung SC, Yoo HS. Random Amplification of Polymorphic DNA Typing of *Listeria monocytogenes* Isolated from Meat. Int J Food Microbiol. 2001; 69: 227–35.
32.Capita R, Calleja CA, Moreno B, Garcia-Fenandez MC. Occurrence of *Listeria* Species in Retail Poultry Meat and Comparison of a Cultural/Immunoassay for Their Detection. Int J Food Microbiol. 2001; 65: 75-82.
33.Carlos VS, Oscar RS, Irma QRE. Occurrence of *Listeria* species in Raw Milk in Farms on the Outskirts of Mexico City. Food Microbiol. 2001; 18, 2, 177-81.
34.Casolari C, Facinelli B, Fabio U, Rocourt J, Varaldo PE. Restriction Endonuclease Analysis of Chromosomal DNA from *Listeria monocytogenes* Strains. Eur J Epidemiol. 1990; 6, 3: 319-22.
35.CDC PulseNet. Standardized Protocol For Molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by PFGE. 2004. http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/pulsenet_listeria_protocol%20.pdf. Erişim tarihi:07.07.2011
36.Cesare AD, Mioni R, Manfreda G. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Fresh and Fermented Italian Sausages and Ribotyping of Contaminating Strains. Int J Food Microbiol. 2007; 120: 124-30.
37.Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43, 9: 2103-08.
38.Cherry WB, Moody MD. Fluorescent-Antibody Techniques in Diagnostic Bacteriology. Bacteriol Rev. 1965; 29, 2, 222-50.
39.Choi YC, Cho SY, Park BK, Chung DH, Oh DH. Incidence and Characterization of *Listeria* spp. from Foods Available in Corea. J Food Prot. 2001; 64, 4: 554-58.
40.Chou CH, Wang C. Genetic Relatedness Between *Listeria monocytogenes* Isolates from Seafood and Humans Using PFGE and REP-PCR. Int J Food Microbiol. 2006; 110: 135–48.
41.Cjazka J, Batt CA. Verification of Casual Relationships Between *Listeria monocytogenes* Isolates Implicated in Food-Borne Outbreaks of Listeriozis by Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns. J Clin Microbiol. 1994; 32, 5: 1280-87.
42.Codex Alimentarius Commission. Codex General Standard for Cheese Codex Stan A-6-1978, 26th Session FAO/WHO Food Standards Programme. 2006.
43.Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A. Characterization of Antimicrobial Resistance of Foodborne *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol. 2009; 128: 497-500.
44.Cordano AM, Rocourt J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Food in Chile. Int J Food Microbiol. 2001; 70: 175-78.
45.Coşkun, S. Salamura Beyaz Peynirde 90 Gün Olgunlaşma Süresi Boyunca *Listeria monocytogenes* Varlığı. Ankara, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2006.
46.Cousins CM, Bramley AJ. The Microbiology of Raw Milk. In: Robinson RK, editor. Dairy Microbiology, Volume 1 The Microbiology of Milk. Third Edition. Great Yarmouth: Elsevier Applied Science Publishers; 1985. p.119-63.

47.Curtis GDW. Listeria/Detection by Classical Cultural Techniques. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology, First Edition, Academic Press; 1999. p. 1199-1207.
48.Çağlar A, Tunçtürk Y, Bakırcı İ. Süt ve Süt Ürünlerinde Bulunan *Listeria monocytogenes*'in Patojenitesi ve Önemi. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. p. 86-103, 2000, Tekirdağ.
49.Çelik S, Temiz A. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyon Yöntemleri. Gıda. 1991; 16, 3: 183-88.
50.Çetinkaya B, Ertaş HB, Muz A. Süt Ürünlerinde *Listeria* Türlerinin İzolasyonu. FÜ Sağ Bil Vet Derg. 1999; 13, 2: 21-25.
51.Dauphin G, Ragimbeau C, Malle P. Use of PFGE Typing for Tracing Contamination with *Listeria monocytogenes* in Three Cold-Smoked Salmon Processing Plants. Int J Food Microbiol. 2001; 64: 51–61.
52.Davidson RJ, Sprung DW, Park CE, Rayman MK. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* in Manitoba Raw Milk. Can Inst Food Sci Technol. 1989; 22, 1: 70-74.
53.Denka Seiken. *Listeria* Antisera ''Seiken''. Denka Seiken, Nihonbashi Kayabacho, Chuo-ku Tokyo 103-0025, Japan- 294616. 2000.
54.Devrim AK, Kaya N. RAPD Tekniği ve Biyokimya Alanında Kullanımı. KÜ Vet Fak Derg. 2006; 121: 97-101.
55.Dhanashree B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Typing of *Listeria monocytogenes* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. Indian J Med Res. 2003; 117: 19-24.
56.Donnelly CW, Nyachuba DG. Conventional Methods to Detect and Isolate *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Third Edition. New York: CRC Press; 2007. p. 215-56.
57.Durmaz R, Otlu B, Çalışkan A, Gürsoy N. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinin Moleküler Tiplendirmesinde Kullanılabilecek Kısa Süreli ''Pulsed-Field Gel'' Elektroforez (PFGE) Protokolü. Ankem Derg. 2007; 21, 2: 113-17.
58.Dümen E, Issa G, İkiz S, Bağcıgil F, Özgür Y, Kahraman T, Ergin S, Yeşil O. Determining Existance and Antibiotic Susceptibility Status of *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Products, Serological and Molecular Typing of the Isolates. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2011; 17: 111-19.
59.Eld K, Danielsson –Tham ML, Gunnarsson A, Tham W. Comparison of a Cold Enrichment Method and the IDF Method for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Animal Autopsy Material. Vet Microbiol. 1993; 36, 1-2: 185-89.
60.El-Hofi M, El-Tanboly ES, Ismail A. Implementation of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to UF White Cheese Production Line. Acta Sci Pol Technol Aliment. 2010; 9, 3: 331-42.
61.Erkmen O. Basic Methods for the Microbiological Analysis of Foods. Part I: General Methods. First Edition, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2007. p. 1-70.
62.Erol İ. Gıda Hijyeni ve Teknolojisi. Birinci Baskı, Ankara, Pozitif Matbaacılık, 2007.
63.Evrensel SS, Temelli S, Anar Ş. Mandıra Düzeyindeki İşletmelerde Beyaz Peynir Üretiminde Kritik Kontrol Noktalarının Belirlenmesi. Turk J Vet Anim Sci. 2003; 27: 29-35.
64.Facinelli B, Giovanetti E, Varaldo PE, Casolari P. Antibiotic Resistance in Foodborne *Listeria*. Lancet. 1991; 338, 2: 1272.
65.Fantelli K, Stephan R. Prevalence and Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Minced Meat in Switzerland. Int J Food Microbiol. 2001; 70: 63-69.
66.Farber JM, Losos JZ. *Listeria monocytogenes* a Food-Borne Pathogen. CMAJ. 1988; 138, March 1, 413-18.
67.Farber JM, Sanders GW, Speirs JI, D'Aoust JY, Emmons DB, McKellar R. Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* in Inoculated and Naturally Contaminated Raw Milk. Int J Food Microbiol. 1988; 7: 277-86.
68.Farber JM, Sanders GW, Johnston MA. A Survey of Various Foods for the Presence of *Listeria* Species. J Food Protect. 1989; 52, 7: 456-58.
69.Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Am Soc Microbiol, Microbiol Rev. 1991; 55, 3: 476-511.
70.Farber JM, Pagotto F, Scherf C. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Meat Products. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriozis, and Food Safety, Third Edition, London, New York: CRC Press; 2007. p. 503-71.

71.FDA. *Listeria monocytogenes* Risk Assessment: Executive Summary. 2003. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/ucm185292.htm.Erişim tarihi: 07.03.2011
72.Fenlon DR, Wilson J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk from Farm Bulks Tanks Nort-East Scotland. J Appl Bacteriol. 1989; 66: 191-96.
73.Fermentas. Genomic DNA Purification Protocols. 798 Cromwell Park Drive, Suites R-S Glen Burnie, Maryland, USA. 2011.
74.Fernandez Garayzabal JF, Dominguez Rodriguez L, Vazquez Boland JA, Blanco Cancelo JL, Suarez Fernandez G. *Listeria monocytogenes* in Pasteurized Milk. Can J Microbiol. 1986; 32, 2: 149-150.
75.Fernandez-Garayzabal JF, Dominquez-Rodriquez L, Vazquez-Boland JA, Feri EFR, Deiste VB, Blanco-Cancello JL, Fernandez SG. Survival of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk Treated in a Pilot Plant Size Pasteurizer. J Appl Bacteriol. 1987; 63: 533-37.
76.Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier A, Broome CV, Reingold AL. Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriozis. The New England J Med. 1985; 312, 7: 404-07.
77.Fox E, Hunt K, O'Brien M, Jordan K. *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse Cheese Processing Environments. Int J Food Microbiol. 2011; 145: 39-45.
78.Frye C, Donnely CW. Comprehensive Survey of Pasteurized Fluid Milk Produced in the United States Reveals a Low Prevalence of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 2005 ; 68, 5: 973-79.
79.Fugett EB, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as well as Widely Distributed PFGE Types. J Clin Microbiol. 2007; 45, 3: 865-73.
80.Gailunas KM. Use of Ultraviolet Light for the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Lactic Acid Bacteria Species in Recycled Chill Brines. Blacsburg VA, Virginia Polytechnic Institute and State University, Master of Science in Food Science and Technology, 2003.
81.Gaya P, Sanchez J, Medina M, Nunez M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Raw Milk Produced in Spain. Food Microbiol. 1998; 15, 5: 551-55.
82.Genigeorgis CA, Dutuliscu D, Garayzabal JF. Prevalence of *Listeria* spp. in Poultry Meat at the Supermarket and Slaughterhouse Level. J Food Protect. 1989; 52, 9: 618-24.
83.Gianfranceschi M, Pourshaban M, Gattuso A, Wedell-Neergaard C, Aureli P. Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Food and Humans in Italy by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Food Microbiol. 2002; 19: 47-55.
84.Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendeuvre JL, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in Pork Slaughtering and Cutting Plants use of RAPD, PFGE and PCR–REA for Tracing and Molecular Epidemiology. Int J Food Microbiol. 1999; 53: 127–40.
85.Graves LM, Swaminathan B, Hunter SB. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition, London, New York: CRC Press; 2007. p. 283-305.
86.Gravesen A, Jacobsen T, Møller PL, Hansen F, Larsen AG, Knøchel S. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: Comparison of RAPD, ITS, and PFGE. Int J Food Microbiol. 2000; 57: 43–51.
87.Gray ML, Killinger AH. *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. Bacteriol Rev. 1966; June, 30, 2: 309-71.
88.Greenwood MH, Roberts D, Burden P. The Occurrence of *Listeria* Species in Milk and Dairy Products: A National Survey in England and Wales. Int J Food Microbiol. 1991; 12: 197–206.
89.Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux Pump Lde is Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47, 2: 704-08.
90.Gouws PA, Liedemann I. Evaluation of Diagnostic PCR for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Products. Food Technol Biotechnol. 2005; 43, 2: 201-05.
91.Gönç S, Kılıç S. Beyaz Peynirde *L. monocytogenes* Patojeninin Aranması Üzerine Bir Araştırma. Gıda. 2002; 27, 5: 425-29.
92.Guerra MM, Bernardo F, McLauchlin J. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis of *Listeria monocytogenes*. Syst Appl Microbiol. 2002; 25, 3: 456-61.
93.Güç D. Adezyon Molekülleri. Ankem Derg. 2004; 18, 2: 158-63.
94.Gül K, Suay A, Dağ A, Mete M, Mete Ö. Diyarbakır İlinde Toplanan Peynir Örneklerinden *Listeria* Türlerinin İzolasyonu. İnfeksiyon Derg. 1995; 9, 1-2: 45-46.

95.Gülmez M, Güven A. Beyaz ve Çeçil Peynirlerde *Campylobacter, Salmonella* ve *Listeria* Türlerinin Araştırılması. KÜ Vet Fak Derg. 2001; 7, 2: 155-61.
96.Güner A, Telli N. A Survey on the Presence of *Listeria monocytogenes* in Various Semi-Hard Cheeses from Different Regions of Turkey. J Anim Vet Adv. 2011; 10, 14: 1890-94.
97.Güven A, Patır B. Elazığ İlinde Tüketime Sunulan Et ve Bazı Et Ürünlerinde *Listeria* Türlerinin Araştırılması. Tr J Vet Anim Sci. 1998; 22: 205-12.
98.Hamdi TM, Naim M, Martin P, Jacquet C. Identification and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated in Raw Milk in the Region of Algiers (Algeria). Int J Food Microbiol. 2007; 116: 190–93.
99.Hampikyan H. Fermente Sucuklarda Nisin Kullanımının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkileri. İstanbul, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2006.
100.Hansen JM, Gerner-Smidt P, Bruun B. Antibiotic Susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. APMIS. 2005; 113, 31: 6.
101.Harakeh S, Saleh I, Zouhairi O, Baydoun E, Barbour E, Alwan N. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy-Based Food Products. Sci Total Environ. 2009; 407: 4022-27.
102.Harrigan WF. Laboratory Methods in Food Microbiology. Part II: Techniques for the Microbiological Examination of Foods. Third Edition, San Diego: Academic Press; 1998. p.143-210.
103.Hibi K, Abe A, Ohashi E, Mitsubayashi K, Ushio H, Hayashi T, Ren H, Endo, H. Combination of Immunomagnetic Separation with Flow Cytometry for Detection of *Listeria monocytogenes*. Anal Chim Acta. 2006; 573-574: 158-63.
104.Hird DW. Review of Evidence for Zoonotic Listeriozis. J Food Prot. 1987; 50, 5: 429-33.
105.Hitckins AD. *L. monocytogenes*. Chapter 10. In: FDA Bacteriological Analytical Manual Online. 2003; http://www.cfsan.fda.gov
106.Hof H. History and Epidemiology of Listeriozis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 35: 199-202.
107.Holko I, Urbanova J, Kantikova M, Pastorova K, Kmet V. PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Milk Products and Differentiation of Suspect Isolates. Acta Vet Brno. 2002; 71: 125-31.
108.Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition. Baltimore, Maryland, USA, Williams & Wilkins A Waverly Company, 1994.
109.Issa G, Kahraman T, Aksu H. İstanbul'daki Farklı Çiftliklerden Temin Edilen Çiğ Sütlerden *Listeria* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. p. 356-58, 2009, Bursa.
110.İnal T. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. Birinci Baskı. İstanbul, Final Ofset A.Ş, 1990.
111.İşleyici ve Sancak 2000. Süt ve Süt Ürünlerinde *Listeria* Problemi ve İzolasyon Yöntemleri. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu. p. 422-31, 2000, Tekirdağ.
112.Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* Species in Food Products in Isfahan, Iran. Int J Food Microbiol. 2008; 122: 336-40.
113.Jeffers GT, Bruce JL, McDonough PL, Scarlett J, Boor KJ, Wiedmann M. Comparative Genetic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Human and Animal Listeriozis Cases. Microbiol. 2001; 147: 1095-104.
114.Johannessen GS, Loncarevic S, Kruse H. Bacteriological Analysis of Fresh Produce in Norway. Int J Food Microbiol. 2002; 77: 199-204.
115.Kahraman T, Ozmen G, Ozinan B, Goksoy EO. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Different Cheese Types Produced in Turkey. British Food J. 2010; 112, 11: 1230-36.
116.Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB. *Listeria* Species in Bovine Raw Milk: A Large Survey of Central India. Food Cont. 2008; 19: 109-12.
117.Kampelmacher EH. Fact and Fiction, Foodborne Listeriosis. In: Foodborne Listeriosis. Proceedings of a Symposium. Technomic Publishing, 1988, Lancaster, Pennysylvania 17604, USA.
118.Kara AA, Algur ÖF, Kaya M. Erzurum Piyasasından Temin Edilen Beyaz ve Civil Peynirlerden *Listeria* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu. Tr J Biology. 1999; 23: 331-37.
119.Karunasagar I, Karunasagar I. *Listeria* in Tropical Fish and Fishery. Int J Food Microbiol. 2000; 62: 177-81.

120.Kasımoğlu A. Beyaz Peynir Üretim Aşamasında Kontaminasyon Kaynaklarının Belirlenmesi ve Önleme Yollarının Araştırılması. AÜ Vet Fak Derg. 1999; 46: 1-7.
121.Katsuda K, Iguchi M, Tuboi T, Nishimori K, Tanaka K, Uchida I, Eguchi M. Rapid Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Res Vet Sci. 2000; 69: 99-100.
122.Kaynar Z, Kaynar P, Koçak C. Ankara Piyasasında Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Hijyenik Kalitelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Türk Hij Den Biyol Derg. 2005; 62: 1-10.
123.Keleş A, Güner A, Uçar G. Konya Piyasasında Tüketime Sunulan Beyaz Salamura, Kaşar ve Tulum Peynirlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığının Araştırılması. 2. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. p. 252-59, 2006, İstanbul.
124.Kınık Ö, Gönç S, Akalın AS. Çiğ Sütte Patojen Mikroorganizmalar. Birinci Baskı. Bornova, İzmir, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No : 527, Ege Üniversitesi Basımevi, 1998.
125.Koçan D, Halkman AK. *Listeria monocytogenes* ve Listeriozis. Gıda. 2006; 31, 3: 133-40.
126.Kuhn M, Goebel W. Molecular Virulence Determinants of *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriozis, and Food Safety, Third Edition, London, New York: CRC Press; 2007. p. 111-57.
127.Kuhn M, Scortti M, Vazquez-Boland JA. Pathogenesis. In: Liu D, editors. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Pres; 2008. p. 97-136.
128.Kum E 2009. Kayseri'de Satışa Sunulan Peynir Örneklerinde *Listeria monocytogenes* Varlığının Kültür Yöntemleri İle Belirlenmesi. Kayseri, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
129.Kurşun O, Kırdar S, Kasımoğlu A, Keyvan E. Presence of *Listeria monocytogenes* in Keş Cheese. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. p. 294-96, 2009, Bursa.
130.Lado BH, Yousef AE. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriozis, and Food Safety, Third Edition, London, New York: CRC Press; 2007. p. 157-213.
131.Lakicevic B, Stjepanovic A, Milijasevic M, Terzic-Vidojevic A, Golic N, Topisirovic L. The Presence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a Chosen Food Processing Establishment in Serbia. Arch Biol Sci. 2010; 62, 4: 881-87.
132.Latorre AA, Van Kessel JS, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Boor KJ, Jayarao BM, Houser BA, Daugherty CS, Schukken YH. Biofilm in Milking Equipment on a Dairy Farm as a Potential Source of Bulk Tank Milk Contamination with *Listeria monocytogenes*. J Dairy Sci. 2010; 93, 6: 2792-2802.
133.Lawrence LM, Harvey J, Gilmour A. Development of a Random Amplification of Polymorphic DNA Typing Method for *Listeria monocytogenes.* Appl Environ Microbiol. 1993; 59, 9: 3117-19.
134.Lee S, Çetinkaya F, Soyutemiz GE. Dondurulmuş Biber Üretim Aşamalarında *Listeria* Türlerinin Varlığının Araştırılması. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. p. 52-62, 2009, Bursa.
135.Lew AE, Desmarchelier PM. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of *Listeria monocytogenes* and its Application to Epidemiological Investigations. Int J Food Microbiol. 1992; 15, 3-4: 347-56.
136.Liewen MB, Plautz MW. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk in Nebraska. J Food Prot. 1988; 51, 11: 840-41.
137.Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and Level of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* species in Retail Pre-Packaged Mixed Vegetable Salads in the UK. Food Microbiol. 2007; 24: 711-17.
138.Liu D. Epidemiology. In: Liu D, editors. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Pres; 2008. p. 27-60.
139.Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Genotypic Identification. In: Liu D, editors. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Pres; 2008. p. 169-201.
140.Loncarevic S, Danielsson-Tham ML, Gerner-Smidt P, Sahlstrom L, Tham W. Potential Sources of Human Listeriozis in Sweden. Food Microbiol. 1998; 15: 65–69.
141.Louıe M, Jayaratne P, Luchsınger I, Devenısh J, Yao J, Schlech W, Sımor A. Comparison of Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Listeria monocytogenes.* J Clin Microbiol. 1996; 34, 1, 15-19.
142.Lovett J, Wesley IV, Vandermaaten MJ, Bradshaw JG, Francis DW, Crawford RG, Donnelly CW, Messer JW. High-Temperature Short-Time Pasteurization Inactivates *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 1990; 53, 9: 734-38.

143.Lukinmaa S, Aarnisalo K, Suihko ML, Siitonen A. Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates of Human and Food Origin Studied by Serotyping, Automated Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 562-68.
144.Lunden J, Tolvanen R, Korkeala H. Human Listeriozis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. J Dairy Sci. 2004; 87: 6-11.
145.Lyytikainen O, Autio T, Maijala R, Ruutu P, Buzalski TH, Miettinen M, Hatakka M, Mikkola J, Anttila VJ, Johansson T, Rantala L, Aalto T, Korkeala H, Siitonen A. An Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland. J Infect Dis. 2000; 181, 5: 1838-41.
146.MacDonald PDM, Whitwam RE, Boggs JD, MacCormack JN, Anderson KL, Reardon JW, Saah JR, Graves LM, Hunter SB, Sobel J. Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese. Clin Inf Dis. 2005; 40: 677-82.
147.Massa S, Cesaroni D, Poda G, Trovatelli LD. The Incidence of *Listeria* spp. in Soft Cheeses, Butter and Raw Milk in the Province of Bologna. J Appl Bacteriol. 1990; 68: 153-56.
148.McLauchlin. *Listeria* and Listeriosis. Clin Microbiol Infect. 1997; 3, 4: 484-492.
149.McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: A Review of Hazard Characterisation for use in Microbiological Risk Assessment of Foods. Int J Food Microbiol. 2004; 92: 15-33.
150.Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs P A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Different Food Products Commercialized in Portugal. Food Microbiol. 2004; 21: 213-16.
151.Mercanoglu B, Aytac SA, Ergun MA, Tan E. Isolation of *Listeria monocytogenes* by Immunomagnetic Separation and Atomic Force Microscopy. J Microbiol. 2003; 41, 2: 144-47.
152.Merck. Singlepath Listeria. Rapid test for the detection of Listeria in foods. http://www.merck-chemicals.com/singlepathlisteria/MDA_CHEM104142/p_qFGb.s1LXiIAAAEWPuEfVhTl?WFSimpleSearch_NameOrID=singlepath&BackButtonText=search+results Erişim Tarihi: 22.09.2011
153.Metin M. Süt Teknolojisi, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Altıncı Baskı. Bornova, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 2005.
154.Metin M, Öztürk GF. Süt İşletmelerinde Sanitasyon. Birinci Baskı. Bornova, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 1995.
155.Miettinen MK, Björkroth KJ, Koekeala HJ. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an Ice Cream Plant by Serotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Int J Food Microbiol. 1999; 46: 187-92.
156.Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ, 2009.
157.Mitchell DL, Misrachi A, Watson AJ, Coleman D. A case Cluster of Listeriozis in Tasmania. *Listeria* in Smoked Mussels in Tasmania. Commun Dis Intel. 1991; 15, 427.
158.Moharem AS, Charıth AP, Janardhana GR. Incıdence of *Listeria* Species in Seafood Products of Mysore, India. J Food Safety. 2007; 27: 362-72.
159.Molla B, Yilma R, Alemayehu D. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* Species in Retail Meat and Milk Products in Addis Ababa, Ethiopia. Ethiop J Health Dev. 2004; 18, 3: 208-12.
160.Monge R, Arias-Echandi ML. Presence of *Listeria monocytogenes* in Fresh Salad Vegetables. Rev Biomed. 1999; 10: 29-31.
161.Montanez-Izquierdo VY, Salas-Vazquez DI, Rodriguez-Jerez JJ. Use of Epifluorescence Microscopy to Assess the Effectiveness of Phage P100 in Controlling *Listeria monocytogenes* Biofilms on Stainless Steel Surfaces. Food Cont. 2011; 1: 1-8.
162.Moshtaghi H, Mohamadpour AA. Incidence of *Listeria* spp. in Raw Milk in Shahrekord, Iran. Foodborne Pathog Dis. 2007; 4, 1: 107-10.
163.Navratilova P, Schlegelova J, Sustackova A, Napravnıkova E, Lukasova J. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Milk, Meat and Foodstuff of Animal Origin and the Phenotype of Antibiotic Resistance of Isolated Strains. Vet Med Czech. 2004; 49, 7: 243–52.
164.NCCLS. National Comittee for Clinical Laboratory Standarts. "Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility test", Approved Standard, N.C.C.L.S. Villanova, PA, M2-A4. 1990.
165.Neves E, Lourenço A, Silva AC, Coutinho R, Brito L. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of *Listeria monocytogenes* Isolates from Different Sources and Geographical Origins and Representative of the Twelve Serovars. Syst Appl Microbiol. 2008; 31: 387-92.

166.Nocera D, Bannerman E, Rocourt J, Jaton-Ogay K, Bile J. Characterization by DNA Restriction Endonuclease Analysis of *Listeria monocytogenes* Strains Related to the Swiss Epidemic of Listeriosis. J Clin Microbiol. 1990; 28, 10: 2259-63.
167.Nørrung B, Andersen JK, Schlundt J. Incidence and Control of *Listeria monocytogenes* in Foods in Denmark. Int J Food Microbiol. 1999; 53: 195-203.
168.Norton DM, Braden CR. Foodborne Listeriosis. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriozis, and Food Safety, Third Edition, London, New York: CRC Press; 2007. p. 305-56.
169.Okwumabua O, O'Connor M, Shull E, Strelow K, Hamacher M, Kurzynski T, Warshauer D. Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Food Animal Clinical Cases: PFGE Pattern Similarity to Strains from Human Listeriozis Cases. FEMS Microbiol Lett. 2005; 249: 275-81.
170.Oni OO, Adesiyun AA, Adekeye JO, Saidu SNA. Prevalance and Some Characteristic of *Listeria monocytogenes* Isolated from Cattle and Milk in Kaduna State, Nigeria. İsrail J Vet Med. 1989; 12-17.
171.Oxoid. Rapid Food Tests. Oxoid *Listeria* Rapid Test. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=FT0401&c=UK&lang=EN. Erişim Tarihi: 22.09.2011
172.Öksüz Ö 1996. Çiğ Süt Mikroflorasının Beyaz Peynir Kalitesine ve Peyniraltı Suyu Özelliklerine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. Tekirdağ, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 1996.
173.Öktem AB, Bayram G, Ceylan AE, Yentür G. Prevalance of *Listeria monocytogenes* in Some Turkish Foodstuffs. J Food Qual. 2006; 29: 76-86.
174.Özçelik N. *Listeria monocytogenes'* in Tanımı, Bulunuşu ve Neden Olduğu Hastalıklar. SDÜ Tıp Fak Derg. 1994; 33-36.
175.Özmen G. Gemlik Garnizonunda Tüketime Sunulan Tavuk Etlerinden *Listeria* spp. İzolasyonu. Kayseri, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
176.Painter J, Slutsker L. Listeriozis in Humans. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriozis, and Food Safety, Third Edition, London, New York: CRC Press; 2007. p. 85-111.
177.Palumbo JD, Borucki MK, Mandrell RE, Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Identification of Mixed-Serotype Cultures by Colony Immunoblotting. J Clin Microbiol. 2003; 41, 2: 564-71.
178.Papageorgiou DK. Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Ripening of Blue Cheese. J Food Prot. 1989; 52, 7: 459-65.
179.Patır B, Güven AM. Şavak Salamura Beyaz Peynirin Olgunlaşması Sırasında *Listeria monocytogenes*'in Yaşam Süreleri Üzerine Araştırmalar. Tr J Vet Anim Sci. 1999; 23 (Ek Sayı 2): 317-27.
180.Peiris 2005. *Listeria monocytogenes*, a Food Borne Pathogen. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Master Thesis, 2005.
181.Pichhardt K. Gıda Mikrobiyolojisi, Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. Sekin Y, Karagözlü N, editörler. 4. Basımdan Çeviri, Birinci Baskı. İstanbul: Çevik Matbaacılık, Literatür Yayıncılık Dağıtım, Pazarlama Sanayi Ticaret Ltd. Şti. 2004. p. 185-191.
182.Pinto M, Burri S, Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Gibbs PA. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the Recovery of *Listeria monocytogenes* from Foods and Environmental Samples. Food Control. 2001; 12: 511-14.
183.Ponniah J, Robin T, Paie MS, Radu S, Ghazali FM, Kqueen CY, Nishibuchi M, Nakaguchi Y, Malakar PK. *Listeria monocytogenes* in Raw Salad Vegetables Sold at Retail Level in Malaysia. Food Cont. 2010; 21, 5: 774-78.
184.Poros-Gluchowska J, Markiewicz Z. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol Polonica. 2003; 52, 2: 113-29.
185.Pritchard TJ, Beliveau CM, Flanders KJ, Donnelly CW. Increased Incidence of *Listeria* Species in Dairy Processing Plants Having Adjacent Farm Facilities. J Food Prot. 1994; 57, 9: 770-75.
186.Rea MC, Cogan TM, Tobin S. Incidence of Pathogenic Bacteria in Raw Milk in Ireland. J Appl Microbiol. 1992; 73, 4: 331-36.
187.Reid LM, O'Donnell CP, Downey G. Recent Technological Advances for the Determination of Food Authenticity. Trends in Food Sci Technol. 2006; 17, 7: 344-53.
188.Ripabelli G, McLauchlin J, Threlfall EJ. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis of *Listeria monocytogenes*. Syst Appl Microbiol. 2000; 23, 1: 132-36.

189.Rocourt J, Buchrieser C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Third Edition. New York: CRC Pres; 2007. p. 1-20.

190.Rodas-Suarez OR, Pedroche-Flores JF, Rule-Betancourt JM, Ramirez-Quinones EL, Salinas-Vazquez C. Occurrence and Antibiotic Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Oysters, Fish, and Estuarine Water. Appl Environ Microbiol. 2006; 72, 11: 7410-12.

191.Rodriquez LD, Fernandez Garayzabal JF, Boland JAV, Ferri ER, Fernandez GS. Isolation de Micro-organismes du Genre *Listeria* à Partir de Lait cru destiné à la consommation humaine. Canadian J Microbiol. 1985; 31, 10; 938-41.

192.Rohrbach BW, Draughon FA, Davidson PM, Gliver SP. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* in Bulk Tank Milk: Risk Factors and Risk of Human Exposure. J Food Prot. 1992; 55, 2: 93-97.

193.Rudolf M, Scherer S. High Incidence of *Listeria monocytogenes* in European Red Smear Cheese. Int J Food Microbiol. 2001; 63: 91-98.

194.Ryser ET, Marth EH. Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Ripening of Camembert Cheese. J Food Prot. 1987a; 50, 5: 372-78.

195.Ryser ET, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. J Food Prot. 1987b; 50, 1: 7-13.

196.Ryser ET, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* During Manufacture and Ripening of Brick Cheese. J Dairy Sci. 1989; 72, 4: 838-53.

197.Sağun E, Sancak YC, İşleyici Ö, Ekici K. Van ve Çevresi Süt ve Otlu Peynirlerinde *Listeria* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı Üzerine Bir Araştırma. Turk J Vet Anim Sci. 2001; 25: 15-19.

198.Samelis J, Metaxopoulos J. Incidence and Principal Sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* Contamination in Processed Meats and a Meat Processing Plant. Food Microbiol. 1999; 16: 465-77.

199.Sanaa M, Poutrel B, Menard JL, Serieys F. Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. J Dairy Sci. 1993; 76: 2891-98.

200.Sancak YC, İşleyici Ö, Elibol C, Ekici K. Van'da Tüketime Sunulan Kremalı Pastalarda *Listeria* Türlerinin Varlığının Belirlenmesi. YYÜ Vet Fak Derg. 2002; 13, 1-2: 8-11.

201.Sarımehmetoğlu B, Kaymaz Ş. Türk Salamura Beyaz Peynirinde Yapım ve Olgunlaşma Aşamalarının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkisi. AÜ Vet Fak Derg. 1994; 41, 2: 234-42.

202.Sauders BD, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Third Edition. New York: CRC Pres; 2007. p. 21-53.

203.Senczek D, Stephan R, Untermann F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing of *Listeria* Strains Isolated from a Meat Processing Plant Over a 2-year Period. Int J Food Microbiol. 2000; 62: 155-59.

204.Sergelidis D, Abrahim A. Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to Heat and its Impact on Food Safety. Food Control. 2009; 20: 1-10.

205.Sharif A, Tunail N. *Listeria monocytogenes* Contamination of Raw Milk from Different Regions of Anatolia and Pasteurized Milk Sold in Ankara. Microbiol Bul. 1991; 1: 15-20.

206.Silva IMM, Almeida RCC, Alves MAO, Almeida PF. Occurrence of *Listeria* spp. in Critical Control Points and the Environment of Minas Frescal Cheese Processing. Int J Food Microbiol. 2003; 81, 3: 241-48.

207.Smith CW, Marshall JD, Eveland JWC. Identification of *Listeria monocytogenes* by the Fluorescent Antibody Technic. Proc Soc Exp Biol Med. 1960; 103: 842-45.

208.Srinivasan V, Nam HV, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Farms. Foodborne Pat Dis. 2005; 2: 3.

209.Steele ML, Mcnab WB, Case P, Griffiths MW, Chen S, Degrandis SA, Fruhner LC, Larkin CA, Lynch JA, Odumeru JA. Survey of Ontario Bulk Tank Raw Milk for Food-Borne Pathogens. J Food Prot. 1997; 60, 11: 1341-46.

210.Swaminathan B, Matar GM. Molecular Typing Methods. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. First Edition. Rochester: Mayo Foundation Pres; 1993. p. 26-50.

211.Şireli UT, Erol İ. Hazır Kıymalarda *Listeria* Türlerinin Araştırılması. Turk J Vet Anim Sci. 1999; 23 Ek Sayı 2: 373-80.

212.Şireli UT, Erol İ, Şahin S, Terzi G, Gürbüz OA. Tavuk Kıyma, Köfte ve Burgerlerinde *Listeria* Türlerinin Varlığı ve Kontaminasyon Düzeyinin Belirlenmesi. Turk J Vet Anim Sci. 2002; 26: 1271-76.

213.Şireli UT, Gücükoğlu A. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria* spp. Isolated from Ready-to-Eat Foods in Ankara. Turk J Vet Anim Sci. 2008; 32, 2: 131-35.

214.Taşçı F, Türütoğlu H, Kurşun Ö, Öğütcü H. Burdur Yöresinde Üretilen Süt ve Silajlarda *Listeria* Türlerinin Araştırılması. 3. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. p. 431, 2009, Bursa.

215.Temelli S, Anar Ş, Şen C, Akyuva P. Determination of Microbiological Contamination Sources During Turkish White Cheese Production. Food Control. 2006; 17: 856-61.

216.TUİK.http://www.google.com.tr/search?hl=tr&rlz=1R2GGLL_en&q=TU%C4%B0K+s%C3BCt+%C3%BCretimi&aq=f&aqi=&aql=&oq=, erişim tarihi : 13.02.2011.

217.Türk Standartları Enstitüsü 2006. Türk Standardı, Beyaz Peynir Standardı, TS 591 Revizyon, ICS 67.100.30, 2006, Ankara.

218.Uhitil S, Jaksic S, Petrak T, Medic H, Gumhalter-Karolyi L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the Other *Listeria* spp. in Cakes in Crotia. Food Control. 2004; 15: 213-16.

219.Uraz G, Yücel N. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ve Benzerlerinin (*Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*) Çiğ Süt Örneklerinden İzolasyonu. Turk J Agric For. 1998; 22: 463-68.

220.Uysal HK, Anğ Ö. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen *Listeria* Türleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2003; 33: 163-69.

221.Üçüncü M. Süt Teknolojisi II. Bölüm. Beşinci Baskı. Bornova, İzmir, Ege Meslek Yüksekokulu Basımevi. 2002.

222.Valk H, Vaillant V, Jacquet C, Rocourt J, Querrec FL, Stainer F, Quelquejeu N, Pierre O, Pierre V, Desenclos JC, Goulet V. Two Consecutive Nationwide Outbreaks of Listeriozis in France, October 1999-February 2000. Am J Epidemiol. 2001; 154, 10: 944-50.

223.Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, Perdue ML. Subtyping *Listeria monocytogenes* from Bulk Tank Milk Using Automated Repetitive Element–Based PCR. J Food Prot. 2005; 68, 12: 2707-12.

224.Van Stelten A, Sipmson JM, Chen Y, Scott VN, Whiting RC, Ross WH, Nightingale KK. Significant Shift in Median Guinea Pig Infectious Dose Shown by an Outbreak-Associated *Listeria monocytogenes* Epidemic Clone Strain and a Strain Carrying a Premature Stop Codon Mutation in *inlA*. Appl Environ Microbiol. 2011; 77, 7: 2479-87.

225.Vardar-Ünlü G, Ünlü M, Bakıcı MZ. Incidence of *Listeria* spp. from Raw Milk in Sivas. Tr J Med Sci. 1998; 28: 389-92.

226.Vines A, Reeves MW, Hunter S, Swaminathan B. Restriction Fragment Length Polymorphism in Four Virulence-Associated Genes of *Listeria monocytogenes*. Res Microbiol. 1992; 143,3: 281-94.

227.Vitas AI, Sanchez RM, Aguado V, Garcia-Jalon I. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain. J Food Prot. 2007; 70, 10: 2402-6.

228.Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri. http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/149.pdf. Erişim Tarihi 2011.

229.Yde M, Genicot A. Use of PFGE to Characterize Clonal Relationships Among Belgian Clinical Isolates of *Listeria monocytogenes*. J Med Microbiol. 2004; 53: 399-402.

230.Yeh ET. Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated From Organic Retail Chicken. Maryland, University of Maryland, Department of Nutrition and Food Science, Master of Science Thesis, 2004.

231.Yıldırım Y, Sarımehmetoğlu B. Beyaz Peynir Yapımında Bazı Probiyotik Bakterilerin Kullanılmasının *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkisi. J Fac Vet Med Univ. 2006; 3: 1, 1-7.

232.Yücel N, Çıtak S, Önder M. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria* Species in Meat Products in Ankara, Turkey. Food Microbiol. 2005; 22: 241-45.

233.Yousef AE, Marth EH. Behavior of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Storage of Colby Cheese. J Food Prot. 1988; 51, 1: 12-15.

234.Waak E, W Tham, Danielsson-Tham ML. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Raw Whole Milk in Farm Bulk Tanks and in Dairy Plant Receiving Tanks. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 3366–70.

235.Wagner M, McLauchlin J. Biology and Pathogenicity, Biology. In: Liu D, editors. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. New York: CRC Pres; 2008. p. 3-25.

236.Wagner M, Bubert A. *Listeria*/Detection by Commercial Enzyme Immunoassays. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD, editors. Encyclopedia of Food Microbiology, First Edition, Academic Pres; 1999. p. 1207-14.

237.Weber A, Potel J, Schafer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. Investigations on the occurrence of *L. monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. Zentrabl Hyg Umweltmed. 1995; 198: 117-23.

238.WHO. Foodborne Listeriosis. Report of a WHO Informal Working Group. Bulletin of the World Health Organization. 1988; 66, 4: 421-28.

239.WHO/FAO. Risk Assesment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods: İnterpretative Summary, Microbiological Risk Assesment Series no: 4, WHO Library Catalogoing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland. 2004.

240.Wieckowska M, Kotlowski R, Kur J, Rudnicka W. Use of PCR Methods for Identification of *Listeria monocytogenes* in Milk. Doswiadczalna i Mikrobiologia. 1998; 50, 3-4: 251-57.

241.Williams D, Irvin EA, Chmielewski RA, Frank JF, Smith MA. Dose-response of *Listeria monocytogenes* After Oral Exposure in Pregnant Guinea Pigs. J Food Prot. 2007; 70, 5: 1122-28.

242.Zhang Y, Yeh E, Hall G, Cripe J, Bhagwat AA, Meng J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. Int J Food Microbiol. 2007; 113: 47-53.

9. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Sakarya'da doğdu. İlkokulu sırasıyla Sakarya Mithatpaşa, Bilecik Osmaneli Balaban ve Aydın Ekrem Çiftçi İlkokulu'nda tamamladı. Ortaokul öğrenimini Aydın Gazipaşa Ortaokulu'nda gördü. 1999 yılında Aydın Lisesi'ni bitirdi. 2000 yılında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne yatay geçiş yaptı. 2005 yılında Veteriner Hekim ünvanı ile mezun oldu. 2005-2006 Eğitim-Öğretim yılı Bahar yarıyılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu sınavı kazanarak, 2008 yılında Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Bu görevini sürdürmektedir.