



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



**Yüksek Lisans Tezi**

**İSTANBUL'DA TÜKETİME SUNULAN BEYAZ PEYNİR  
ÖRNEKLERİNDE *Listeria monocytogenes* VARLIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Nil KAYA**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ayten KİMİRAN**

**Temmuz, 2019**

**İSTANBUL**

*A. Kimiran*

Bu çalışma, 24.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**



Prof. Dr. Ayten KİMİRAN(Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ  
Gebze Teknik Üniversitesi  
Temel Bilimler Fakültesi



Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 22416 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim süresince, tezin kararlaştırılma aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteğini ve sabrını eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren ve destek olan, tüm sorularımı içtenlikle cevaplayan Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya,

Tez çalışmam için gerekli *Listeria monocytogenes* suşlarını temin ederek bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Seza ARSLAN ve Arş. Gör. Dr. Fatma ÖZDEMİR'e,

Tez deneylerim sırasında teknik destekleri ile yanımda olan, Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT, Prof. Dr. Füsün ÖZTAY ve Prof. Dr. Ercan ARICAN'a,

Tez çalışmamın çeşitli aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI, Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR'e,

Yüksek Lisans eğitimim sırasında tanıştığım, her anımda yanımda olan, dostluklarını ve yardımlarını eksik etmeyen Öğr. Gör. İpek ADA, Hazal ZORBOZAN, Duygu ARSLAN ve Seval BAL'a,

Eğitim hayatım süresince maddi ve manevi anlamda bana destek olan ve benim için her türlü özveriye gösteren, annem Meryem KAYA ve babam Ekrem KAYA'ya, kardeşim Didem KAYA ve değerli dostum Derya SOYSAL'a,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2019

Nil KAYA

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖNSÖZ .....                                                                    | iv  |
| İÇİNDEKİLER.....                                                               | v   |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                                            | ix  |
| TABLO LİSTESİ.....                                                             | x   |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....                                                | xi  |
| ÖZET .....                                                                     | xiv |
| SUMMARY .....                                                                  | xvi |
| 1. GİRİŞ .....                                                                 | 1   |
| 2. GENEL KISIMLAR.....                                                         | 4   |
| 2.1. TEHLİKE ANALİZİ VE KRİTİK KONTROL NOKTALARI (HACCP) .....                 | 4   |
| 2.2. BEYAZ PEYNİR ÜRETİMİ .....                                                | 5   |
| 2.3. PEYNİRLERDE SAPTANAN MİKROORGANİZMALAR .....                              | 8   |
| 2.4. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLER.....                                     | 12  |
| 2.5. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....          | 13  |
| 2.6. EPİDEMİYOLOJİSİ.....                                                      | 15  |
| 2.7. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER .....  | 18  |
| 2.7.1. Geleneksel Kültür Yöntemleri.....                                       | 18  |
| 2.7.2. Hızlı Tanı Yöntemleri.....                                              | 23  |
| 2.7.3. Genotipik Yöntemler .....                                               | 24  |
| 2.8. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 'İN PATOGENEZİ .....                        | 28  |
| 2.8.1. Hücreye Alınış ve Üreme .....                                           | 28  |
| 2.8.2. Listeriosis Tanısı .....                                                | 29  |
| 2.8.3. Listeriosis Tedavisi .....                                              | 30  |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM.....                                                      | 32  |
| 3.1. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER.....                                        | 32  |
| 3.2. BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> İZOLASYONU ..... | 32  |
| 3.3. <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN TANIMLANMASI .....                     | 33  |
| 3.3.1. Gram Boyama.....                                                        | 34  |

|          |                                                                                            |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.   | Katalaz Testi .....                                                                        | 34 |
| 3.3.3.   | Oksidaz Testi .....                                                                        | 34 |
| 3.3.4.   | Hareket Testi.....                                                                         | 34 |
| 3.3.5.   | Nitrat Red üksiyon Testi.....                                                              | 34 |
| 3.3.6.   | Metil Kırmızısı Testi .....                                                                | 35 |
| 3.3.7.   | Voges Proskauer Testi .....                                                                | 35 |
| 3.3.8.   | Karbonhidrat Fermentasyon Testleri .....                                                   | 35 |
| 3.3.9.   | Christie, Atkins and Munch-Peterseon (CAMP) Testi.....                                     | 35 |
| 3.3.10.  | Hemoliz Testi .....                                                                        | 36 |
| 3.4.     | <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ .....         | 36 |
| 3.4.1.   | Kullanılan Antibiyotikler.....                                                             | 36 |
| 3.4.2.   | Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması .....                                              | 37 |
| 3.4.3.   | Antibiyotik Duyarlılık Deneyi.....                                                         | 37 |
| 3.5.     | <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ ..... | 37 |
| 3.5.1.   | DNA İzolasyonu .....                                                                       | 37 |
| 3.5.2.   | DNA'nın Agaro Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi .....                                   | 38 |
| 3.5.3.   | <i>Listeria</i> spp. İzolatların PZR Uygulaması ile Doğrulanması .....                     | 39 |
| 3.5.3.1. | <i>Kullanılan Primerler</i> .....                                                          | 39 |
| 3.5.3.2. | <i>PZR Yöntemi</i> .....                                                                   | 39 |
| 3.5.4.   | <i>Listeria</i> Cinsi Bakterilerin Filogenetik Analizi .....                               | 40 |
| 3.5.4.1. | <i>Primerlerin Hazırlanması</i> .....                                                      | 40 |
| 3.5.4.2. | <i>PZR Yöntemi</i> .....                                                                   | 41 |
| 3.6.     | ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....                               | 42 |
| 3.6.1.   | <i>Listeria</i> Enrichment Broth (HiMedia, Hindistan).....                                 | 42 |
| 3.6.2.   | <i>Listeria</i> Enrichment Supplement II, Modified (HiMeida, Hindistan) .....              | 42 |
| 3.6.3.   | PALCAM (HiMedia, Hindistan) .....                                                          | 43 |
| 3.6.4.   | <i>Listeria</i> Selective Supplement (PALCAM) (HiMedia, Hindistan) .....                   | 44 |
| 3.6.5.   | Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSA-YE), Modified (HiMedia, Hindistan) .....             | 44 |
| 3.6.6.   | Muller Hinton Agar (MHA) (Sigma-Aldrich, Almanya) .....                                    | 45 |
| 3.6.7.   | % 0.85'lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS).....                                                  | 45 |
| 3.6.8.   | Oksidaz Testi Ayırıcı .....                                                                | 45 |
| 3.6.9.   | Katalaz Testi Ayırıcı .....                                                                | 46 |

|           |                                                                                                         |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.10.   | Gram Boyama Ayırıcıları.....                                                                            | 46        |
| 3.6.11.   | Clark-Lubs Besiyeri.....                                                                                | 47        |
| 3.6.12.   | Nitrat Besiyeri .....                                                                                   | 47        |
| 3.6.13.   | Sulfate Indole Motility (SIM) Besiyeri (Sigma-Aldrich, Almanya) .....                                   | 48        |
| 3.6.14.   | Peptonlu Su (Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri).....                                                   | 48        |
| 3.6.15.   | %5'lik Ramnoz, Ksiloz, Mannitol, Riboz, $\alpha$ -Metil-D-mannosit<br>Solüsyonlarının Hazırlanması..... | 49        |
| 3.6.16.   | Metil Kırmızısı Ayırıcı .....                                                                           | 49        |
| 3.6.17.   | Voges Proskauer Ayırıcı .....                                                                           | 49        |
| 3.6.18.   | Nitrat Testi Ayırıcı .....                                                                              | 50        |
| 3.6.19.   | 10 M NaOH .....                                                                                         | 50        |
| 3.6.20.   | 1 M HCl.....                                                                                            | 50        |
| 3.6.21.   | 1 M Tris-HCl .....                                                                                      | 50        |
| 3.6.22.   | 0.5 M EDTA.....                                                                                         | 51        |
| 3.6.23.   | Tris-EDTA.....                                                                                          | 51        |
| 3.6.24.   | 10x TAE .....                                                                                           | 51        |
| 3.6.25.   | 1x TAE .....                                                                                            | 52        |
| 3.6.26.   | 10x TBE.....                                                                                            | 52        |
| 3.6.27.   | 1x TBE.....                                                                                             | 52        |
| 3.6.28.   | %0.8'lik Agaroze Jel .....                                                                              | 52        |
| 3.6.29.   | Primer Konsantrasyonu Hazırlanması .....                                                                | 53        |
| <b>4.</b> | <b>BULGULAR.....</b>                                                                                    | <b>54</b> |
| 4.1.      | <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> 'İN BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN<br>KÜLTÜR YÖNTEMİYLE İZOLASYONU .....      | 54        |
| 4.2.      | BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI .....                                                                       | 56        |
| 4.3.      | <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK<br>DUYARLILIKLARININ SAPTANMASI .....                    | 59        |
| 4.4.      | <i>LISTERIA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN MOLEKÜLER<br>KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ .....           | 63        |
| 4.4.1.    | <i>Listeria</i> Şüpheli Bakterilerin PZR Uygulaması ile Doğrulanması .....                              | 63        |
| 4.4.1.1.  | DNA Eldesi.....                                                                                         | 63        |
| 4.4.1.2.  | PZR Yöntemi Sonuçları .....                                                                             | 63        |
| 4.4.2.    | <i>Listeria</i> Cinsi Bakterilerin Multipleks PZR ile Serotiplendirilmesi.....                          | 65        |
| 4.4.3.    | <i>Listeria</i> Cinsi Bakterilerin Filogenetik Analizi .....                                            | 65        |
| <b>5.</b> | <b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                                          | <b>67</b> |
|           | <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                   | <b>76</b> |

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b> | <b>95</b> |
|-----------------------|-----------|



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: Beyaz peynirin üretim aşamaları (Hayaloğlu ve diğ., 2002). ....                                                                                                                                                                                                                            | 8  |
| Şekil 2.2: <i>Listeria monocytogenes</i> tarafından enfekte edilen konakçı hücrelerin enfeksiyon süreci (Cossart ve diğ., 2003). ....                                                                                                                                                                 | 29 |
| Şekil 3.1: Peynir örneklerinden <i>Listeria</i> cinsi bakterilerin izolasyonu. ....                                                                                                                                                                                                                   | 33 |
| Şekil 4.1: PALCAM besiyerinde <i>Listeria</i> şüpheli gri-yeşil renkli etrafı siyah zonlu koloniler. ....                                                                                                                                                                                             | 55 |
| Şekil 4.2: <i>Listeria</i> spp. şüpheli izolatın SIM besiyerinde şemsiye şeklinde gözlenen hareketi. ....                                                                                                                                                                                             | 57 |
| Şekil 4.3: <i>Listeria</i> spp. şüpheli izolatın karbonhidrat fermentasyon testi sonuçları. ....                                                                                                                                                                                                      | 57 |
| Şekil 4.4: <i>Listeria</i> spp. şüpheli izolatın CAMP testi sonucu oluşan artmış hemoliz zonu. ....                                                                                                                                                                                                   | 58 |
| Şekil 4.5: <i>Listeria</i> bakterilerinin MHA besiyerindeki disk difüzyon testi sonuçları. ....                                                                                                                                                                                                       | 60 |
| Şekil 4.6: Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> bakterilerine ait genomik DNA'ların jeldeki görüntüsü. M: 1 Kb DNA marker. 13-19: <i>Listeria</i> şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart <i>L. monocytogenes</i> RSKK 475). -: Negatif kontrol. ....                           | 63 |
| Şekil 4.7: Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> bakterilerinin taşıdığı <i>iap</i> genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. N13-N19: <i>Listeria</i> şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart <i>L. monocytogenes</i> RSKK 475). -: Negatif kontrol. ....  | 64 |
| Şekil 4.8: Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> bakterilerinin taşıdığı <i>hlyA</i> genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. N13-N19: <i>Listeria</i> şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart <i>L. monocytogenes</i> RSKK 475). -: Negatif kontrol. .... | 65 |
| Şekil 4.9: Peynir örneklerinden izole edilen <i>Listeria</i> şüpheli bakterilerin 16S rRNA genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 1 kb DNA marker. 13-19: <i>Listeria</i> şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart <i>L. monocytogenes</i> RSKK 475). -: Negatif kontrol. ....           | 66 |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1:</b> Peynir, eritme peynirler ve eritme peynir ürünlerine ait mikrobiyolojik değerler. ....                                       | 5  |
| <b>Tablo 2.2:</b> <i>Listeria</i> cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri (Wagner ve McLauchlin, 2008). ....                               | 15 |
| <b>Tablo 3.1:</b> Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotikler. ....                                                           | 36 |
| <b>Tablo 3.2:</b> <i>Listeria</i> spp. cinsi bakterilerin doğrulanması için kullanılan primerler. ....                                         | 39 |
| <b>Tablo 3.3:</b> <i>Listeria</i> spp. cinsi bakterilerde <i>iap</i> ve <i>hlyA</i> genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları. .... | 40 |
| <b>Tablo 3.4:</b> <i>Listeria</i> cinsi bakterilerin dizi analizi için kullanılan primer. ....                                                 | 40 |
| <b>Tablo 3.5:</b> <i>16S rRNA</i> genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları. ....                                                      | 41 |
| <b>Tablo 4.1:</b> <i>Listeria</i> şüpheli izolatların LEB besiyerindeki inkübasyon süreleri ve kodları. ....                                   | 55 |
| <b>Tablo 4.2:</b> <i>Listeria</i> spp. şüpheli izolatların biyokimyasal test sonuçları. ....                                                   | 59 |
| <b>Tablo 4.3:</b> <i>Listeria</i> bakterilerinin antibiyotik zon çapları (mm). ....                                                            | 1  |
| <b>Tablo 4.4:</b> <i>Listeria</i> bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları. ....                                                              | 62 |
| <b>Tablo 4.5:</b> <i>Listeria</i> bakterilerinin antibiyotik duyarlılık yüzdeleri. ....                                                        | 62 |
| <b>Tablo 4.6:</b> Peynir örneklerinden elde edilen suşların erişim numaraları. ....                                                            | 66 |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler | Açıklama |
|----------|----------|
|----------|----------|

|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| <b>a<sub>w</sub></b> | : Su aktivitesi    |
| <b>atm</b>           | : Atmosfer basıncı |
| <b>bp</b>            | : Baz çifti        |
| <b>°C</b>            | : Santigrat derece |
| <b>cm</b>            | : Santimetre       |
| <b>dk</b>            | : Dakika           |
| <b>kb</b>            | : Kilo baz         |
| <b>L</b>             | : Litre            |
| <b>ml</b>            | : Mililitre        |
| <b>M</b>             | : Molar            |
| <b>N</b>             | : Normal           |
| <b>nm</b>            | : Nanometre        |
| <b>nmol</b>          | : Nanomol          |
| <b>ph</b>            | : Hidrojen g ü c ü |
| <b>sn</b>            | : Saniye           |
| <b>UV</b>            | : Ultraviyole      |
| <b>V</b>             | : Hacim            |
| <b>µg</b>            | : Mikrogram        |
| <b>µl</b>            | : Mikrolitre       |
| <b>µm</b>            | : Mikrometre       |
| <b>µM</b>            | : Mikromolar       |

| Kısaltmalar | Açıklama |
|-------------|----------|
|-------------|----------|

|                         |                                                   |
|-------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>ABD</b>              | : Amerika Birleşik Devletleri                     |
| <b>AFLP</b>             | : Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi          |
| <b>ALOA</b>             | : Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti |
| <b>ActA</b>             | : Actin assembly-inducing protein                 |
| <b>ATCC</b>             | : Amerikan Tıp K ü l t ü r Koleksiyonu            |
| <b>BaCl<sub>2</sub></b> | : Baryum klor ü r                                 |

|                                    |                                                                     |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>BLEB</b>                        | : Buffered Listeria Enrichment Broth                                |
| <b>BCM</b>                         | : Biosynth Chromogenic Medium                                       |
| <b>BLAST</b>                       | : Basic Local Alignment Search Tool                                 |
| <b>CAMP</b>                        | : Christie, Atkins and Munch-Peterseon                              |
| <b>CDC</b>                         | : Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi                                |
| <b>c-met</b>                       | : Hepatosit büyüme faktörü reseptörü                                |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>             | : Distile su                                                        |
| <b>DNA</b>                         | : Deoksiribo Nükleik Asit                                           |
| <b>EDTA</b>                        | : Etilendiamin tetra asetik asit                                    |
| <b>ELISA</b>                       | : Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi                                  |
| <b>FDA-BAM</b>                     | : Gıda ve İlaç Dairesi- Bakteriyolojik Analitik El Kitabı           |
| <b>FB</b>                          | : Fraser Broth                                                      |
| <b>FISH</b>                        | : Floresan Yerde Hibridizasyon                                      |
| <b>FTS</b>                         | : Fizyolojik Tuzlu Su                                               |
| <b>GHP</b>                         | : İyi Hijyen Uygulamaları                                           |
| <b>GMP</b>                         | : İyi Üretim Uygulamaları                                           |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | : Sülfirik asit                                                     |
| <b>HCl</b>                         | : Hidroklorik asit                                                  |
| <b>HACCP</b>                       | : Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları                       |
| <b>HL</b>                          | : Horse blood agar                                                  |
| <b>hly</b>                         | : Hemolizin                                                         |
| <b>IMS</b>                         | : İmmünomanyetik Ayırma                                             |
| <b>ISO</b>                         | : Uluslararası Standartlar Teşkilatı                                |
| <b>InlA</b>                        | : İnternalin A                                                      |
| <b>InlB</b>                        | : İnternalin B                                                      |
| <b>iap</b>                         | : Invasion associated protein                                       |
| <b>Kob</b>                         | : Koloni Oluşturan Birim                                            |
| <b>KOH</b>                         | : Potasyum hidroksit                                                |
| <b>LIPI-1</b>                      | : <i>Listeria</i> Pathogenicity Island 1                            |
| <b>LLO</b>                         | : Listeriolizin O                                                   |
| <b>LPM</b>                         | : Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam                         |
| <b>MOPS-BLEB</b>                   | : Morpholinepropanesulfonic Acid Buffered Listeria Enrichment Broth |
| <b>MOX</b>                         | : Modified Oxford Agar                                              |
| <b>MR</b>                          | : Metil Kırmızısı                                                   |

|                 |                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>MHA</b>      | : Mueller-Hinton Agar                                            |
| <b>NCCLS</b>    | : Ulusal Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü            |
| <b>NCBI</b>     | : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi                             |
| <b>OX</b>       | : Oxford Agar                                                    |
| <b>PALCAM</b>   | : Polymyxin-Acriflavin-Lityum klorür-Seftazidim-Eskulin-Mannitol |
| <b>PFGE</b>     | : Darbeli Alan Jel Elektroforezi                                 |
| <b>plcA</b>     | : Phosphatidylinositol specific phospholipase A                  |
| <b>plcB</b>     | : Phosphatidylinositol specific phospholipase B                  |
| <b>PI-PLC</b>   | : Fosfatidilinositole özgü fosfolipaz C                          |
| <b>PZR</b>      | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                    |
| <b>prfA</b>     | : Listeriolysin regulatory protein                               |
| <b>RAPD</b>     | : Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA                            |
| <b>RFLP</b>     | : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi                        |
| <b>RSKK</b>     | : Refik Saydam Kültür Koleksiyonu                                |
| <b>RT-PCR</b>   | : Ters Transkripsiyon-PZR                                        |
| <b>SIM</b>      | : Sulfate Indole Motility                                        |
| <b>SSOP</b>     | : Standart Sanitasyon Operasyon Prosedürleri                     |
| <b>TAE</b>      | : Tris asetik asit EDTA                                          |
| <b>TBE</b>      | : Tris borate EDTA                                               |
| <b>TE</b>       | : Tris EDTA                                                      |
| <b>Tris HCl</b> | : Tris Hidroklorik asit                                          |
| <b>TSA</b>      | : Triptik Soy Agar                                               |
| <b>TSA-YE</b>   | : Triptik Soy Agar with Yeast Extract                            |
| <b>TSB-YE</b>   | : Triptik Soy Broth with Yeast Extract                           |
| <b>USDA</b>     | : Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı                    |
| <b>UVM</b>      | : University Of Vermont agar                                     |
| <b>VBNC</b>     | : Canlı Fakat Kültüre Edilemeyen                                 |
| <b>VP</b>       | : Voges–Proskauer                                                |

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### İSTANBUL'DA TÜKETİME SUNULAN BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDE *Listeria monocytogenes* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Nil KAYA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Gram pozitif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, çomak şekilli *Listeria* cinsi bakteriler düşük pH, düşük sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonuna karşı toleranslı olmaları nedeniyle toprak, su, silaj, gıdalar ve kanalizasyon gibi çeşitli ortamlarda bulunabilirler. Bu cins; *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria marthii*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria booriae* olmak üzere 17 farklı türe sahiptir. Bu bakteriler arasında patojen özellik gösteren yalnızca *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'dir. *L. monocytogenes* önemli bir gıda kaynaklı patojendir ve insanlarda listeriozis denilen enfeksiyona neden olur. Bu enfeksiyon, *L. monocytogenes* bulaşmış peynir, süt, pişmiş ve yenilmeye hazır gıdalar, yıkanmamış çiğ sebzeler ve meyvelerin tüketilmesiyle meydana gelebilir. *L. monocytogenes* enfeksiyonuyla diğer gıda kaynaklı hastalıklara oranla daha az karşılaşılmamasına rağmen tüm gıda kaynaklı patojenler içinde ikinci en yüksek ölüm oranına sahip olan bakteridir.

Bu tez çalışmasında İstanbul'da bulunan market ve pazarlardan satın alınan 119 beyaz peynir örneği *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. İlk olarak, FDA-BAM'ın önerdiği standarda göre beyaz peynir örneklerinden *Listeria* spp. izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatlar Gram boyama, katalaz, oksidaz ve beta hemoliz reaksiyonları, nitrat indirgenmesi, SIM besiyerinde hareket testi, ramnoz, ksiloz, riboz,  $\alpha$ -metil-D-mannosit ve mannitol'den asit

üretimi, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, CAMP testleri açısından incelenerek identifikasyonları yapılmıştır. Cins düzeyinde tanımlaması yapılan suşlar, *iap* ve *hlyA* gen bölgelerine ait primerler kullanılarak PZR yöntemiyle doğrulanmış, tanımlaması yapılan suşların antibiyotiklere duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi uygulanarak yapılmıştır.

Analizi yapılan 119 peynir örneğinin 3 (% 2.52)'ünden *Listeria* spp. izole edilmiştir. Bu 3 örnekten elde edilen 7 *Listeria* spp.'nin *iap* gen bölgesini içerdiği, ancak *hlyA* gen bölgesini içermediği belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak yapılan dizi analizi sonucunda bu izolatların *L. seeligeri* olduğu tespit edilmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda, 7 *L. seeligeri* izolatından 6 (% 85.71)'sının siprofloksasine, 3 (% 42.85)'ünün penisiline direnç gösterdiği görülmüştür. İncelenen suşların tümünün amikasin, kloramfenikol, rifampin, gentamisin, sefaklor, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, trimetoprim-sulfametoksazol, tetrasiklin, klaritromisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmanın bulguları doğrultusunda, pastörizasyon işlemine tabi tutulan süt ile yapılmış beyaz peynir örneklerinin *L. seeligeri* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Pastörize edilmiş süt ile yapılan peynirlerdeki *Listeria* kontaminasyonu, pastörizasyon işlemi takip eden üretim, paketlenme, dağıtım, saklama uygulamalarına daha sıkı bir şekilde uyulması gerektiği sonucunu ortaya koymuştur. Kontaminasyonu önlemek için her aşamada kontrollerin yapılması önerilmektedir.

Temmuz 2019, 113 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** *L. monocytogenes*, *iap*, 16S rRNA, PZR, antibiyotik duyarlılık

## SUMMARY

### M.Sc. THESIS

#### INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *Listeria monocytogenes* IN WHITE CHEESE SAMPLES PRESENTED FOR CONSUMPTION IN ISTANBUL

Nil KAYA

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Gram positive, facultative anaerobic, non-spore-forming, rod-shaped *Listeria* can be found in a variety of environments such as soil, silage, water, sewage and foods, because of they are tolerant to low pH, low temperature and high salt concentration. This genus consists seventeen different types: *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria marthii*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria booriae*. Among these bacteria, only *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* showed pathogenic features. *L. monocytogenes* is an important food-borne pathogen and causes an infection named listeriosis in humans. This infection can be caused by consuming cheese, milk, unwashed raw vegetables and fruits, cooked and ready-to-eat foods contaminated with *L. monocytogenes*. Even though *L. monocytogenes* infection is encountered less frequently than other foodborne diseases, it is the second highest mortality among all foodborne pathogens.

In this study, 119 white cheese samples purchased from markets and bazaars in Istanbul were investigate for the presence of *L. monocytogenes*. In first place, *Listeria* spp. isolated from white cheese samples according to standard recommended by FDA-BAM. Subsequent biochemical tests were performed for identification: Gram staining, oxidase, catalase and beta hemolysis reactions, nitrate reduction, motility test on SIM medium, acid production from rhamnose,

mannitol, ribose, xylose and  $\alpha$ -methyl-D mannoside, methyl red, voges-proskauer and CAMP tests. Strains identified at the genus level were confirmed by PCR method using primers belonging to the *iap* and *hlyA* gene regions, and the susceptibility of the identified strains against antibiotics was performed by Kirby-Bauer disc diffusion method.

*Listeria* spp. was isolated from 3 (% 2.52) of 119 cheese samples analyzed. The 7 *Listeria* spp. obtained from these 3 samples were found to contain the *iap* gene region but not the *hlyA* gene region. Sequence analysis using the 16S *rRNA* gene region showed that these isolates were *L. seeligeri*.

As a result of antibiotic susceptibility tests, 6 (% 85.71) of 7 *L. seeligeri* isolates were resistant to ciprofloxacin and 3 (% 42.85) were resistant to penicillin. All strains were susceptible to amikacin, chloramphenicol, rifampin, gentamicin, ampicillin, cefaclor, amoxicillin/clavulanic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, clarithromycin, vancomycin and tetracycline antibiotics.

According to the findings of this study, it was determined that white cheese samples produced with pasteurized milk were contaminated with *L. seeligeri*. *Listeria* contamination in cheese made with pasteurized milk showed that production, packaging, distribution and storage practices following the pasteurization process should be followed more strictly. It is recommended to apply controls at each stage to prevent contamination.

July 2019, 113 pages.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, *iap*, 16S *rRNA*, PCR, antibiotic susceptibility

## 1. GİRİŞ

Listeriozis, 1981 yılında Kanada'nın Nova Scotia şehrinde kontamine lahana salatasının neden olduğu salgının ardından, gıdalardan kaynaklanan bir hastalık olmasıyla önem kazanmıştır (Schlech ve diğ., 1983). Bu hastalığa neden olan *Listeria monocytogenes* ilk kez laboratuvar tavşanlarından izole edilmiş ve bu hayvanlarda neden olduğu septik hastalık monositoza neden olduğu için *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır (Murray ve diğ., 1926). Pirie (1927) aynı bakteriyi Güney Afrika'da bulunan yabani gerbillerden izole etmiş ve bakteriye Lord Lister onuruna *Listerella hepatolytica* adını vermiştir. 1940 yılında ise bakterinin adı *Listeria monocytogenes* olarak değiştirilmiştir (Pirie, 1940).

*L. monocytogenes* Gram-pozitif, kapsülüz, fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, hücreleri kısa, yuvarlak uçlu çomak veya kokobasil (0.4-0.5 µm eninde ve 1-2 µm uzunluğunda) şeklinde olan bir bakteridir. 1-45 °C arasında gelişme gösterebilmesine rağmen, en iyi 35-37 °C sıcaklıkta geliştiği tespit edilmiştir (Junttila ve diğ., 1988). Peritirik flagellaları nedeniyle bakterinin 20-25 °C'de bir gecelik kültürlerde aktif hareket yeteneğine sahip olduğu, ancak 37 °C'de hareket yeteneğinin zayıf olduğu bildirilmiştir (Galsworthy ve diğ., 1990). Olumsuz çevre koşullarında bile varlığını sürdürme yeteneğinde olan *L. monocytogenes*'in, NaCl (% 10-12) konsantrasyonunun yüksek olduğu yerlerde bile çoğalabildiği ve minimum su aktivitesinin ( $a_w$ ) 0.93 olduğu (Shahamat ve diğ., 1980; Petran ve Zottola, 1989; Farber ve Addison, 1994), geniş pH aralığında (4.5-9.2) üreyebildiği, en iyi ürettiği optimum pH değerlerinin ise 6.0-8.0 arasında olduğu belirtilmiştir (Parish ve Higgins, 1989; George ve Lund, 1992). *L. monocytogenes* bakterileri katalaz, Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer reaksiyonları pozitif, indol, oksidaz ve üre reaksiyonları negatif olan, karbonhidratlardan asit oluşturan, ancak gaz oluşturmeyen, kanlı agarda β-hemoliz oluşturan ve CAMP testinde *Staphylococcus aureus* ile pozitif sonu çözen bakterilerdir (Skalka ve diğ., 1982; McKellar, 1994).

İlk belgelenmiş insan listeriozis vakasının I. Dünya Savaşı'nın sonunda menenjit geçiren bir asker olduğu belgelenmiştir (Cotoni, 1942).

*L. monocytogenes* ile kontamine gıdalar hamile kadınlar, yaşlılar veya bağışıklığı baskılanmış bireyler gibi duyarlı memeli konaklar tarafından tüketildiği zaman, bu bakterinin hücre içinde

çoğalarak konak bağışıklığından kurtulduğu ve konak içinde çoğalan bakterilerin komşu hücrelere ve diğer organlara yayıldığı belirlenmiştir. İnsan listeriyozunun bazı erken klinik belirtileri hafif, nonspesifik ve grip benzeri (üşüme, yorgunluk, baş ağrısı, kas ve eklem ağrısı ve mide ve bağırsak iltihabı gibi) semptomlar olmasına rağmen sepsis, menenjit, ensefalit, düşük gibi ciddi hastalıkların ortaya çıktığı ve bazı durumlarda ölümle sonuçlanabildiği bildirilmiştir (McLauchlin, 1997; Vazquez-Boland ve diğ., 2001). İnsan listeriyozunun ortalama ölüm oranının % 30 olduğu ve bu oranın *Campylobacter sp.* (% 0.02-0.1), *Salmonella enteritidis* (% 0.38) ve *Vibrio sp.* (% 0.005-0.01) gibi yaygın gıda kaynaklı patojenlerden daha yüksek olduğu görülmüştür (Mead ve diğ., 1999; Mead ve diğ., 2006).

*L. monocytogenes*, hem kırsal hem de kentsel ortamlarda (Freitag ve Jacobs, 1999; Sauders ve diğ., 2006) yaygın olarak bulunmaktadır ve yanlış fermente edilmiş silaj, mera çimleri, çürüyen bitki örtüsü, toprak, kanalizasyon ve kanallar, göller, arklar, yüzey suları gibi çeşitli sucul ortamlarda hayatta kalabilmektedir (Weis ve Seeliger, 1975; Dijkstra, 1982; Guenich, 1985; Colburn ve diğ., 1990; Husu ve diğ., 1990).

*L. monocytogenes* çeşitli çiğ ve işlenmiş gıdalardan izole edilmiştir. Süt ve süt ürünleri, domuz eti, fermente sosis, sığır eti gibi et ve et ürünleri; deniz ürünleri, lahana, turp gibi taze ürünler *L. monocytogenes* kontaminasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Rocourt ve Cossart, 1997; Gudbjonsdottir ve diğ., 2004).

*L. monocytogenes*, sıcaklığa ve pH değişikliklerine karşı dayanıklılığa, soğutma sıcaklığı ve yüksek tuz konsantrasyonunda çoğalma yeteneğine sahip olduğundan peynirin üretim ve olgunlaşma aşamalarında hayatta kalmaktadır. Peynir sütündeki üremesi laktik starter kültürler tarafından yavaşlatılabilmekte, ancak tamamen inhibe edilememektedir.

Dünya genelinde her ortamda rastlanabilen bu bakteri yüksek ölüm oranı ve çevresel faktörlere karşı sergilediği direnç nedeniyle oldukça tehlikeli bir gıda patojenidir. Bazı ülkeler gıdalarda, özellikle de tüketime hazır ürünlerde bulunmasına izin verilen organizma sayıları üzerinde yasal sınırlar oluşturmuştur. ABD 25 gram gıda örneğinde *L. monocytogenes*'in bulunmaması gerektiğini bildirmiştir. Türkiye'de de bu bakteri için sıfır tolerans politikası geçerlidir (Anon., 2011; Shank ve diğ., 1996).

Doğada geniş bir yayılıma sahip olan *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri doğal habitatların çoğunda az sayıda bulunduğundan *Listeria* spp. için kullanılan tespit yöntemlerinin

genellikle seçici zenginleştirmeyi takip eden seçici bir besiyerine ekimi zorunlu kılınmıştır. Yaygın olarak kullanılan seçici besiyerlerinin *Listeria* spp.'nin izolasyonunu sağladığı, ancak *L. monocytogenes*'in spesifik tanımlanmasını sağlamada yetersiz kaldığı gözlenmiştir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), potansiyel olarak zarar görmüş *L. monocytogenes*'lerin geri kazanımını arttırmak için seçici maddeler içermeyen birincil zenginleştirme adımında, 30 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra diğer mikroorganizmaların baskılanması için akriflavin, nalidiksik asit ve sikloheksimit eklenip, inkübe edilen zenginleştirme kültürlerinden seçici besiyerlerine ekim yapılmasını tavsiye etmektedir (Van Netten ve diğ., 1989). İzole edilen *Listeria* ve *Listeria* benzeri bakterilerin türlerinin belirlenmesi için biyokimyasal veya genetik olarak tanımlanması gereklilik haline gelmiştir.

Beyaz peynir, üretimi sırasında dikkat edilmesi gereken pastörizasyon, işletme hijyeni vb. gibi faktörlerin göz ardı edilmesi durumunda, bu bakterinin bulaşması ve çoğalması için elverişli bir kaynak olabilmektedir. Bu nedenle, *L. monocytogenes* kaynaklı salgınların olmaması adına üretim aşamasından tüketiciye ulaşıncaya kadar, bu gıdanın sıkı denetimlerden geçmesi önemlidir. Bu çalışmada, İstanbul ilinde satışa sunulan beyaz peynirlerin, *L. monocytogenes* bakterisi ile kontaminasyonunu, bu bağlamda halk sağlığı açısından potansiyel risk durumunu tespit etmek amaçlanmıştır. Çalışmamızda İstanbul ilinde bulunan market ve yerel pazarlardan satın alınan beyaz peynir örnekleri *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. Biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanan ve antibiyotik direnç profilleri belirlenen suşlar, PZR yöntemi ile *hlyA* ve *iap* genlerinin varlığı açısından incelenerek moleküler olarak doğrulaması yapılmıştır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. TEHLİKE ANALİZİ VE KRİTİK KONTROL NOKTALARI (HACCP)

Gıdaların üretim, dağıtım ve tüketim aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilen kontaminasyonun büyük bir kısmı, gıda endüstrisinde yer alan kuruluşların kalite sistemleri ve gıda güvenliğindeki hijyen sorunlarından kaynaklanmaktadır. HACCP sistemi bu gibi durumların önüne geçmek amacıyla, ürünün geçirdiği tüm aşamalarda meydana gelebilecek muhtemel fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehlikeleri, tüketicinin beklentilerini göz önüne alarak ortadan kaldırmayı amaçlar.

HACCP sisteminin etkileşim halinde olduğu, gıda işletmelerinde var olması gereken GMP (İyi Üretim Uygulamaları), GHP (İyi Hijyen Uygulamaları) ve SSOP (Standart Sanitasyon Operasyon Prosedürleri) gibi programlar ise, altyapı özelliğinde olan vazgeçilemez ön koşullardır.

HACCP sistemi, gıdaların üretimi, depolanması ve dağıtımı ile ilgili tehlike ve riskleri tanımlayan ve değerlendiren ve bu tehlikenin belirli üretim noktalarında ortadan kaldırılmasını veya azaltılmasını amaçlayarak uygun kontrolleri yerine getiren bir süreçtir. Çoğu süt ürünündeki başlıca potansiyel tehlikeler mikrobiyolojik olanlardır ve süt endüstrisi, HACCP gibi koruma programlarının geliştirilmesi ve uygulanması yoluyla kalite ve güvenliğin sağlanması konusundaki çalışmalarını arttırmıştır.

Son yıllarda patojen mikroorganizmalar veya bunların toksinleriyle kontaminasyona uğrayan süt ve süt ürünlerinin tüketimi nedeniyle meydana gelen enfeksiyonlar ve zehirlenmeler görülmektedir. Bu durum süt endüstrisinde de HACCP programlarının ve mikrobiyolojik kontrollerin önemini göstermiştir (Evrensel ve diğ., 2003).

Dünya peynir üretimi, son 20 yılda yıllık ortalama % 4.2 oranında artmıştır. Peynir nedeniyle meydana gelen gıda kaynaklı salgınlar araştırıldığında belirli durumların salgına neden olduğu görülmüştür. Salgınların çok sayıda insanı etkilediği göz önüne alınarak kalite sistemlerine uyulmasının peynirin güvenli bir şekilde üretilmesi için büyük önem taşıdığı görülmüştür (El-Hofi ve diğ., 2010).

Ülkemizde de gıda güvenliği ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen ve peynirler için geçerli olan mikrobiyolojik değerler Tablo 2.1’de gösterilmiştir (Anon., 2010; Kaynar, 2011).

**Tablo 2.1:** Peynir, eritme peynirler ve eritme peynir ürünlerine ait mikrobiyolojik değerler.

| Gıda                                             | Mikroorganizmalar                  | Numune Alma Planı |   | Limitler <sup>1</sup> |                 |
|--------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|---|-----------------------|-----------------|
|                                                  |                                    | n                 | c | Minimum               | Maksimum        |
| Peynir (Eritme peynir hariç diğer tüm peynirler) | <i>Enterobacteriaceae</i>          | 5                 | 2 | 10 <sup>3</sup>       | 10 <sup>4</sup> |
|                                                  | <i>S. aureus</i>                   | 5                 | 2 | 10 <sup>2</sup>       | 10 <sup>3</sup> |
|                                                  | <i>Salmonella</i> türleri          | 5                 | 0 | 0/25 g/ml             |                 |
|                                                  | <i>L. monocytogenes</i>            | 5                 | 0 | 0/25 g/ml             |                 |
|                                                  | <i>E. coli</i> O157:H7             | 5                 | 0 | 0/25 g/ml             |                 |
| Eritme Peynirler ve Eritme Peynir Ürünleri       | AKS <sup>2</sup>                   | 5                 | 2 | 10 <sup>2</sup>       | 10 <sup>3</sup> |
|                                                  | Maya ve küf                        | 5                 | 2 | 10 <sup>1</sup>       | 10 <sup>2</sup> |
|                                                  | Koliform bakteriler <sup>(3)</sup> | 5                 | 0 | <3                    |                 |
|                                                  | <i>L. monocytogenes</i>            | 5                 | 0 | 0/25 g/ml             |                 |

<sup>1</sup>Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-ml olarak değerlendirilir

<sup>2</sup>AKS: Aerobik koloni Sayısı

<sup>3</sup>En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

## 2.2. BEYAZ PEYNİR ÜRETİMİ

Salamura peynirler, Kuzeydoğu Akdeniz bölgesinde ve Balkanlarda üretilen en popüler peynir çeşitleridir. Koyun, manda, sığır ve keçi sütünden veya bu sütün karışımlarından üretilirler. Feta peyniri (Yunanistan'da), domiati (Mısır'da), beyaz peynir (Türkiye'de) ve Hellim (Kıbrıs'ta) bu türün en çok tanınan peynirleridir (Bintsis ve diğ., 2002).

Beyaz peynir, Türkiye’de üretilen çeşitli fermente süt ürünlerinin en önemlilerinden biridir. Yıllık ortalama beyaz peynir tüketiminin 2001 yılında 243.000 ton civarında olduğu tahmin edilmektedir. Beyaz peynir, çiğ koyun sütünden, çiğ inek sütünden veya ikisinin karışımından üretilen ve salamura haline getirilmiş yumuşak veya yarı sert bir peynirdir. Beyaz peynir taze iken yumuşak bir yapıya sahiptir, ancak 3 ay tuzlu suyla olgunlaştırıldıktan sonra yarı sert veya yarı yumuşak olarak sınıflandırılabilir (Öner ve diğ., 2006).

Peynir aroması, süt bileşenlerinin, süt, peynir mayası veya mikroorganizmalardan elde edilen enzimler tarafından parçalanmasının sonucudur. Peynirde bulunan mikroorganizmalardan, özellikle de laktik asit bakterilerinden gelen enzimler, peynir tadı için gerekli olan bu tür

bileşiklerin oluşumundan sorumlu olan başlıca faktörlerdir. Bu nedenle, starter bakteriler, ısıtma işlemi görmüş sütte yapılan peynirlerde lezzet bileşiklerinin üretimi için büyük öneme sahiptir (Atasoy ve diğ., 2008).

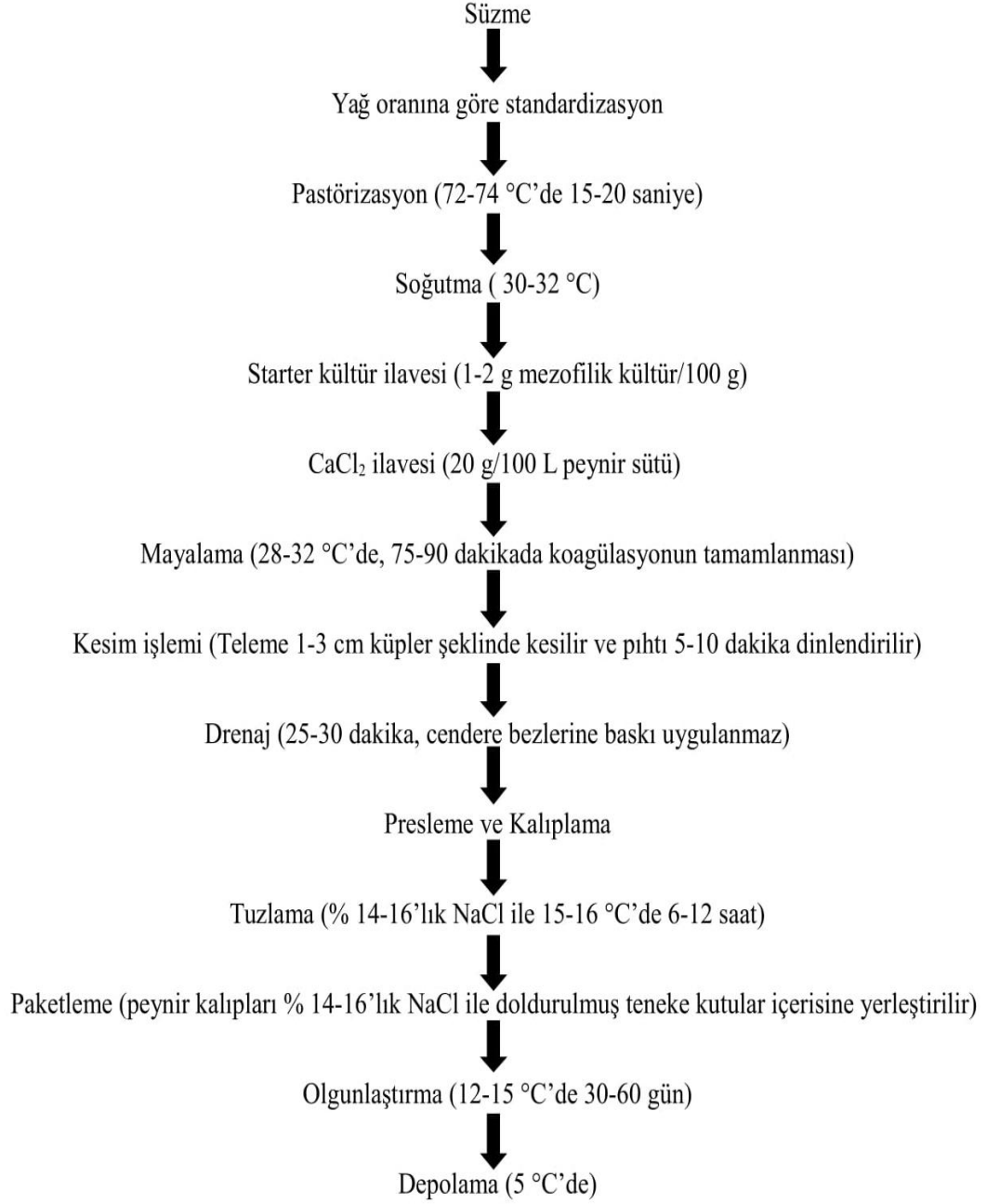
Peynir endüstrisinde kullanılan rennin, süt emen koyun, buzağı ve keçi yavrularının şirdeninden elde edilen ve peynir üretimi için sütün koagülasyonunda kullanılan bir enzimdir. Buzağı rennini sınırlı proteolitik aktivite göstererek yüksek oranda kazeini koagüle etme özelliği gösterir. Mikrobiyal kaynaklı enzimler de peynir mayası olarak kullanılmaktadır (Akın, 1996).

Pastörize ve çiğ sütler beyaz peynir yapımında kullanılmaktadır. Çiğ süt kullanılarak üretilen peynir içerisinde, patojen mikroorganizmaların da dahil olduğu çok sayıda mikroorganizma bulunduğu bilinmektedir. Bu durum halk sağlığı açısından ciddi bir sorundur. Bu tür peynirlerin diğer bir sorunu, serum proteinlerinin denature olmaması ( $\beta$ -laktoglobulin ve  $\alpha$ -laktalbumin) ve süt yağının pıhtıda daha az tutulması sonucunda istenilen verimin elde edilememesidir. Sütte uygulanan pastörizasyon yöntemiyle, serum proteinleri yağ globülleri ile etkileşime girer ve kazein üzerine adsorbe olarak peynir veriminde artışa neden olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, peynir üretiminde kullanılan sütün pastörize edilmesi gereklidir (Elmas, 2014).

Beyaz peynirin üretilmesi için öncelikle süzme işlemi uygulanan çiğ sütün standardizasyonu yapılır. 80-85 °C'de 2-3 saniye, 63 °C'de 30 dakika ya da 65 °C'de 5 dk pastörizasyon yapılır. Süt sıcaklığı 32 °C'ye düştükten sonra mayalama teknesine aktarılır ve peynir sütüne, starter kültür 1-2 g/100 g oranında,  $\text{CaCl}_2$  ise 0.2 g/l oranında eklenir. Aşılana süt 30 dk muhafaza edilir ve 90 dk içinde pıhtılaşacak olan sütte sıvı peynir mayası eklenir (10 g/100 kg peynir sütü). 30-45 dk sonra süt jel formunu almaya başlar ve 75-90 dk'nın ardından daha sıkı bir hale gelir. Teleme küp şeklinde (2 cm) kesilir ve peynir altı suyunda 5-10 dk bekletilir. Peynir altı suyu uzaklaştırılan pıhtı, bez ile kaplanmış değişik boyutlardaki paslanmaz çelikten yapılmış kalıplara aktarılır. Peynirin yüzeyine cendere bezi çekilerek pıhtıyı sıkılaştırmak üzere plakalara ağırlık konulur ve oda sıcaklığında (21 °C) baskı uygulanır. Bu uygulama, 3-6 saat boyunca ya da peynir altı suyunun drenajı sona erene veya düşük seviyelere gelene kadar sürdürülür. Basınç her 100 kg peynir sütü için 20-40 kg ağırlıktır. Ağırlıklar kaldırıldığında, cendere bezi açılır ve peynir kütlesi 350-500 g ağırlığında ve 7x7x7 ya da 7x7x10 cm<sup>3</sup> boyutlarında olacak şekilde kesilerek oluşturulan peynir kalıpları 15-16 °C'de 6-12 saat salamurada (14-16 g/100 g NaCl) bekletilir. Salamura peynir kalıpları daha sonra laklı teneke kutuların (18 l) altına yerleştirilir, kutular ağzına kadar % 14-16'lık salamurayla doldurulur ve

tenekelerin ağızı hava almayacak şekilde kapatılır. Salamuradaki tuz konsantrasyonu olgunlaşma sırasında periyodik olarak kontrol edilir ve ayarlanır. Peynir teneke kutularda 12-15 °C’de 1-2 ay içerisinde olgunlaşır ve tüketime hazır hale gelir (Şekil 2.1) (Hayaloğlu ve diğ., 2002).





**Şekil 2.1:** Beyaz peynirin üretim aşamaları (Hayaloğlu ve diğ., 2002).

### 2.3. PEYNİRLERDE SAPTANAN MİKROORGANİZMALAR

Peynir, dünyada yaygın şekilde tüketilen ve çok sayıda çeşidi bulunan bir gıda ürünüdür. Ülkemizde de önemli bir tüketim oranına sahip olan peynirin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Peynirde kontaminasyon sonucu

bulunan mikroorganizmalar, yapı, tat ve lezzette değişikliklere neden olmalarının yanında gıda zehirlenmelerine varan rahatsızlıklara da yol açabilirler.

Koliform grubu bakteriler gıda endüstrisine karşı tehdit oluşturan mikroorganizma gruplarından biridir. Doğada yaygın olarak bulunan bu mikroorganizmalar çeşitli kaynaklardan peynir yapımında kullanılacak olan süte bulaşır ve kısa bir sürede gelişerek sayıca insan sağlığını tehdit edecek bir düzeye ulaşırlar. Koliform grubu mikroorganizmaların en önemlilerinden biri, insan ve hayvan bağırsaklarıyla onların dışkılarında bulunması nedeniyle *Escherichia coli*'dir. Normal şartlarda toprakta, bitkilerde ve suda bu bakteriye rastlanmaz.

Koliform grubu bakteriler, süt ve süt ürünü endüstrisinde ciddi sorunlar oluştururlar. Bu grup içerisinde yer alan *Enterobacter aerogenes* ve *E. coli*'nin peynirlerde tat ve aroma bozukluklarına ve erken şişme denilen yapı bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, bu bakterilerin üretimin çeşitli aşamalarında, peynirde bulunan laktozu parçalayarak gaz meydana getirdiği, % 10 ve üzeri NaCl içeren ortamlarda bile gelişimlerine devam ettikleri bildirilmiştir. Bu mikroorganizmaların pastörize edilmiş sütte bulunmadığı, peynirlere çiğ süttten geçtiği ve yapım aşamasında taze peynirlere bulaştığı tespit edilmiştir (Kaynar, 2011).

Koliform grubu mikroorganizmaların gıdalarda bulunması, hatalı ve yetersiz pastörizasyon işlemlerine, pastörizasyon sonrası oluşan kontaminasyona, üretim sırasında yapılan temizleme ve dezenfeksiyon işlemlerinin yetersizliğine işaret etmektedir. *E. coli*'nin bulunması ise kontaminasyonun muhtemelen fekal kaynaklı olduğunu belirtir ve sağlık için risk teşkil etmektedir. *Salmonella* ve diğer enterik patojenlerin bulunma olasılığı, bu bakterinin varlığı ile artış gösterir. *E. coli* patojenik serotiplere sahip olmasının yanısıra insanlarda özellikle de çocuklarda akut-gastroenteritis ile gıda zehirlenmelerine yol açar (Tekinşen ve diğ., 1993).

Akkaya ve diğ. (2007) tarafından, Afyonkarahisarda tüketime sunulan 100 beyaz peynir örneğinin birinde *E.coli* bulunduğu, Ankara ilinde satın alınan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesini değerlendirmek amacıyla yapılan bir araştırmada ise 50 adet beyaz peynir örneğinin 37'sinde (% 74) *E. coli* bulunduğu bildirilmiştir (Urhan, 2012).

*Enterobacteriaceae* üyesi olan *Salmonella* cinsi doğada yaygın bir şekilde bulunur. Doğal habitatları memeliler ve kanatlılar gibi sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemleridir. Primer kaynakları ise hayvanlar ve insanlardır. Bakterinin bulunduğu hayvan ve insan dışkıları doğaya bırakıldığında, dışkıya temas eden her şeye bulaşırlar (Halkman, 2013).

*Salmonella* spp. içinde sadece insanlarda, sadece hayvanlarda ve bunların her ikisinde birden hastalık yapabilen türler mevcuttur. Salmonellosis adlı gıda kaynaklı bir hastalığa neden olan *Salmonella* spp. gıda mikrobiyolojisinde oldukça önemlidir (Halkman, 2013).

Araştırmacılar salmonellosis enfeksiyonunun meydana gelmesinin vücuda fazla sayıda *Salmonella* alınmasıyla mümkün olacağı fikri etrafında birleşmişlerdir. Midenin asidik ortamından kurtularak bağırsaklara ulaşarak bağırsak enfeksiyonuna neden olurlar. Bu da gıda ile alınan yüksek mikroorganizma sayısı ile mümkün olmaktadır. Bakteri ince bağırsağa ulaştığında, bağırsak epiteline tutunarak burada yaşayıp, çoğalıp, yayılmayı sürdürür ve gastroenteritis enfeksiyonunun ortaya çıkmasına neden olur. Çocuk ve yaşlılarda görülen ölüm oranı erişkin ve sağlıklı insanlara nazaran oldukça fazladır (Halkman, 2013).

Hayvansal ürünler, *Salmonella* spp. ile kontaminasyonun en fazla olduğu gıda maddelerinden biridir. Bu ürünler içerisinde en önemlileri sosisler, kümes hayvanları eti, yumurta ürünleri, kıyma, pastane ürünleri, su ürünleri, dondurma, krema ve süt tozudur (Halkman, 2013).

Çanakkale'deki 4 farklı pazar yerinden alınan 15 beyaz peynir örneği ile yapılan bir çalışmada, örneklerin ikisinde *Salmonella* spp. tespit edilmiştir (Şener ve Celasin, 2013). Burdur ilindeki pazarlardan satın alınan 100 beyaz peynir örneği mikrobiyolojik olarak analiz edilmiş ve örneklerden *Salmonella* (% 30) izole edildiği bildirilmiştir (Kurşun ve diğ., 2008).

Hafif cilt enfeksiyonlarının yanı sıra zatürre ve sepsis gibi daha ağır hastalıklara da neden olan *Staphylococcus aureus*, gıda kaynaklı bir patojendir. Patojen özellikte bir bakteri olmasına rağmen sağlıklı insanların % 20-30'unun deri florası ve üst yutağında yer alır ve insanların % 60'ı zaman zaman bu patojeni barındırmaktadır. Gıdaların üretiminde ve sonraki aşamalarda hijyenik kurallara uyulmaması sonucunda meydana gelen *S. aureus* kontaminasyonun en önemli nedenlerinden biri insandır. Süt hayvanlarında mastitis hastalığının en önemli etmenlerinden birinin *S.aureus* olduğu bilinmektedir. Bu hayvanlardan elde edilen sütlerin, özellikle de çiğ sütle yapılan peynirlerin gıda zehirlenmeleri açısından büyük risk teşkil ettikleri ve bu peynirlerden sıklıkla *S. aureus* izole edildiği raporlanmıştır (Normanno ve diğ., 2007).

Gülmez ve diğ. (2001), Kars ilinde yaptıkları çalışmada 50 salamura peynir örneğinin % 4'ünden *S. aureus* izole etmişlerdir. İstanbul ilindeki beyaz peynirlerin incelendiği bir başka çalışmada ise 50 adet beyaz peynir örneğinin % 66'sında *S.aureus* tespit edilmiştir (Keskin ve diğ., 2006).

Aerobik-mezofilik bakteriler gıdalarda bulunan mikroorganizmaların büyük bir kısmını oluştururlar. Özel besin maddelerine ihtiyaç duymayan bu bakteriler, nötr ve hafif asidik ortamlarda rahatlıkla üreyebilirler. Peynirde toplam mezofilik aerob bakteri sayısının yüksek olması çoğunlukla gıdanın kalitesiz olduğunun veya son kullanma tarihinin sonuna gelmiş olabileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir (Kaynar, 2011).

Ceylan ve Demirkaya (2007), Erzurum’da tüketime sunulan 29 beyaz peynir örneğinin toplam mezofilik aerob bakteri sayısının ortalama  $3.35-6.14 \log_{10}$  kob/g olduğunu bildirmişlerdir. Muğla’daki pazarlarda satılan ev yapımı peynirlerin çeşitli mikrobiyolojik özelliklerinin incelendiği bir araştırmada 26 adet peynir örneği analiz edilmiş ve peynir örneklerindeki ortalama olarak toplam mezofilik aerob canlı bakteri sayısının  $1.0 \times 10^8$  kob/g olduğu tespit edilmiştir (Uğur, 2001).

Ekmek, bira, şarap gibi gıda ürünlerinin üretim aşamasında kullanılan ve ekonomik öneme sahip olan maya türlerinin yanında çok sayıda küf ve maya türü gıda teknolojisinde istenmeyen mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Bu zararlı maya ve küfler saprofit özellikleri nedeniyle gıdalarda bozulmaya neden olmaktadır.

Mayalar, düşük su aktivitesi, düşük pH değeri, yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük sıcaklıkta gelişebilme yetenekleri sayesinde süt ürünlerinde bozulmalara neden olurlar. Şeker ve tuz konsantrasyonlarının yüksek olduğu ortamlar da gelişimlerini sürdürebilmektedirler.

Gıdalarda bozulmaya neden olan maya ve küfler, tat bozulmasına, kötü koku oluşumuna, gaz oluşturmaları nedeniyle bazı gıdalarda arzu edilmeyen gözenekli yapı oluşumu gibi bozukluklara neden olmaktadır. Küf türlerinin bazıları ise kontamine ettikleri gıda ürününde gelişir ve ortama toksik metabolitler, mikotoksinler salgılar. Bu metabolitlerin salgılandığı gıda maddesinin tüketilmesi durumunda da ölümle sonuçlanabilen zehirlenmeler meydana gelebilmektedir (Jakobsen ve Narvhus, 1996).

Beyaz peynir üretiminde mikrobiyolojik kontaminasyon kaynaklarını belirlemeye yönelik yapılan bir araştırmada, soğutma odası ve üretim yeri havasının küf ve mayalar için potansiyel kontaminasyon kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Temelli ve diğ., 2006). İstanbul ilindeki beyaz peynirlerin incelendiği bir çalışmada 50 adet beyaz peynir örneğinin, tamamında küf ve maya geliştiği bildirilmiştir (Keskin ve diğ., 2006).

Önemli gıda kaynaklı patojenlerden bir diğeri ise *L. monocytogenes*'tir. Bakterinin neden olduğu hastalığa listerizos denilmektedir. Listeriozis, genellikle *L. monocytogenes* ile kontaminasyona uğrayan gıdaların tüketilmesi sonucu meydana gelmektedir. Süt ve süt ürünleri, içerdikleri yüksek besin değerleriyle bakterinin üreyip gelişmesi için elverişli bir ortam oluşturmaktadır.

## 2.4. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLER

*Listeria*, Bergey's Manual'ın 1934 yılındaki baskısında ilk olarak *Corynebacteriaceae*, 1974 yılındaki baskısında ise *Erysipelothrix* ve *Caryophanon* ile birlikte *Lactobacillaceae* içinde yer almıştır. En sonunda *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* ve *Caryophanon* ile birlikte düzenli, spor oluşturmayan, Gram pozitif çomaklar bölümüne yerleştirilmiş *Listeriaceae* içinde yer almıştır (Bergey, 1934; Buchanan ve Gibson, 1974; Sneath ve diğ., 1986).

Gram pozitif, spor oluşturmayan çomak şekilli bakteriler olan *Listeria* cinsinin şu ana kadar yayınlanmış makalelerle, *L. monocytogenes* (Pirie, 1940), *L. ivanovii* (Seeliger ve diğ., 1984), *L. innocua* (Seeliger, 1981), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (Rocourt ve Grimont, 1983), *L. grayi* (Errebo Larsen ve Seeliger, 1966), *Listeria rocourtiae* (Leclercq ve diğ., 2010), *Listeria marthii* (Graves ve diğ., 2010), *Listeria weihenstephanensis* (Halter ve diğ., 2013), *Listeria fleischmannii* (Bertsch ve diğ., 2013), *Listeria floridensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia*, (Bakker, 2014), *Listeria newyorkensis*, *Listeria booriae* (Weller ve diğ., 2015) olmak üzere 17 tür içerdiği bildirilmiştir. *L. murrayi*'nin önceden *Listeria* cinsi içinde yer alan bir başka tür olduğu sanılıyordu ancak DNA-DNA hibridizasyonu, multilokus enzim elektroforezi, rRNA restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemleri kullanılarak yapılan analizlerden sonra bu türün *L. grayi*'nin bir alttürü olduğu belirlenmiştir (Rocourt ve diğ., 1992). Bu türler arasından *L. monocytogenes*'in hem hayvanlar hem de insanlar için, *L. ivanovii*'nin ise sadece hayvanlar için patojen olduğu tespit edilmiştir.

*L. monocytogenes* ilk olarak 1926 yılında Cambridge İngiltere'de Murray ve diğ. (1926) tarafından, laboratuvar tavşanlarının kanından izole edilmiş ve kan tablosunda neden olduğu monositoz nedeniyle *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Bir sonraki yıl Pirie (1927) de Güney Afrika'da bulunan enfekte yabani gerbillerden Gram pozitif bir bakteri izole etmiş ve bu bakteriye, cerrahide antiseptiklerin kullanımının öncüsü olan İngiliz cerrah Lord

Joseph Lister (1827-1912) onuruna *Listerella hepatolytica* adını önermiştir. Daha sonra Murray ve Pirie aynı tür bakteri ile uğraştıklarını farketmiş ve bu nedenle bakterinin ismini *Listerella monocytogenes* olarak birleştirmişlerdir. 1939 yılında Pirie *Listerella* adının zaten bir cıvık mantar (Mycetozoa) türü için kullanıldığını farketmiş, bakterinin adını *Listeria monocytogenes* olarak değiştirmiştir (Pirie, 1940).

*L. monocytogenes* insanlarda ilk kez 1929 yılında Danimarka'da Nyfeldt (1929) tarafından, mononukleozis benzeri semptomlar gösteren hastaların kan kültürlerinden izole edilmiştir. 1936 yılında Amerika'da, listeriozisin yenidoğan bebeklerde septisemiye ve yetişkinlerde menenjitte neden olduğu saptanmıştır (Burn, 1936).

*L. monocytogenes*'in birincil kaynağı kontamine gıdalardır ve bu gıdalar aracılığıyla insanlara bulaştığı saptanmıştır. 1979 yılında belgelenmiş ilk gıda kaynaklı listeriozis salgını Boston hastahanesinde, hastahane hazırlanan kontamine sebzelerin tüketilmesiyle 23 hastada meydana gelmiştir (Gellin ve Broome, 1989). Bir diğer salgın 1981 yılında Kanada Maritime'de kontamine olmuş lahana salatasının tüketimi sonucunda meydana gelmiştir (Schlech ve diğ., 1983).

*L. monocytogenes* bakterilerini karşılaştırmak için yapılan serolojik araştırmalar sonucunda, bu bakterinin flagellar (H) ve somatik (O) antijenik yapıları incelendiğinde 13 serotipe sahip olduğu bildirilmiştir. Bu serotipler 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4ab, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7 olarak belirlenmiştir (Seeliger ve Höhne, 1979). Hastalardan izole edilen suşların yaklaşık %98'nin 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotiplerine ait olduğu tespit edilmiştir (Jacquet ve diğ., 2002).

## 2.5. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

*Listeria* cinsinde bulunan türler 0.5 µm çapında 1-2 µm uzunluğunda, yuvarlak uçlu Gram pozitif çomaklar olarak tanımlanmışlardır. Hücreler tek veya kısa zincirler şeklinde veya V ve Y formlarında düzenlenmişlerdir. Bazen hücrelerin kokoid, ortalama 0.5 µm çapında olduğu ve streptokoklar ile karıştırılabileceği bildirilmiştir. Eski kültürlerde ve ozmotik şoktan sonra uzun, ince ve filamentöz hücreler olarak görünürler (Kuhn ve diğ., 1989; Gutekunst ve diğ., 1992; Jorgensen ve diğ., 1995).

*Listeria* cinsi bakterilerin 20-25 °C’de peritrik flagellası nedeniyle hareketli, 37 °C’de ise hareketsiz olduğu bildirilmiştir. Tryptose fosfat broth’da 20 °C’de inkübasyonu sonucu taze kültürle hazırlanan asılı damla pereparatında karakteristik olan ‘tumbling motility’ (takla atma/yuvarlanma) hareketi bakterinin tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca, yarı katı hareket besiyerine yapılan batırma ekim sonucunda, besiyeri yüzeyinin 1.5 cm altında, organizmanın mikroaerofilik olması nedeniyle “şemsiye” veya ters “çam ağacı” şeklinde üreme yeteneği de bu bakterinin karakteristik özelliklerinden biridir (Kathariou ve diğ., 1995).

Aerob ve fakültatif anaerob özellikte olan *Listeria*’nın pH 5.2-9 ve < 0-45 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebildiği bildirilmiştir. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif özellik gösterdikleri ve şeker fermentasyonu sonucunda asit oluşturdıkları ancak gaz oluşturmadıkları, nitrat indirgenmesini gerçekleştiremedikleri, Metil Kırmızısı ve Voges Proskauer testlerinde ise pozitif sonuç verdikleri tespit edilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991).

*Listeria* cinsi bakteri türlerinin ayırımında Tablo 2.1’de verilen biyokimyasal özellikler temel alınmaktadır. Şeker fermentasyonu, β-hemoliz ve CAMP testlerinin, türlerin ayırımında belirleyici olduğu bildirilmiştir (Rocourt, 1999).

**Tablo 2.2:** *Listeria* cinsi bakterilerin biyokimyasal özellikleri (Wagner ve McLauchlin, 2008).

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

<sup>a</sup> +, pozitif reaksiyon; -, negatif reaksiyon; ±, değişken ya da zayıf reaksiyon.

<sup>b</sup> Artmış hemoliz reaksiyonu.

<sup>c</sup> ++, güçlü hemolitik reaksiyon

## 2.6. EPİDEMİYOLOJİSİ

*L. monocytogenes* genellikle toprak ve suda ve özellikle de çürümeye maruz kalan bitki materyali üzerinde bulunur, bu ortamlar organizmanın doğal yaşam alanı olarak kabul edilmiştir (Rocourt ve Seeliger, 1985). Aerobik olarak bozulmuş silaj gibi bitki örtüsünün, çok sayıda *L. monocytogenes*'in gelişimini desteklediği ve çiftlik hayvanlarında çok sayıda listeriozis vakasında enfeksiyon kaynağı olduğu öne sürülmüştür. Organizma, olumsuz çevre koşulları altında, gıda kaynaklı hastalıklara neden olan diğer spor oluşturmeyen bakterilerden daha uzun süre hayatta kalabilmektedir. Bu direnç, işleme ekipmanı üzerinde kolonileşme ve çoğalma yeteneği ile birlikte *L. monocytogenes*'i gıda endüstrisi için özel bir tehdit haline getirmiştir.

Toprak, silaj, çürüyen bitki materyali, hayvan atıkları ve atık çamuru *Listeria* kontaminasyonu kaynağı olarak kabul edilmiştir (Fenlon, 1985). Bereketli tarım topraklarının, *L. monocytogenes* kaynakları olduğu raporlanmıştır. Weis ve Seeliger (1975) *L. monocytogenes*'in bitki örneklerindeki dağılımını incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, mısır tarlalarının % 9.7'sinin, tahıl tarlalarının % 13.3'ünün, ekili alanların % 12.5'inin, ekilmemiş alanların % 44'ünün, çayır ve meraların % 15.5'inin, ormanların % 21.3'ünün ve Güney Almanya'da incelenen yaban hayatı besleme alanlarının % 23.1'inin bu bakteri ile kontamine olduğunu göstermiştir. Welshimer ve Donker-Voet (1971) tarafından yapılan bir çalışmada, sonbaharın başlarında aldıkları toprak ve ölü bitki örtüsünden *L. monocytogenes* izole edemediklerini, ancak takip eden baharda toplanan toprak ve ölü bitki örtüsünün neredeyse tamamında *L. monocytogenes* izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

*L. monocytogenes* sağlıklı çeşitli hayvan türlerinin dışkısında bulunmuştur. Gray ve Killinger (1966), 37 memelinin dışkılarında bu bakteriyi izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bitki örtüsünün bu bakteri için doğal bir habitat olduğu bilindiğinden, sağlıklı koyun (Gronstol, 1979), keçi (Loken ve diğ., 1982) ve sığır (Hofer, 1983; Fenlon ve diğ., 1996) gibi otlayan hayvan dışkılarının bu bakteriyi içerdiğinin raporlanması sürpriz olmamıştır. Ancak *L. monocytogenes*'in, domuz (Rahman ve diğ., 1985), tavuk (Basher ve diğ., 1984), hindi (Hatkin ve diğ., 1986), martı (Fenlon, 1985) ve kargaların (Fenlon, 1985) dışkılarında da izole edildiği bildirilmiştir.

Lahana salatasıyla ilişkili gıda kaynaklı bir insan listeriozis salgınının fekal kontaminasyon yoluyla gerçekleştiğinin ortaya çıkması üzerine, kontaminasyon riski olan atık çamuru ve hayvan atıklarının toprağa sürülmemesi ve çiğ olarak tüketilen ekinler üzerine yayılmaması önerilmiştir (Watkins ve Sleath, 1981).

Kanalizasyon atıklarının boşaltılması için yüzeysel su yollarının kullanılması, göller, nehirler ve akarsularda kaçınılmaz olarak *L. monocytogenes* ile kontaminasyona neden olabilmektedir. Dijkstra (1982) tarafından kuzey Hollanda da yapılan bir çalışmada, yüzey su örneklerinin % 21'inden *L. monocytogenes* bakterisinin izole edildiği ancak göllerin yüzücüler tarafından kullanılmasına rağmen, hiçbir insan listeriozis vakasına rastlanılmadığı rapor edilmiştir.

Kullanılan hayvan yemlerinin çoğu, *L. monocytogenes* çoğalmasını kısıtlayan düşük seviyelerde suya sahiptir. Aynı şey saman ve tahıl taneleri için de geçerlidir, bu yüzden *L.*

*monocytogenes* varlığı bu tür ürünlerde bildirilmiş olsa da, hayvanlarda ciddi bir risk oluşturan seviyelere ulaşması olası değildir (Garcia ve diğ., 1996). Hazırlanan bir çok yem pelet halinde satılır ve hepsi olmasa da, *Listeria*'nın yüksek bir oranını öldürme kapasitesine sahip bir ısıtım işlemi görmüş olur. Hayvan listeriozisi ile yakından ilişkili hayvan yemlerinin silaj olduğu da belgelenmiştir (Fensterbank ve diğ., 1984; Fenlon, 1986; Wiedmann ve diğ., 1994).

*L. monocytogenes*, özellikle sürü hayvanlarında zoonozun önemli bir sebebidir. Doğada yaygın olan bu bakteriye, toprakta sık sık rastlanır, çürüyen bitkilerde ve bir çok memelinin fekal florasının bir parçası olarak görülür (Schuchat ve diğ., 1991b; Bille ve diğ., 2003). Bir çok gıdanın *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu ve çiğ sebzeler, çiğ sütler, balıklar, kümes hayvanları ve etlerden izole edildiği bildirilmiştir (Farber ve Peterkin 1991).

CDC tarafından 1980-1982 ve 1986 yıllarında aktif olarak yürütülen iki araştırma, yıllık enfeksiyon oranının milyonda 7.4 olduğunu, ABD'de yılda yaklaşık 1.850 vakanın 425'inin ölümle sonuçlandığını göstermiştir (Ciesielski ve diğ., 1988; Gellin ve diğ., 1991). 1993 yılında gıda kaynaklı listeriozis riskini en aza indirmek için gıda endüstrisinde düzenlemeler yapıldıktan sonra yıllık enfeksiyon oranının milyonda 4.4 vakaya düştüğü, 1.092 vakaya rastlandığı ve bunların 248'inin ölümle sonuçlandığı saptanmıştır (Tappero ve diğ., 1995). İnsan listeriozisindeki benzer bir düşüş oranı, gıda kontaminasyonunu azaltmaya yönelik kontrol önlemlerinin ardından Fransa'da görülmüştür (Goulet ve diğ., 2001).

En yüksek listeriozis oranının bebeklerde ve 60 yaş üstü yetişkinlerde görüldüğü bildirilmiştir. Gebe kadınlar tüm olguların yaklaşık % 30'unu ve 10-40 yaş grubu ise olguların % 60'ını oluşturmaktadır (Ciesielski ve diğ., 1988; Tappero ve diğ., 1995).

1983 yılında kontamine lahana salatasından kaynaklanan gıda kaynaklı insan listeriozisi salgınının ardından (Schlech ve diğ., 1983), süt (Fleming ve diğ., 1985), yumuşak peynirler (Linnan ve diğ., 1988; MacDonald ve diğ., 2005), tereyağı (Lyytikäinen ve diğ., 2000) ve tutsülenmiş alabalık (Miettinen ve diğ., 1999), hazır domuz eti ürünleri (Goulet ve diğ., 1998), sosis, hazır hindi eti (Frye ve diğ., 2002; Olsen ve diğ., 2005; Gottlieb ve diğ., 2006;) gibi ürünlerin dahil olduğu, birkaç gıda kaynaklı salgının invaziv hastalıklarla (bakteriyemi, menenjit) sonuçlandığı belgelenmiştir. 2002 yılında ABD'nin 9 eyaletinde kontamine hindi eti nedeniyle ortaya çıkan salgında 54 kişi hastalanmış ve gıda ürünlerinin piyasadan geri çekilmesi

ile ABD tarihindeki en büyük (30 milyon pound'dan fazla) zarar meydana gelmiştir (Gottlieb ve diğ., 2006).

İnsan listeriozisi tipik olarak kontamine gıdaların alınmasıyla oluşur, ancak anneden çocuğa plasenta yoluyla geçiş ya da enfekte olmuş doğum kanalı ve neonatal çocuk yuvalarındaki çapraz enfeksiyonların yer aldığı diğer bulaşma yolları da tespit edilmiştir (Farber ve diğ., 1991; Colodner ve diğ., 2003). Bebekleri yıkamak için kullanılan kontamine mineral yağının, salgınlardan birinin kaynağı olduğu bildirilmiştir (Schuchat ve diğ., 1991a).

## 2.7. *LISTERIA* CİNSİ BAKTERİLERİN TESPİTİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

### 2.7.1. Geleneksel Kültür Yöntemleri

*L. monocytogenes*'i enfekte hastaların kan ve beyin-omurilik sıvısından izole etme denemeleri başarıyla sonuçlanmış olsa da, gıda ve klinik örneklerin içerdiği az sayıdaki *L. monocytogenes* popülasyonu ve bunun çok sayıda başka organizma ile kombinasyon halinde olması durumu izolasyonda zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Gıda, klinik ve çevresel numunelerde *L. monocytogenes* varlığını tespit etmek için doğrudan ekim, soğuk zenginleştirme, seçici zenginleştirme ve çeşitli hızlı yöntemler farklı kombinasyonlarla kullanılabilmektedir (Donnelly ve Nyachuba, 2007).

Analiz sürelerinin birkaç aydan 1 haftadan daha az bir süreye inmesinden beri seçici zenginleştirme ve besiyerine ekimde büyük gelişmeler olmuştur. Gıda kaynaklı listeriozis salgınları, sporadik hastalıklar ile ilişkili yüksek ölüm oranlarıyla ve zorunlu tehlike analizi kritik kontrol noktası (HACCP) programlarıyla birleştiğinde, çeşitli gıdalardaki az sayıda *Listeria*'yı tespit etmek için daha hızlı ve daha etkili yöntemlere ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır.

*Listeria*, 1-8 °C gibi sıcaklıklarda hayatta kalabildiği ve çoğalabildiği için, 4 °C'deki soğuk zenginleştirme, yıllarca tercih edilen seçici zenginleştirme yöntemi olmuştur. Bu teknik birkaç aylık inkübasyon sırasında, haftada veya iki haftada bir tryptose agar ekimi gerekli kılmıştır (Gray ve diğ., 1948). Bu yöntem listeriozis epidemiyolojisi ile ilgili çok fazla katkıda bulunmasına rağmen, uzun süreli inkübasyon periyodu ciddi bir dezavantaj olmuştur. Seçici maddeler kullanılan yeni besiyerleri, *Listeria* spp.'nin daha yüksek sıcaklıklarda (30 ve 35 °C)

zenginleştirilmesine olanak tanımıştır. *Listeria* izolasyonu için çok çeşitli tek ve iki aşamalı zenginleştirme protokolleri tanımlanmıştır.

Gıda standartlarının çoğu, 25 gram gıda ürününde *L. monocytogenes* bakterisinin olmaması gerektiğini belirtir. Bu da sadece, seçici besiyerine ekim yapmadan ve kültürleri doğrulamadan önce rekabetçi mikroflorayı baskılamak için antimikrobiyal ajanları kullanan zenginleştirme yöntemleriyle gerçekleştirilir. Zenginleştirmede kullanılan seçici ajanlar, diğer Gram pozitif bakterilerin büyümesini önleyen akriflavin; Gram negatif bakterileri inhibe eden nalidiksik asit ve mantarları inhibe eden sikloheksimittir. *Listeria* izolasyonu için kullanılan besiyerleri eskülin içerir ve tüm *Listeria* spp.'ler eskülini hidrolize eder ve eskülin veya demir iyonları içeren zenginleştirme sıvısı veya besiyerinde yoğun siyah rengin oluşmasına neden olur. Bunun nedeni,  $\beta$ -D-glukosidaz tarafından parçalanarak eskülinin ürünü olan 6,7-dihidroksikoumarin ile ferrik demir arasında bir bileşik oluşmasıdır, bu da siyah bir çökeltiye neden olur (Jeyaletchumi ve diğ., 2010).

Kullanılacak standart yöntemin seçimi *L. monocytogenes*'in izole edileceği gıda ürününe göre değişmektedir. Gıdalardan *Listeria* tespiti için en yaygın kullanılan kültür referans yöntemleri ISO 11290 standartları (ISO, 2017); Süt ürünleri, deniz ürünleri ve sebzelerden *Listeria* spp.'nin izole edilmesinde FDA-BAM metodu (Hitchins ve diğ., 2017); Et ve kümes hayvanları ile çevre örneklerinden elde edilen ürünlerden *Listeria* spp. izole etmek için USDA Standart yöntemidir (USDA, 2013).

### **FDA-BAM Standardı**

İlk olarak Lovett tarafından geliştirilen FDA standardı, Amerika Birleşik Devletleri'nde süt, süt ürünleri (özellikle dondurma ve peynir), deniz ürünleri ve sebzelerde *L. monocytogenes* tespiti ve sayımı için en sık kullanılan yöntemdir (Lovett, 1988). Oluşturulan ilk yöntem birkaç kez modifiye edilerek günümüzdeki şeklini almıştır.

Bu yöntemde, *L. monocytogenes* açısından incelenecek gıda örneğinin analiz zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edilmesi önerilmektedir. Diğer koşullar uygunsa bu sıcaklıkta bakteriler, yavaş yavaş da olsa üremeye devam edeceklerdir. Bununla birlikte, örnek zaten donmuşsa, analiz edilene kadar çözülmemelidir. 25 g gıda örneği 225 ml Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB)'a eklenir ve stomacherda karıştırılır. 30 °C'de 4 saat inkübasyonun ardından seçici ajanlar eklenir ve inkübasyon 48 saate tamamlanır. Eğer sikloheksimid yoksa, alternatif

olarak 25 mg/L'de pimarisin (natamisin) kullanılır. Natamisin, sikloheksimitten çok daha güvenlidir. Diğer bir olasılık ise, eğer ilgili matrisler (örneğin pastörize süt ve krema, yoğurt ve önceden pişirilmiş dondurulmuş deniz mahsulleri) maya ve küf bakımından düşükse, bir mantar inhibe edici madde olmadan da yapılabilmektedir.

24 ve 48. saatte BLEB kültüründen, eskülin içeren seçici izolasyon besiyerlerine ekim yapılır. Bu besiyerleri; eskülin ve ferrik demir içeren Oxford Agar (OXA), Polymyxin-Acriflavin-Lithium chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol Agar (PALCAM), Modified Oxford Agar (MOX) ve Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam (LPM)'dir. OXA, PALCAM veya MOX Petrileri 35 °C'de 24-48 saat ve LPM Petrileri 24-48 saat boyunca inkübe edilir. Tercih edilen eskülin içeren seçici besiyerine ek olarak, Biosynth Chromogenic Medium (BCM), Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA), Rapid L'mono, veya CHROMagar *Listeria* gibi *L. monocytogenes*-*L. ivanovii* diferansiyel seçici agarlardan birine de 48 °C'de ekim yapılması tavsiye edilmektedir. Bu, *L. monocytogenes*'in *L. innocua* tarafından maskelenmesi sorununu ortadan kaldırmaktadır.

*Listeria* cinsi bakteriler eskülin içeren besiyerlerinde etrafı siyah haleli siyah kolonilerdir. Belli bazı bakteriler zayıf kahverengimsi siyah koloniler oluşturabilir, ancak rengin oluşması 2 günden fazla sürer. OXA ve PALCAM veya LPM ve MOX besiyerinden Trypticase soy agar with yeast extract (TSA-YE) besiyerine 5 tipik koloninin saflaştırma işlemi için ekimi yapılır. Eğer BCM petrilerine ekim yapılır ve mavi koloniler gözlenirse, *L. ivanovii* genellikle hayvanlardan izole edilen bir tür olduğu için, bu koloniler *L. monocytogenes* şüpheli koloniler olarak kabul edilmektedir. ALOA besiyerindeki *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* kolonileri mavi renklidir ve etraflarında lipoliz zonu vardır. TSA-YE besiyerindeki saflaştırma işlemi geleneksel analizde zorunlu bir adımdır, çünkü seçici agar ortamındaki izole edilmiş koloniler hala kısmen inhibe edilmiş rakiplerin görünmez üyeleriyle temas halinde olabilir. En az 5 izolatin incelenmesi gereklidir, çünkü aynı örnekten birden fazla *Listeria* türü izole edilebilir. BCM ve ALOA besiyerlerinin kullanılması, seçilmesi gereken koloni sayısının azaltılmasına yardımcı olacaktır. *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*, ticari bir doğrulama kiti kullanılarak veya geleneksel ramnoz/ksiloz fermantasyon sıvı veya katı besiyerleri ile ayırt edilebilmektedir. TSA-YE besiyerlerine ekim yapılan petriler 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Eğer koloniler hareket incelemesi için asılı damla yöntemiyle incelenmeyecekse 35 °C'de inkübe edilebilir. Onaylanmış hızlı yöntemler için üretici firmalar tarafından önerilen seçici izolasyon

besiyerleri kullanılmalıdır. Bununla beraber, yukarıda da belirtildiği gibi bu besiyerlerine ek olarak yeni *L. monocytogenes*-*L. ivanovii* diferansiyel besiyerlerinin kullanımı da önerilmektedir (Hitchins ve diğ., 2017).

### ISO 11290 Standardı

İnsanlar tarafından tüketilen gıdalardan ve hayvan yemlerinden *L. monocytogenes* izole etmek için ISO 11290 standardı kullanılır. *Listeria* cinsi bakteriler sayıca az olabilir ve genel olarak sayıca fazla olan diğer mikroorganizmalarla bir arada bulunmaktadır. Ayrıca, bu ortamda, zarar görmüş ya da stresli *Listeria* spp.'leri tespit etmek de gereklidir. Bu nedenle, *Listeria* cinsi bakterilerin izolasyonunda seçici zenginleştirme gereklidir. İnhibisyon konsantrasyonu azaltılmış birincil seçici zenginleştirme besiyeri en azından bu görevin bir kısmını yerine getirmektedir. *L. monocytogenes*'in varlığı, *L. innocua* ya da *L. ivanovii* gibi diğer *Listeria* türlerinin varlığı tarafından maskelenebilir. Örnekler için seyreltme sıvısı olarak kullanılan ve birincil zenginleştirme besiyeri olan half- Fraser sıvı besiyerine, akriflavin ve nalidiksik asit gibi inhibe edici ajanların konsantrasyon olarak yarısı eklenir. İkincil zenginleştirme besiyeri olan Fraser sıvı besiyerine inhibe edici ajanlar tam konsantrasyonda eklenir.

Genel olarak ilk süspansiyonu hazırlamak için 25 g veya 25 ml örnek, 225 g ya da 225 ml seçici birincil zenginleştirme besiyeri olan half - Fraser sıvı besiyerine eklenir ve homojenize edilir. Seçici birincil zenginleştirme besiyerinin kullanılmadan önce oda ısısında olması sağlanır. Homojenize edilen örnek 30 °C'de  $25 \pm 1$  saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sırasında sıvı besiyerinin rengi siyaha dönüşebilir.

Inkübasyonun süresi sonunda, kültürden 0.1 ml alınarak içinde 10 ml ikincil zenginleştirme besiyeri olan Fraser sıvı besiyerini içeren tüpe veya şişeye aktarılır. İnokülasyon yapılan besiyeri 37 °C'de  $24 \pm 2$  saat inkübasyona bırakılır.

Inkübasyon sonunda Half -Fraser ve Fraser sıvı besiyerindeki kültürden bir öze dolusu alınarak ALOA ve tercih edilen seçici besiyerlerinden birine ekimi yapılır. ALOA besiyerine ekimi yapılanlar 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Tercih edilen seçici besiyerinin inkübasyonu da, uygun zaman ve sıcaklıkta yapılır.

ALOA besiyerinde etrafı opak bir hale çevrili mavi yeşil, tipik koloniler, *L. monocytogenes* şüpheli olarak dikkate alınır. *L. ivanovii* kolonilerinin de etrafı opak bir hale ile çevrili mavi

yeşil renktedir. Opak bir hale ile çevrili olan veya olmayan tüm mavi yeşil koloniler şüpheli *Listeria* spp. olarak dikkate alınır. Bunun nedeni, stres koşullarına, özellikle de asit stresine maruz kalan bazı *L. monocytogenes* suşlarının zayıf hale gösterebilmesi veya hiç hale göstermemesidir.

Her koloni tipini temsil eden (büyük ve küçük, haleli ve halesiz) toplamda 5 koloni, şüpheli *Listeria* spp.'lerin doğrulanması için seçilir ve seçici olmayan besiyerine ekimleri yapılır. Bu işlem için kullanılacak seçici olmayan besiyerleri; Kanlı Agar, Nutrient Agar ya da TSA-YE'dır. İzole edilen kolonilerin gelişimine hangi seçici olmayan besiyeri izin veriyorsa o kullanılmalıdır (ISO, 2017) .

### **USDA Standardı**

Et ve kümes hayvanları ile çevre örneklerinden elde edilen ürünlerden *Listeria* spp. izole etmek için kullanılan USDA standardı, 1986 yılında Lee ve McClain tarafından geliştirilmiştir (Lee ve McClain, 1986; McClain ve Lee, 1988). Çeşitli revizyonlarla günümüzdeki şeklini almıştır.

USDA standardında ilk olarak ön zenginleştirme amacıyla 25 g örnek 225 ml Modified University of Vermont broth (UVM) sıvı besiyerine eklenir. Stomacher cihazında 2 dk. karıştırılıp homojenize hale getirilir. 30 °C'de 23-26 saat inkübe edilir. İkincil zenginleştirme için, UVM zenginleştirme kültüründen 0.1 ml alınarak içerisinde 10 ml Fraser Broth (FB) ya da Morpholinepropanesulfonic acid-buffered *Listeria* enrichment broth (MOPS-BLEB) i çeren tüpe eklenir. FB sıvı besiyeri 35 °C'de 26 ± 2 saat, MOPS – BLEB sıvı besiyeri 35 °C'de 18-24 saat inkübe edilmelidir. FB veya MOPS-BLEB sıvı besiyerlerine ikincil zenginleştirme aşamasından önce inhibe edici ajanlar eklenmelidir.

UVM kültüründen bir öze dolusu örnek, Modified Oxford agar (MOX) besiyerine ekilmeli ve 35 °C'de 26 ± 2 saat inkübe edilmelidir.

FB sıvı besiyeri 26 ± 2 saat inkübasyondan sonra *L. monocytogenes* varlığı bakımından incelenir. Bu inceleme eskülin hidrolizi nedeniyle siyahlaşan besiyeri rengi ile yapılır. FB besiyerinin siyahlaşma derecesi ne olursa olsun, yaklaşık 0.1 ml FB MOX besiyerine ekilir. 35 °C'de 26 saat inkübasyona bırakılır. Eğer FB sıvı besiyerinde siyahlaşma olmamışsa toplam zaman 48 saat oluncaya kadar 35 °C'de inkübasyona bırakılır.

18-24 saatlik inkübasyondan sonra MOPS-BLEB sıvı besiyerinden alınan bir öze dolusu ya da 0.1 ml kültür MOX besiyerine ekilir. 35 °C’de  $26 \pm 2$  saat inkübasyona bırakılır.

MOX petrilerindeki koloniler tipik *Listeria* spp. morfolojisi bakımından incelenir.  $26 \pm 2$ . saatte şüpheli koloniler, eskülin hidrolizi nedeniyle siyah bir zon ile çevrili küçük (yaklaşık 1 mm) kolonilerdir. Şüpheli kolonilerin en az 20’si (eğer varsa) izolasyon için Horse blood overlay agar (HL) besiyerine ekilir. HL besiyerleri 35 °C’de  $22 \pm 4$  saat inkübasyona bırakılır. Eğer MOX besiyerinde şüpheli koloni gözlenmemişse 26 saat daha inkübasyona bırakılırlar.

İnkübasyondan sonra, HL besiyerlerindeki küçük bir  $\beta$ -hemoliz zonu ile çevrili yarı şeffaf koloniler incelenir. Eğer şüpheli koloniler iyi izole edilmemişse tekrar HL besiyerlerine bu kolonilerin ekimi yapılır ve inkübasyona bırakılır (USDA, 2013).

### 2.7.2. Hızlı Tanı Yöntemleri

*L. monocytogenes* tespiti için biyokimyasal, immunolojik reaksiyonlar ya da genetik materyalin tespitine dayalı bazı hızlı test sistemleri de geliştirilmiştir. Bu sistemler; BAX sistemi, GENE-Trak, PROBILIA, VIDAS, VITEK, VITEK II, *Listeria* VIA, Reveal (*Listeria*), ClearView (Oxoid), Singlepath (Merck), Pathelert (Merck), Assurance EIA (*Listeria*), EIAFOSS *Listeria*, API, Microbact, Malthus, Microlog ve MIS’dir.

### Latex Aglütinasyon Testi

Mikrobiyal ve viral enfeksiyonları, otoimmün hastalıkları, hormonları, ilaçları veya serum proteinlerini tespit etmek amacıyla lateks aglütinasyon testi kullanılır. Bu test, spesifik antijeni içeren bir örneğin, lateks partiküllerinin yüzeyi üzerine kaplanmış bir antikorla karşılaştığında aglütinasyon oluşturması prensibine dayanır (Aryal, 2018).

Matar ve diğ. (1997), Listeriolizin O antikorlarını kullanarak yaptıkları latex aglütinasyon testi ile 208 gıda örneğinin 17’sini *L. monocytogenes* pozitif bulmuşlardır.

### Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

Bu teknik, belirli bir enzime kovalent bağlanan antikorların veya antijenlerin örnekle kompleks hale getirilmesi ardından enzime özgü substrat ilave edilerek enzim aktivitesinin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir. Bu yaklaşımın en büyük avantajı, antikorların veya

antijenlerin, ilgilenilen proteine spesifik olarak cevap verecek şekilde üretilebilmesidir, böylece yalnızca bu proteinin tanınmasını mümkün kılar (Telli, 2012).

Palumbo ve diğ. (2003) tarafından, insanlardan, çevreden ve gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarını serotiplendirmek için ELISA metodu kullanılmıştır.

### **İmmünomanyetik Ayırma (IMS)**

IMS tekniğinde, karışık bir populasyondan hedef bakteriyi izole etmek amacıyla, antikorla kaplanmış manyetik partiküller kullanılır. IMS, diğer bakterilerin gelişiminin baskılanması ve hedef bakterinin gelişimine izin vermesi yönüyle, geleneksel kültür yöntemindeki selektif zenginleştirme aşamasıyla benzerlik göstermektedir. Ayırma yöntemi iki temel kısımdan oluşur. Hedef hücreleri içeren süspansiyon immünomanyetik partiküllerle karıştırılır ve 60 dk.'lık inkübasyonun ardından manyetik ayırıcılarla ayrılır. İkinci adımda manyetik karışım, istenmeyen kontaminantları uzaklaştırmak için tekrar tekrar yıkanır ve manyetik partiküllere bağlanan hedef hücreler ileriki çalışmalarda kullanılır (Mandal ve diğ., 2011).

Ueda ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, IMS yöntemiyle *L. monocytogenes*'in, hızlı ve kesin olarak tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. Kevenk ve Gülel (2015), IMS tekniğiyle inceledikleri 20 beyaz peynir örneğinin birinde *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

### **2.7.3. Genotipik Yöntemler**

#### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

PZR, bir örnekte bulunan spesifik DNA dizilerinin üssel olarak amplifiye edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Tamponlu PZR karışımının ana bileşenleri oligonükleotit primerleri, deoksiribonükleotit trifosfatlar, çoğaltılacak kalıp DNA ve bir termostabil DNA polimerazdır. Primerler, hedef dizinin her iki tarafına bağlanarak çoğaltılacak bölgenin belirlenmesi amacıyla tasarlanmıştır. PZR reaksiyonları 3 adımdan oluşur; çift zincirli kalıp DNA'nın denatürasyonu, hedef kalıbın tamamlayıcı bölgelerine primerlerin bağlanması ve uzama olarak da adlandırılan, yeni DNA'nın primer-yönlendirmeli sentezi. Her döngüde üretilen DNA fragmentleri bir sonraki amplifikasyonda kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde kalıp sayısı 2 katına çıkar ve bu da ürünün üssel şekilde birikimine yol açar (Norton, 2002).

Gouws ve Liedemann (2005), gıda ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığını araştırdıkları çalışmada incelenen gıda örneklerinin, % 44'ünün RAPID'L.mono agar'da şüpheli *L. monocytogenes* olarak izole edilmesine rağmen, PZR uygulamasının ardından yalnızca % 37'sinin *L. monocytogenes* olduğunu saptamışlardır.

Gıda örneklerinde mikroorganizmaların tespiti için birçok PZR prosedürü geliştirilmesine karşın altın standart olarak geleneksel kültür yöntemi kullanılmaktadır.

### **DNA Mikrodizilimi**

DNA'nın araştırılması amacıyla geliştirilen yöntemlerden biri olup gen ifade profilleri oluşturmak, DNA analizi, polimorfizm ve mutasyon analizleri için kullanılır. Yöntem bir cam, plastik veya silikon üzerine RNA sentezinde kullanılan DNA hedef dizilimlerinin tutturulduğu, cDNA'nın floresan boya ile işaretlenmesinin ardından tutturulmuş DNA ile bir araya getirilerek işleme alınmasını kapsamaktadır (Özçelik, 2003).

*Listeria* analizinde, mikrodiziler, *L. monocytogenes*'in farklı suşları arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için kullanılmış ve bu suşların genom içeriğindeki soy ve serotipe özgü farklılıklarının tanımlanmasına olanak tanımıştır (Call ve diğ., 2003). *L. monocytogenes*'in neden olduğu enfeksiyona karşı oluşan konak hücre yanıtları da mikroarray teknolojisi kullanılarak tanımlanmıştır (Cohen ve diğ., 2000).

### **Floresan Yerde Hibridizasyon (FISH)**

FISH yöntemi, rRNA'nın floresan işaretli probalar ile işaretlenmesi ve floresan mikroskopunda görüntülenmesi prensibine dayanan nükleik asit temelli hızlı bir yöntemdir. FISH yönteminde kültür ve fenotipik özelliklerin belirlenmesi gerekmeden mikroorganizmaların kısa sürede tanısı yapılabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğünün yanısıra yöntemin ucuz, pratik ve kolay olması ve yaklaşık 2-2.5 saat gibi kısa sürede tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlaması avantajları arasındadır. FISH yöntemi temel olarak fiksasyon, hibridizasyon, yıkama ve tespit işlemlerini içeren 4 adımdan oluşur (Börekçi, 2010).

Fuchizawa ve diğ. (2007), *Listeria* genomuna ait 23S rRNA gen bölgesinden tasarladıkları ve işaretledikleri Lis-1400 probunu kullanarak, FISH yöntemiyle inceledikleri çeşitli bakteriler

arasında yalnızca *Listeria* türlerinde floresan ışıma gözlediklerini belirtmiş ve probun *Listeria* türlerine karşı hayli özgül olduğunu rapor etmişlerdir.

### **Darbeli Alan Jel Elektroforezi (PFGE)**

Agaroz içine gömülü olan bakteri hücresinden izole edilen genomik DNA'nın uygun restriksiyon endonükleaz enzimi (RE) ile kesimi sonucu oluşan profillerin belirlenmesi ve yorumlanması esasına dayanır. Dalgalı, vuruşlu, dikey elektrik alanlar jele uygulanarak büyük DNA moleküllerinin ayrıştırılması sağlanmaktadır. (Türe ve Altınok, 2013). Bu yöntem, *L. monocytogenes*'in suş benzerliklerinin ve gıda ve gıda işleme tesislerinde varsayılan transfer yollarının izlenmesinde oldukça faydalıdır (Dalmasso ve Jordan, 2014).

Hamdi ve diğ. (2007), Cezayir'de çiftliklerden satın aldıkları sütler ve süt tankerlerinden izole ettikleri 11 *L. monocytogenes* suşunu PFGE yöntemiyle genotiplendirmişlerdir. Zhang ve diğ. (2007), çiğ tavuk etleri ve yenilmeye hazır et ürünlerinden elde edilen 167 *L. monocytogenes* suşunu PFGE yöntemiyle genotiplendirmişlerdir. İrlanda'da yapılan bir çalışmada, insan, hayvan, gıda, ve çevre kaynaklı 222 *L. monocytogenes* izolatu arasındaki ilişkiyi incelemek için PFGE metodu kullanılmıştır (Fox ve diğ., 2012).

### **Ters Transkripsiyon-PZR (RT-PZR)**

RNA PZR olarak da adlandırılan Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) 2 aşamalı olup, RNA'dan Revers transkriptaz enzimi kullanılarak yapılan cDNA sentezi ve cDNA'nın PZR yöntemiyle çoğaltılması aşamalarını kapsayan, gen anlatım analizlerinin yapılabilirdiği hassas ve hızlı bir yöntemdir (Aras, 1992; Okutucu ve Pehlivan, 2003).

Rudi ve diğ. (2005), Gouda peynirinin yüzeyinde kontaminasyona neden olan canlı, ölü ya da canlı fakat kültüre edilemeyen (VBNC) *L. monocytogenes* varlığını tespit etmek amacıyla RT-PZR yöntemini kullanmıştır.

### **Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)**

PZR yöntemiyle çoğaltılan kesilmiş DNA parçalarının belirlenmesini sağlayan DNA parmak izi yöntemidir. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan farklı DNA parçalarından bazılarının seçici olarak çoğaltılması prensibine dayanan bir genotipleme

yöntemidir. RAPD ve RFLP'ye kıyasla bu yöntemle daha fazla sayıda lokus incelenebilir ve bu lokuslar hakkında daha kısa bir süre içinde bilgi edinilebilir (Aras, 1992).

Guerra ve diğ. (2002) 84 *L. monocytogenes* izolatu ile yaptıkları çalışmada, AFLP yönteminin *L. monocytogenes*'in epidemiyolojik tiplendirmesinde kullanışlı olabileceğini belirtmiştir.

### **Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Restriksiyon enzimleriyle belirli bir DNA bölgesinin kesilmesi ve elde edilen DNA parçalarının agaroz jel elektroforezi ile ayrılması yoluyla, parçaların sayısının ve yaklaşık boyutlarını belirlenmesi işlemidir. Restriksiyon haritalarının oluşturulmasında, genetik hastalıkların tanısında, rekombinat DNA elde edilmesinde, Babalık testleri ve soy ağacı incelemelerinde, popülasyon polimorfizmlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Kolören ve diğ., 2017; Phillips, 2019).

Swaminathan ve diğ. (1996), 22'si epidemiyolojik olarak ilişkili olmak üzere 80 *L. monocytogenes* suşunu RFLP yöntemi ile tiplendirmişlerdir. Jeffers ve diğ. (2001), insan ve hayvan vakalarından elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarını, *hly* ve *actA* virülans genlerinin RFLP yöntemi ile tiplendirmesi yoluyla tanımlamıştır.

### **Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)**

Rastgele dizinin kısa sentetik primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA parçalarıdır. Bu oligonükleotitler, hem forward hem de reverse primer olarak görev yapar ve genellikle 1-10 bp'lik genomik bölgelerden gelen parçaları eşzamanlı olarak çoğaltma yeteneğindedirler. Çoğaltılan parçalar agaroz jel elektroforezi ile birbirinden ayrılır ve belli boyutlardaki bantların varlığı veya yokluğu incelenerek polimorfizmler tespit edilir (Van Treuren, 2019).

Yapılan bir çalışmada, sebze işleme tesisindeki dondurulmuş, yenmeye hazır sebze örnekleri ve tesis ortamından alınan örnekler incelenmiş ve *Listeria* spp. yayılımının kökeni ve rotalarını araştırmaya yardımcı olmak için RAPD metodu kullanılmıştır (Aguado ve diğ., 2004).

### **Ribotiplendirme**

Ribotipleme, bakteri suşlarını ayırt etmek için özgün DNA dizilerinden faydalanan moleküler bir tekniktir. Genomik DNA, restriksiyon enzimleri tarafından belirli bölgelerden kesilir

böylece farklı uzunluklarda DNA parçaları meydana gelir. Farklı bakteri suşları, farklı yerlerde, restriksiyon enzimlerine özgü "kesim bölgelerine" sahip olduğu için, her suş benzersiz bir DNA parçası oluşturur.

Genellikle 16S ve 23S *rRNA* genlerinden gelen DNA parçaları karşılaştırılır. DNA parçalarını birbirinden ayırmak için agaroz jel üzerinde yürütülür. 16S ve 23S *rRNA* genlerini görüntülemek için, sadece bu genlere özgü bir proba hibridizasyon yapılır. DNA parçalarının bantlanma düzeni "ribotip" olarak adlandırılır (Anon., 2019).

Gendel ve Ulaszek (2000), somon füme örneklerinden elde edilen 72 *L. monocytogenes* izolatının suş dağılımındaki değişiklikleri incelemek için ribotiplendirme yöntemini kullanmıştır.

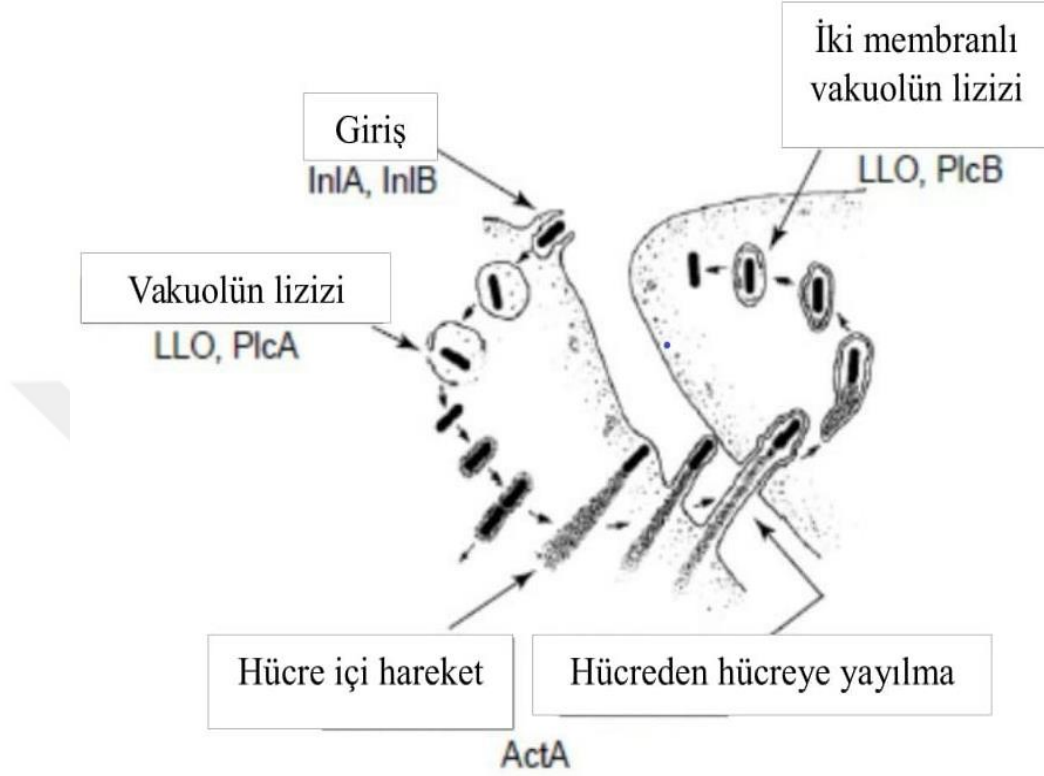
## 2.8. LISTERIA MONOCYTOGENES'İN PATOGENEZİ

### 2.8.1. Hücreye Alınış ve Üreme

Patojenik *Listeria* türlerinin en önemli özelliklerinden biri enfekte olmuş konağın bağırsak, kan-beyin ve fetoplasental bariyer dahil olmak üzere endotel ve epitelyal bariyerlerini kırabilmeleridir. *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*, fagositik ve fagositik olmayan hücreleri istila edip çoğalabilen fakültatif hücre içi parazitlerdir. Bakterinin ökaryotik hücreye girişi ve zara bağlı bir vakuol içine dahil edilmesi, bakteri yüzeyinde bulunan, InlA ve InlB internalinleri olmak üzere iki protein ve bu proteinlere özgü hücre reseptörü olan E-kaderin ve c-Met tarafından tetiklenir.

*L. monocytogenes*'e özgü en önemli özellik, ökaryotik konak hücrelerde hayatta kalma ve çoğalma ve hücreden hücreye yayılmayı uyarma kabiliyetidir. Bakterinin hücre içi yaşam döngüsünden sorumlu olan genler, *prf* ve *Idh* arasındaki kromozomun bir lokusu içinde yer alan *Listeria* patojenite adası 1 (LPI-1)'de bulunur. Por oluşturan bir hemolitik toksin olan listeriolizin (LLO) ve phosphatidylinositol-specific phospholipase C (Plc-A) gibi 2 adet salgılanmış proteinin yardımıyla liziz edilen vakuolün ardından, bakteri sitozolde çoğalır. Bakteriyel yüzey proteini ActA, aktin bazlı hücre içi ve hücreler arası hareketlere ve son olarak, plazma zarı ile temas ettiğinde bakterinin psödopod benzeri çıkıntılar oluşturma yoluyla komşu hücreye giriş yapıp hücreden hücreye yayılmasına yol açar. İki plazma zarının parçalanmasına bakterinin ikinci hücreye bulaşmasını sağlayan phosphatidylcholine-specific phospholipase C

(PlcB) ile birlikte LLO aracılık eder. *L. monocytogenes*'in hücre içi yaşam döngüsü aşamaları Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Cabanès ve diğ., 2002; Cossart ve diğ., 2003).



**Şekil 2.2:** *Listeria monocytogenes* tarafından enfekte edilen konakçı hücrelerin enfeksiyon süreci (Cossart ve diğ., 2003).

### 2.8.2. Listeriozis Tanısı

İnvaziv listeriozis tanısının, *L. monocytogenes*'in kan veya beyin-omurilik sıvısı gibi steril bir bölgeden izole edilmesine bağlı olduğu bildirilmiştir. Organizma Gram boyamada bir difteroid kontaminantı ile karıştırılabileceğinden, tam bakteriyolojik değerlendirme yapılması önerilmiştir. Dışkı örneklerinden organizmanın geri kazanımının, ateşli gastroenterit şüphesi varlığında yararlı olduğu, ancak dışkının kendisinden yapılan izolasyonun, asemptomatik taşımanın ortaya çıkması nedeniyle tanısal olmadığı belirtilmiştir.

Steril bölge örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes* bakterilerinin, rutin olarak kullanılan besiyerlerinde genellikle iyi geliştiği gözlenmiştir. Örnek % 5 koyun, at veya tavşan kanı içeren Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri üzerine doğrudan ekilmiş ve organizma genellikle 36 saat içerisinde tanımlanmıştır. Organizmanın, çok sayıda rakip mikroorganizma içeren dışkı örnekleri gibi kaynaklardan izole edilmesi daha zor olduğundan örneklerin *Listeria* seçici

besiyerine ekimleri yapılmadan önce *Listeria* spp. için seçici zenginleştirilme yapılması gerekmektedir (Painter ve Slutsker, 2007). Bazı örneklerde *L. monocytogenes*'in belirlenmesinde, floresan antikor metotları veya PZR teknolojisi ile birleştirilmiş DNA problemleri kullanılması yararlı olduğu tespit edilmiştir. Listeriolysin O antikoruna yönelik deneyler de, bazı epidemiyolojik araştırmalarda yararlı olmuş (Dalton ve diğ., 1997) ve merkezi sinir sisteminin kültür-negatif listeriosisinde tanıyı desteklemek için kullanılmıştır (Gaillard ve diğ., 1992).

### 2.8.3. Listeriosis Tedavisi

*Listeria* türleri içinde yalnızca *L. monocytogenes*'in genellikle insanlarda patojenik olduğu ve menenjitte; yeni doğanlarda, immün bağışıklığı yetersiz hastalarda ve yaşlılarda sepsis gibi ciddi enfeksiyonlara ya da düşüğe neden olabildiği bildirilmiştir (Gellin ve Broome, 1989; Farber ve Peterkin, 1991; Schuchat ve diğ., 1991b; Lorber, 1997;). Buna rağmen insan listeriosisi yalnızca sporadik olarak (Farber ve Peterkin, 1991; Schuchat ve diğ., 1991) meydana gelir ancak son yirmi yılda çeşitli salgınlar gözlemlenmiştir (Gellin ve Broome, 1989; Schuchat ve diğ., 1991b). Günümüzde listeriosis'e yakalanmanın başlıca kaynağının gıda kaynaklı bulaşma olduğu tespit edilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991; Schuchat ve diğ., 1991b; Pinner ve diğ., 1992). Etkili antibiyotik tedavilerine rağmen % 30'luk bir ölüm oranına sahip olan listeriosis halk sağlığını tehdit eden bir problem olarak görünmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Jones ve MacGowan, 1995). Antibiyotiklere karşı direnç gösteren ilk *L. monocytogenes* suşları 1988 yılında bildirilmiştir (Poyart-Salmeron ve diğ., 1990). Suşlar, ml başına >10 µg tetrasikline dirençlidir. 1988 yılında Fransa'da çoklu direnç gösteren ilk *L. monocytogenes* suşu izole edilmiştir (Poyart-Salmeron ve diğ., 1990). O zamandan bu yana, gıdalardan, sporadik vakalardan ya da çevreden izole edilen *Listeria* spp. suşlarının bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmıştır (Slade ve Collins-Thompson, 1990; Facinelli ve diğ., 1991; Facinelli ve diğ., 1993; Hadorn ve diğ., 1993; Franco ve diğ., 1994; Charpentier ve diğ., 1995; Charpentier ve Courvalin, 1999). Genel olarak *L. monocytogenes* izolatlarının diğer *Listeria* spp. suşları gibi sefalosporinler ve fosfomisin dışında geniş bir antibiyotik çeşidine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Hof, 1991; Hof ve diğ., 1997). Listeriosis için tercih edilen tedavi, aminoglikozit diğer bir deyişle gentamisin ile birlikte uygulanan ampicilin ya da penisilin G'dir (Espaze ve Reynaud, 1988; Nunez-Poulsen ve diğ., 1988; Gellin ve Broome, 1989; Boisivon ve diğ., 1990; McLauchlin ve diğ., 1991; Franco ve diğ., 1994; Jones ve MacGowan, 1995;

Lorber, 1997). Klinik, gıda ve çevresel kaynaklardan elde edilen çoğu izolat, Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkili olan antibiyotiklere karşı duyarlıdır.

İnsan listeriozis vakalarının tedavisinde tek başına veya kombinasyon halinde  $\beta$ -laktam ve aminoglikozit antimikrobiyal ilaçları kullanılmakla birlikte, penisiline alerjisi olan hastalarda listeriozis tedavisi için trimetoprim-sülfametoksazol kombinasyonu kullanılmaktadır (Hof, 2003; Jones ve Macgowan, 1995).

*L. monocytogenes*'in hücreler içinde gelişmesi ve hayatta kalması, muhtemelen bakteriyostatik ilaçlara verilen zayıf yanıtı ve penisiline yavaş yanıtı açıklamıştır. Kloramfenikol veya tetrasiklin gibi bakteriyostatik ilaçlar tedavideki başarı oranları düşük olduğundan tavsiye edilmemişlerdir (Southwick ve Purich, 1996). Sefalosporinler de *Listeria*'nın penisilin bağlayan proteini için düşük bir afiniteye sahip oldukları için tedavide önerilmemektedir (Vicente ve diğ., 1990).

2 haftalık penisilin tedavisinden sonra bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hastalığın tekrarlandığı rapor edilmiştir (Watson ve diğ., 1978). Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların birçoğunda enfekte hücreleri temizleme yeteneği azaldığı için, 3 ila 6 hafta boyunca antibiyotik tedavisi uygun görülmüştür (Armstrong ve Fung, 1993). Listeriozis için tedavi süresinin, gebelikte 2 hafta, yenidoğan listeriozisi için 2-3 hafta, menenjit ve bakteriyemi geçiren bağışıklığı baskılanmamış yetişkinler için 2-4 hafta ve endokardit gibi karmaşık enfeksiyonlar için daha uzun olduğu bildirilmiştir.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER

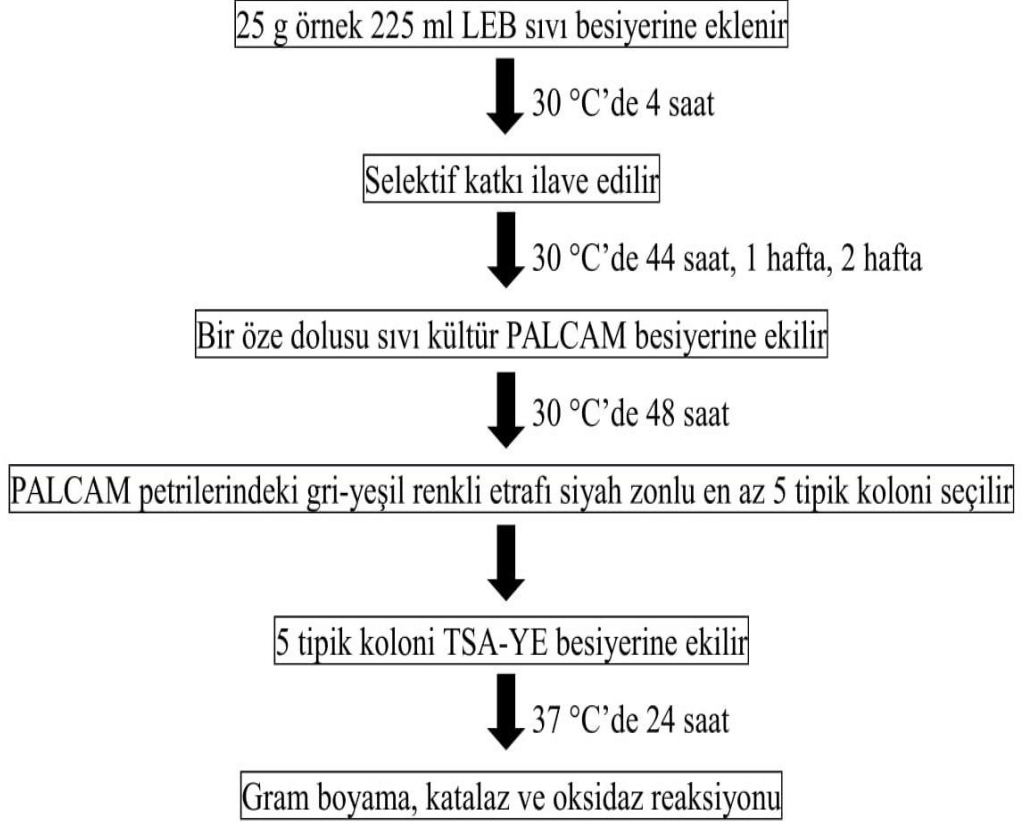
Çalışmamızda *L. monocytogenes* RSKK 475 (Refik Saydam Kültür Koleksiyonu, Ankara), LM 32, LM K6/1H, LM K9/3H (Abant İzzet Baysal Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı, Bolu) ve *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterileri kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak *L. monocytogenes* bakterilerinde, herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri ile *L. monocytogenes* olduğu doğrulanmış bakterilerin Tryptone Soy Agar Yeast Extract (TSA-YE) besiyerinde 37 °C’de 24 saatlik taze kültürleri, % 20’lik gliserin içeren tampon çözelti içinde -86 °C’de saklanmıştır.

#### 3.2. BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLASYONU

Çalışmamızda beyaz peynirden *L. monocytogenes* izolasyonu için Food and Drug Administration (FDA) standart kültür metodu kullanılmıştır (FDA, 1988). Kültür metodu üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle birincil zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Birincil zenginleştirmede amaç çevresel faktörlerden ya da peynir üretimi esnasında zarar görmüş bakterilerin onarılmasını ve tekrar canlandırılmasını sağlamaktır. Sonraki adımda, ikincil zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. *Listeria* spp. dışındaki mikroorganizmaların gelişimlerini yavaşlatmak ya da engellemek ikincil zenginleştirme işlemi yapılmış ve ortamda bulunan rekabetçi floranın çoğalması sınırlandırılarak *Listeria* bakterilerinin gelişimlerine ortam sağlanmıştır. Sonraki adım olan seçici izolasyonda ise saf *Listeria* türlerinin izole edilebilmesi için seçici katı besiyerine sık ekim yöntemi ile yayma ekim işlemi uygulanmıştır.

İstanbul ili içerisindeki farklı semtlerden temin edilen 119 adet pastörize süttten yapılmış beyaz peynir örneği laboratuvara getirilerek incelenmiştir. Örnekler incelenene kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Birincil zenginleştirme amacıyla 25 g gıda örneği 225 ml *Listeria* Enrichment Broth’a eklenip stomacherda 2 dk karıştırılmış ve 30 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde kültür, Akriflavin hidroklorid, nalidiksik asit, sikloheksimit içeren selektif katkı ilave edilerek inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyonun 48. saatinde, 1. ve 2. haftasında bu sıvı kültürlerden PALCAM besiyerine azaltma yöntemi ile ekim

yapılmıştır. 30 °C’ de 48 saat inkübasyon sonunda seçici katı besiyerinde gelişen gri-yeşil renkli etrafı siyah zonlu *Listeria* açısından şüpheli olduğu düşünülen 5 tipik koloniden TSA-YE besiyerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyon yapılarak saf kültürler elde edilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1:** Peynir örneklerinden *Listeria* cinsi bakterilerin izolasyonu.

### 3.3. *LISTERIA* CİNSİ BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

TSA-YE besiyerinde üreyen *Listeria* şüpheli koloniler öncelikle Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri açısından incelenmiştir. Gram pozitif çomak veya kokobasil, oksidaz negatif, katalaz pozitif, izolatlar *Listeria* şüpheli olarak değerlendirilmiştir. *Listeria* şüpheli izolatların Sulfate Indole Motility (SIM) besiyerinde hareket, hemoliz, nitrat redüksiyonu, MR (Metil Red)-VP (Voges–Proskauer), karbonhidrat fermentasyonu ve Christie, Atkins ve Munch-Peterseon (CAMP) gibi biyokimyasal testler açısından değerlendirilmiştir ve böylece tür bazında tanımlamaları yapılmıştır.

### 3.3.1. Gram Boyama

TSA-YE besiyeri üzerinde üreyen tek düşmüş koloniden öze ile alınan örnek alev ile steril edilmiş lam üzerinde fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde yayılmıştır. Yayılan bakteri süspansiyonunun oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Preparatların alt yüzeyi 3 defa alevden geçirilerek fiziksel tespit uygulaması yapılmıştır. Hazırlanan preparat kristal viyole ile 1 dk boyanmış, süre sonunda distile suyla yıkanmasının ardından 1 dk lugol uygulanmıştır. Preparata saf etil alkol ile 10-15 sn dekolorizasyon işlemi uygulanıp distile suyla yıkanmış ve sulu fuksin ile 30 sn boyanmıştır. Son aşamadan sonra yıkanan preparatlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra mikroskopta 100'lük objektifte immersiyon yağı yardımıyla incelenmiştir. Gram boyama sonucunda mor renkle boyanmış Gram pozitif, kokobasil ya da çomak şeklinde görülen bakteri hücreleri *Listeria* şüpheli olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

### 3.3.2. Katalaz Testi

Platin öze yardımı ile şüpheli *Listeria* kolonisinden bir miktar alınarak yüzeyi 3 kez alevden geçirilerek steril edilmiş temiz bir lamın yüzeyine yayılmıştır. Yayılan kültür üzerine % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ORO, Türkiye) solüsyonundan birkaç damla damlatılarak gaz çıkışı olup olmadığı açısından incelenmiştir. Hava kabarcıklarının çıkışı katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

### 3.3.3. Oksidaz Testi

*Listeria* şüpheli koloniden platin öze yardımı ile bir koloni filtre kağıdı üzerine sürülmüştür. 1-2 damla oksidaz ayırıcı damlatılıp 10-15 saniye içinde filtre kağıdı üzerinde meydana gelen renk değişimi incelenmiştir. Mor renk oluşumu pozitif, renk değişiminin gözlenmemesi negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

### 3.3.4. Hareket Testi

İğne uçlu öze yardımı ile şüpheli *Listeria* kolonilerinden SIM besiyerine batırma yöntemi ile ekim yapılmış ve 25 °C'de 2-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda şemsiye tarzındaki üreme pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

### 3.3.5. Nitrat Redüksiyon Testi

Nitrate Broth içeren tüplere *Listeria* şüpheli kolonilerden ekim yapılmış 35 °C'de 2-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci sonunda üremenin olduğu tüplere 0.2 ml A çözeltisi ve

sonra 0.2 ml B çözeltisi eklenmiştir. Çözeltilerin besiyeri yüzeyinde temas ettiği kısımda kırmızı renk oluşması nitratin nitrite indirgenmesi dolayısıyla nitrat redüksiyon testi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kırmızı rengin oluşmadığı türlere çinko tozu ilave edilerek 5 dk. beklenmiştir. Bekleme süresi sonunda kırmızı-mor renk oluşması nitratin hala mevcut olduğu ve nitrite dönüşmediği şeklinde değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

### 3.3.6. Metil Kırmızısı Testi

Clark-Lubs besiyerine *Listeria* şüpheli kolonilerin ekimi yapılmış ve 37 °C’de 2-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışık asit fermentasyonunu tespit etmek için dört damla Metil Kırmızısı solüsyonu damlatılmıştır. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak değerlendirilmiştir (Feng, 1998).

### 3.3.7. Voges Proskauer Testi

Clark-Lubs besiyerine *Listeria* şüpheli kolonilerin ekimi yapılmış ve 37 °C’de 2-7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürün üzerine nötral bir ürün olan asetoin varlığını belirlemek amacıyla 0.6 ml  $\alpha$ -naftol çözeltisi ve 0.2 ml KOH ayırıcı konulmuştur. 10 dk. sonra, oluşan pembe renk oluşumu pozitif sarı renk oluşumu ise negatif olarak kabul edilmiştir (Feng, 1998).

### 3.3.8. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Steril %5’lik mannitol, ksiloz, ramnoz, riboz ve  $\alpha$ -metil-D-mannosit karbonhidrat çözeltilerinden, 9 ml steril karbonhidrat besiyerine 1 ml aktarılmıştır. *Listeria* şüpheli koloniler karbonhidrat besi ortamlarına ekildikten sonra 35 °C’de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüp içindeki sıvı besiyerinin renginin sarıya dönmesi, karbonhidratın bakteri tarafından kullanıldığını göstermiş, reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

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

Bu test için tek kullanımlık Petri kutuları içinde satılan % 5’lik koyun kanlı TSA besiyeri (TIP KİM SAN) kullanılmıştır. Koyun kanlı Agar üzerine *S. aureus* ATCC 25923 bakterisinin taze kültürü Petri kutusunun ortasına 5 cm uzunluğunda bir çizgi oluşturacak şekilde ekilmiştir. *Listeria* şüpheli izolatlar, *S. aureus* ekim çizgisine temas etmeyecek ve bu çizgiye dik olarak yaklaşık 1 cm uzunluğunda bir şerit oluşturacak şekilde ekilmiştir. 35 °C’de 24-48 saat yapılan inkübasyonun ardından ok başı şeklinde görülen hemoliz reaksiyonu ile CAMP reaksiyonu pozitif kabul edilmiştir (Hitchins, 1998).

### 3.3.10. Hemoliz Testi

Bu test için % 5'lik koyun kanlı besiyerleri kullanılmıştır. İğne uçlu öze ile alınan *Listeria* şüpheli izolatlar besiyeri tabanına yakın fakat tabana değmeyecek şekilde batırma yöntemiyle ekim yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ekim çevresinde şeffaf renkte bir zon oluşturan bakteriler  $\beta$ -hemoliz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hitchins, 1998).

## 3.4. LISTERIA CİNSİ BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ

### 3.4.1. Kullanılan Antibiyotikler

*Listeria* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarını tespit etmek için kullanılan antibiyotik diskleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1:** Antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan antibiyotikler.

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

### 3.4.2. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Beyaz peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* cinsi bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi için, 37 °C’de 24 saat TSA-YE besiyeri üzerinde üretilen taze kültürler kullanılarak McFarland No 0.5 bulanıklık tüplerine göre hazırlanan bakteri süspansiyonları kullanılmıştır.

### 3.4.3. Antibiyotik Duyarlılık Deneyi

Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları NCCLS (Ulusal Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü M31-A3/2010) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak Kirby Bauer antibiyotik disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla, McFarland No 0.5 bulanıklık tüplerine göre hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100 µl alınarak Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerleri üzerine aktarılmış ve yayma ekim yöntemi ile yayılmıştır. Ardından Petri kutuları oda sıcaklığında 5 dk tutulduktan sonra her bir Petri kutusuna birbirlerine eşit mesafede 3 adetten fazla olmayacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesinin ardından Petri kutuları 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek ortalamaları alınmıştır. Elde edilen zon çapları, NCCLS (M31-A3/2010)’deki standartlar ile karşılaştırılmış ve izolatların antibiyotiklere karşı dirençli, yarı duyarlı veya duyarlı olacak şekilde duyarlılık sınıflandırılması sağlanmıştır.

## 3.5. *LISTERIA* CİNSİ BAKTERİLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ

### 3.5.1. DNA İzolasyonu

Kültür yöntemiyle izole edilen *Listeria* şüpheli bakterilerin DNA izolasyonu IDPURE™ Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit (IDLabs) kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonu üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Cam tüpler içinde 10 ml hazırlanan TSB-YE besiyerine şüpheli bakteriler ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. 1.5 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine aktarılan 1’er ml bakteri kültürü 10000 g’de 2.20 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak dipte kalan pelet üzerine önceden hazırlanmış 500 µl steril soğuk Tris-EDTA (TE; pH 8.0) tamponu eklenmiştir. 10000 g’de 2.20 dk. santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılmış ve çökelti 180 µl lizozim solüsyonu ile çözülmüştür. Hazırlanan tüpler kuru blok ısıtıcısında (Biosan, Letonya) 37 °C’de 30-60 dk. inkübasyona bırakılmıştır. 20 µl

RNase A eklenip vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sona erdiğinde tüplere kit içinde yer alan CL tamponundan 200 µl ve 20 µl Proteinaz K (2 mg/150 µl) eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. 56 °C’de 30 dk. inkübasyon yapılan karışımın üstüne 200 µl saf etanolden eklenerek pipetaj yapıp kitin içeriğinde bulunan 2 ml’lik toplama tüpüne aktarılmıştır. 12000 g’de 2.20 dakika santrifüj edilen toplama tüpünün altında toplanan sıvı atılarak, 37 °C’de bekletilen kit içeriğindeki CW1 yıkama solüsyonundan 500 µl ilave edilmiştir. 12000 g’de 2.20 dk. santrifüj edildikten sonra tekrar toplama tüpünün altındaki sıvı atılmış ve 37 °C’de bekletilen 500 µl CW2 yıkama solüsyonu eklenmiştir. 12000 g’de 2.20 dakika santrifüj edilen tüpler hiçbir ekleme yapılmaksızın 12000 g’de 2.20 dk. daha santrifüj yapılmıştır. Tüpün altında toplanan sıvı atılarak steril 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünün içine ayrıştırma kolonu aktarılmış ve toplama tüpü atılmıştır. Ayrıştırma kolonları kapakları açık bir şekilde oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra önceden 60 °C’lik su banyosunda ısıtılmış CE Buffer elüsyon tamponundan 50 µl eklenmiştir. Bu şekilde 5 dk. oda sıcaklığında bekletilen tüpler 12000 g’de 6.20 dk. santrifüj edilmiştir. Elüsyon aşamasında ayırma kolonu üzerinde bağlı durumdaki DNA serbest hale geçmiş ve kolonun altındaki mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Elde edilen *Listeria* bakterilerine ait DNA’lar, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) deneyi için kullanılabilecek kadar -20 °C’de saklanmıştır.

### 3.5.2. DNA’nın Agaroz Jel Elektroföresi ile Görüntülenmesi

DNA örneklerinin miktarı, semi kuvarz küvetler içerisinde 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek kaydedilmiştir. 260/280 oranının 1.8 olduğu *Listeria* bakterilerine ait DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir. -20 °C’de saklanan DNA örneklerine agaroz jel elektroföresi yöntemi uygulanmıştır. TAE (Tris-EDTA Asetik asit) solüsyonu ile hazırlanan % 0.8’lik agaroz jel, mikrodalgada kaynamamasına dikkat edilerek eritildikten sonra 45 °C’ye kadar soğuması beklenerek içerisine 0.33 µl GelRed (Biotium) floresan boya eklenmiş ve içerisinde uygun ölçüde tarakların yerleştirildiği jel dökme tepsisine dökülmüştür. Yaklaşık olarak 15-20 dakika süre içerisinde donan agaroz jel kullanıma hazır hale gelmiştir. Agaroz jel üzerinde kuyucuk oluşturmak için kullanılan taraklar, dikkatli bir şekilde çıkartıldıktan sonra, jel tepsi içerisinde 1x TAE bulunan elektroföres tankına yerleştirilmiştir. Agaroz jelin üzerine örtecek kadar tampon ilave edildikten sonra; 4 µl DNA, 1 µl 6x jel yükleme boyası (Biomatik) ile karıştırılıp kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Pozitif kontrol olarak daha önceden elde edilip -20 °C’de saklanan *L. monocytogenes* RSKK 475 standart bakterisine ait DNA örneği, negatif kontrol olarak ise ultra saf su kullanılmıştır. DNA markerı olarak 1 kb DNA

Ladder (Bioline) kullanılmıştır. 80 volt'da 80 dk. yürütülen jel, süre sonunda sistem kapatılarak, UV görüntüleme sisteminde (Kodak GL 1500, ABD) incelenmiştir.

### 3.5.3. *Listeria* spp. İzolatların PZR Uygulaması ile Doğrulanması

#### 3.5.3.1. Kullanılan Primerler

Standart *L. monocytogenes* RSKK 475 bakterisi ile peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* bakterilerine, *iap* ve *hlyA* genlerini tespit etmek için PZR yöntemi uygulanmıştır. Deneyde kullanılan *iap* ve *hlyA* gen bölgesine ait primerler üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. *Listeria* spp. olarak tanımlanan suşlardaki *iap* ve *hlyA* genlerini tespit etmek amacıyla kullanılan primerler Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.2:** *Listeria* spp. cinsi bakterilerin doğrulanması için kullanılan primerler.

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

#### 3.5.3.2. PZR Yöntemi

PZR karışımı Bioline markasına ait MyTaq™ Mix ile hazırlanmıştır. 0.2 ml hacimli mikrotüpler içerisine her bir reverse ve forward primerden 2.5 µl (10 µM), 2 µl (100 nmol) kalıp DNA, 5 µl MyTaq Reaction Buffer, 0.125 µl MyTaq DNA polimeraz eklendikten sonra steril ultra saf su ile son hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır.

Pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* RSKK 475 kalıp DNA'sı, negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılarak tüm işlemler tekrar edilmiştir.

0.2 ml hacimli mikrotüpler içerisinde hazırlanan örnekler zaman kaybetmeden Thermal Cycler (TC-PLUS, Techne, İngiltere) cihazına yerleştirilmiştir. Tablo 3.3'te, *hly* ve *iap* genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları gösterilmiştir.

**Tablo 3.3:** *Listeria* spp. cinsi bakterilerde *iap* ve *hlyA* genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

| Döngü                             | Sıcaklık                               | Süre   |
|-----------------------------------|----------------------------------------|--------|
| Başlangıç denatürasyonu (1 döngü) | 95 °C                                  | 1 dk.  |
| Denatürasyon                      | 95 °C                                  | 15 sn. |
| Bağlanma                          | <i>hlyA</i> : 65 °C <i>iap</i> : 55 °C | 15 sn. |
| Uzama                             | 72 °C                                  | 10 sn. |
| Son Uzama (1 döngü)               | 72 °C                                  | 5 dk.  |

Elde edilen PZR ürünleri elektroforez işlemi için % 1.2'lik agaroz jel üzerinde 90 volt akımda 45 dakika yürütülmüştür. Elde edilen PZR ürünlerinin bant uzunlukları 100 bp DNA Ladder (Bioline, Singapur) kullanılarak saptanmıştır. Elde edilen PZR ürünleri, UV görüntüleme sisteminde (Wisedoc, Güney Kore) görüntülenmiştir.

### 3.5.4. *Listeria* Cinsi Bakterilerin Filogenetik Analizi

#### 3.5.4.1. Primerlerin Hazırlanması

Deneyde kullanılan 16S *rRNA* gen bölgesine ait primerler üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Tablo 3.4'te, PZR için hazırlanan karışımda kullanılan primerler gösterilmiştir.

**Tablo 3.4:** *Listeria* cinsi bakterilerin dizi analizi için kullanılan primer.

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

### 3.5.4.2. PZR Yöntemi

PZR karışımı Boline markasına ait MyTaq™ Mix ile hazırlanmıştır. 0.2 ml hacimli mikrotüpler içerisine her bir reverse ve forward primerden 2.5 µl (10 µM), 2 µl (100 nmol) kalıp DNA, 5 µl MyTaq Reaction Buffer, 0.125 µl MyTaq DNA polimeraz eklendikten sonra steril ultra saf su ile son hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır.

0.2 ml hacimli mikrotüpler içerisinde hazırlanan örnekler zaman kaybetmeden Thermal Cycler (TC-PLUS, Techne, İngiltere) cihazına yerleştirilmiştir. Tablo 3.5'te, 16S rRNA genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları gösterilmiştir.

**Tablo 3.5:** 16S rRNA genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

| Döngü                             | Sıcaklık | Süre   |
|-----------------------------------|----------|--------|
| Başlangıç denatürasyonu (1 döngü) | 95 °C    | 2 dk.  |
| Denatürasyon                      | 95 °C    | 1 dk.  |
| Bağlanma                          | 55 °C    | 1 dk.  |
| Uzama                             | 72 °C    | 2 dk.  |
| Son Uzama (1 döngü)               | 72 °C    | 10 dk. |

PZR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler, elektroforez işlemi için % 1.2'lik agaroz jel üzerinde 90 volt akımda 45 dakika yürütülmüştür. DNA markerı olarak 1 kb DNA Ladder (Boline, Singapur) kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri, UV görüntüleme sisteminde (Wisedoc, Güney Kore) görüntülenmiştir.

16S rRNA primerleriyle elde edilen PZR örnekleri DNA sekans analizi için BM Laboratuvar Sistemlerine (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. Elde edilen 16S rRNA dizileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) BLAST programı kullanılarak GenBank veritabanında halihazırda mevcut olanlara dayalı olarak tanımlanmış ve sıralanmıştır.

### 3.6. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

#### 3.6.1. *Listeria* Enrichment Broth (HiMedia, Hindistan)

*Listeria* Selective Broth, *Listeria* türlerinin süt ve süt ürünlerinden ve diğer gıdalardan seçici zenginleştirmesi için kullanılmaktadır (Lovett ve ark., 1987).

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Kazein enzimatik hidrozilat | 17.0 g  |
| Soya pepton                 | 3.0 g   |
| Maya özütü                  | 6.0 g   |
| Sodyum klorit               | 5.0 g   |
| Dipotasyum hidrojen fosfat  | 2.5 g   |
| Dekstroz                    | 2.5 g   |
| dH <sub>2</sub> O           | 1000 ml |

pH: 7.3±0.2

36 g besiyeri üzerine 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 1.2 atmosfer basınçta buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir.

#### 3.6.2. *Listeria* Enrichment Supplement II, Modified (HiMedia, Hindistan)

*Listeria* türlerinin seçici üremesi için kullanılan antimikrobiyal katkı karışımıdır (Griffiths, 2003; Donnelly ve Nyachuba, 2007).

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Akrifilavin hidroklorit | 5 mg  |
| Nalidiksik asit         | 20 mg |
| Amfoterisin B           | 5 mg  |

Şişenin içeriği 5 ml %50 metanol ile çözelti haline getirilmiştir. İyice karıştırılan çözelti aseptik olarak steril 490 ml soğutulmuş (45-50 °C) *Listeria* Selective Broth Base'e ilave edilmiştir. Hazırlanan supplementler 2-8 °C'de saklanmıştır.

### 3.6.3. PALCAM (HiMedia, Hindistan)

*Listeria* türlerinin selektif izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyeridir (Netten ve ark., 1989).

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Hayvan dokusunun peptik sindirimi | 23.0 g  |
| Nişasta                           | 1.0 g   |
| Sodyum klorit                     | 5.0 g   |
| Mannitol                          | 10.0 g  |
| Amonyum ferrik sitrat             | 0.5 g   |
| Eskülin                           | 0.8 g   |
| Dekstroz                          | 0.5 g   |
| Lityum klorit                     | 15.0 g  |
| Fenol kırmızısı                   | 0.08 g  |
| Agar                              | 13.0 g  |
| dH <sub>2</sub> O                 | 1000 ml |

pH: 7.0±0.2

68.88 g besiyeri üzerine 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 1.2 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. Besiyeri sıcaklığı 45-50 °C'ye düştükten sonra 1 şişe *Listeria* Selective Supplement (Himedia, FD061) aseptik olarak eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra steril Petri kutularına dökülüp donması için beklenen besiyerleri 30 °C'de 1 gece sterilite kontrolü için bekletilmiştir. Besiyeri +4 °C'de 2 hafta saklanabilmektedir.

### 3.6.4. *Listeria Selective Supplement (PALCAM) (HiMedia, Hindistan)*

*Listeria monocytogenes*'in seçici izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan antimikrobiyal katkı karışımıdır (Netten ve ark., 1989).

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Polimiksin B sülfat     | 5000 IU  |
| Ceftazidim              | 10 mg    |
| Akrifilavin hidroklorit | 2.500 mg |

Kullanmadan hemen önce 5 ml steril distile su ile çözülen içerik iyice karıştırılmış ve aseptik olarak 500 ml steril, soğutulmuş (45-50 °C) PALCAM besiyerine ilave edilmiştir. Hazırlanan supplementler 2-8 °C'de saklanmıştır.

### 3.6.5. *Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSA-YE), Modified (HiMedia, Hindistan)*

TSA-YE, *Listeria* türlerinin tanımlanması için kullanılmaktadır (Hitchins, 1998).

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Kazein enzimik hidrolizat | 15.0 g  |
| Soya unu papaik sindirimi | 5.0 g   |
| Maya özütü                | 6.0 g   |
| Sodyum klorit             | 5.0 g   |
| Agar                      | 15.0 g  |
| dH <sub>2</sub> O         | 1000 ml |

pH: 7.3±0.2

46 g besiyeri üzerine 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 121 °C'de 1.2 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. İyice karıştırılarak steril Petri kutularına dökülen besiyerleri 30 °C'de 24 saat sterilite kontrolü için bekletilmiştir. Petri kutularına paylaştırılan besiyeri +4 °C'de 2 hafta saklanabilmektedir.

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

Antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan besiyeridir (Mueller ve Hinton, 1941).

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Sığır İnfüzyon Ekstraktı | 2.0 g   |
| Nişasta                  | 1.5 g   |
| Kazein hidrolizat        | 17.5 g  |
| Agar                     | 17.0 g  |
| dH <sub>2</sub> O        | 1000 ml |

pH: 7.3±0.2

38 g besiyeri üzerine 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 121 °C’de 1.2 atm’de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. İyice karıştırılıp steril Petri kutularına dökülen besiyerleri 30 °C’de 24 saat sterilite kontrolü için bekletilmiştir. Besiyeri +4 °C’de 2 hafta saklanabilmektedir.

### 3.6.7. % 0.85’lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Genel amaçlı seyreltme çözeltisi olarak kullanılmaktadır.

|                   |         |
|-------------------|---------|
| NaCl              | 8.5 g   |
| dH <sub>2</sub> O | 1000 ml |

Hazırlanan çözelti iyice karıştırıldıktan sonra 121 °C’de 1.2 atm’de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir.

### 3.6.8. Oksidaz Testi Ayıracı

|                                                          |       |
|----------------------------------------------------------|-------|
| N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride | 0.1 g |
| dH <sub>2</sub> O                                        | 10 ml |

Hazırlanan ayıraç iyice karıştırılarak ve bekletilmeden kullanılmıştır. Kullanım süresince ayıracın hazırlandığı tüp ışık almayacak şekilde sarılmıştır.

### 3.6.9. Katalaz Testi Ayıracı

%3'lük  $H_2O_2$  hazırlanmıştır.

### 3.6.10. Gram Boyama Ayıraçları

TSA-YE üzerindeki kolonilerin mikroskopik olarak incelenmesi için Gram Boyama işlemi uygulanmıştır. Gram boyamada kullanılan kimyasallar aşağıda listelenmiştir:

#### Kristal Viyole

##### A Çözeltisi

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Kristal viyole     | 2 g   |
| %96'luk Etil alkol | 20 ml |

##### B Çözeltisi

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Amonyum oksalat   | 0.8 g |
| dH <sub>2</sub> O | 80 ml |

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

#### Gram İyot Çözeltisi (Lugol)

|                   |        |
|-------------------|--------|
| İyot              | 1 g    |
| Potasyum iyodür   | 2 g    |
| dH <sub>2</sub> O | 300 ml |

Potasyum iyodür ile İyot beheri içerisinde 20 ml distile suyla eritilmiş, distile suyun geri kalanı üzerine eklenmiştir. Süzölmüş, koyu renkli şişeye konmuş ve saklanmıştır.

#### %96'luk Etil Alkol

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Saf etil alkol    | 96 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 4 ml  |

Distile su üzerine etil alkol eklenerek iyice karıştırılmıştır.

#### **Sulu Fuksin Çözeltisi**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Bazik fuksin (stok) | 10 ml  |
| dH <sub>2</sub> O   | 100 ml |

Fuksin distile su i çerisinde karıştırılmış ve filtre kağıdında süzölmüştür.

#### **3.6.11. Clark-Lubs Besiyeri**

Metil kırmızı ve Voges Proskauer testleri i çin kullanılmaktadır.

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Polipepton                      | 7 g     |
| Glukoz                          | 5 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5 g     |
| dH <sub>2</sub> O               | 1000 ml |

pH: 6.9 ± 0.2

Hazırlanan besiyeri üzerine erimesi için 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra 5'er ml olarak cam tüplere dağıtılmıştır. 121 °C'de 1.2 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. Besiyerleri 37 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır. Bu besiyeri +4 °C'de 30 gün saklanabilmektedir.

#### **3.6.12. Nitrat Besiyeri**

Mikroorganizmaların nitratı redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılmaktadır.

|                   |         |
|-------------------|---------|
| KNO <sub>3</sub>  | 0.2 g   |
| Bactopepton       | 5 g     |
| dH <sub>2</sub> O | 1000 ml |

pH: 7.4 ± 0.2

Hazırlanan besiyeri üzerine erimesi için 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra steril şırınga filtresi ile 10'ar ml olarak steril cam tüplere dağıtılmıştır. Besiyerleri 37 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır. Bu besiyeri +4 °C'de 30 gün saklanabilmektedir.

### 3.6.13. Sulfate Indole Motility (SIM) Besiyeri (Sigma-Aldrich, Almanya)

Bakterilerin hareket yeteneği, indol reaksiyonu ve H<sub>2</sub>S oluşumunu tespit etmek için kullanılan yarı-katı besiyeridir.

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Kazein pepton           | 20 g    |
| Et pepton               | 6.6 g   |
| Amonyum demir(II)sitrat | 0.2 g   |
| Sodyum tiyosülfat       | 0.2 g   |
| Agar                    | 3 g     |
| dH <sub>2</sub> O       | 1000 ml |

pH: 7.3 ± 0.2

30 g besiyeri üzerine erimesi için 1000 ml sıcak distile su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra 10'ar ml olarak cam tüplere dağıtılmıştır. 121 °C'de 1.2 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. Besiyerleri 25 °C'de bir gece sterilite kontrolüne bırakılmıştır. Bu besiyeri +4 °C'de 2 gün saklanabilmektedir.

### 3.6.14. Peptonlu Su (Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri)

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Pepton            | 5 g    |
| NaCl              | 2.5 g  |
| Bromtimol         | 5 ml   |
| dH <sub>2</sub> O | 500 ml |

pH: 7.4 ± 0.2

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

### 3.6.15. %5'lik Ramnoz, Ksiloz, Mannitol, Riboz, $\alpha$ -Metil-D-mannosit Solüsyonlarının Hazırlanması

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Karbonhidrat      | 5 g    |
| dH <sub>2</sub> O | 100 ml |

Ramnoz, ksiloz, mannitol, riboz, methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside şekerlerinin her birinden 5'er g tartılmış ve 100 ml su içinde çözündürülmüştür. Solüsyon 0.45  $\mu$ m por çapındaki enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Daha sonra bu solüsyonların 1 ml'si, 9 ml peptonlu su içerisine eklenmiştir.

### 3.6.16. Metil Kırmızısı Ayırıcı

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Metil kırmızısı   | 0.1 g  |
| Saf etil alkol    | 300 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 200 ml |

Metil kırmızısı üzerine önce etil alkol eklenip karıştırılmış daha sonra distile su eklenmiştir. Hazırlanan çözelti serin ve kuru bir yerde saklanmıştır.

### 3.6.17. Voges Proskauer Ayırıcı

|                                                                                 |        |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------|
| $\alpha$ -naftol (% 5)                                                          | 5 g    |
| % 96'lık Etil alkol                                                             | 100 ml |
| 5 g $\alpha$ -naftol üzerine %96'lık etil alkol eklenip iyice karıştırılmıştır. |        |
| KOH (% 40)                                                                      | 40 g   |
| dH <sub>2</sub> O                                                               | 100 ml |

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

### 3.6.18. Nitrat Testi Ayıracı

#### Reagent A

|                        |        |
|------------------------|--------|
| $\alpha$ -naftilamin   | 0.25 g |
| Asetik asit (5N, % 30) | 200 ml |

0.25 g  $\alpha$ -naftilamin üzerine çeker ocak içinde 5N, % 30'luk asetik asit eklenip karıştırılmıştır.

#### Reagent B

|                        |        |
|------------------------|--------|
| S ülfanilik asit       | 1 g    |
| Asetik asit (5N, % 30) | 125 ml |

1 g s ülfanilik asit üzerine çeker ocak içinde 5N, % 30'luk asetik asit eklenip iyice karıştırılmıştır.

### 3.6.19. 10 M NaOH

|                   |       |
|-------------------|-------|
| NaOH              | 10 g  |
| dH <sub>2</sub> O | 25 ml |

Elde edilen karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

### 3.6.20. 1 M HCl

|                   |        |
|-------------------|--------|
| % 37'lik HCl      | 8.4 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 100 ml |

İçerisinde distile su bulunan temiz bir behere, çeker ocak içinde % 37'lik HCl'den 8.4 ml yavaş yavaş damlatılmıştır.

### 3.6.21. 1 M Tris-HCl

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris              | 12.1 g |
| dH <sub>2</sub> O | 100 ml |

12.1 g Tris temiz bir kaba konularak üzerine 40 ml distile su eklenmiş ve çözündükten sonra 1 M HCl kullanılarak pH 8'e ayarlanmış ve toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve +4 °C'de Schott şişesi içerisinde saklanmıştır.

### 3.6.22. 0.5 M EDTA

|                   |        |
|-------------------|--------|
| EDTA              | 18.1 g |
| dH <sub>2</sub> O | 100 ml |

18.1 g EDTA temiz bir behere konularak üzerine yaklaşık 60 ml steril distile su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. 10 M NaOH kullanılarak pH 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve +4 °C'de Schott şişesi içerisinde saklanmıştır.

### 3.6.23. Tris-EDTA

|                   |        |
|-------------------|--------|
| 1M Tris-HCl       | 1 ml   |
| 0.5 M EDTA        | 200 µl |
| dH <sub>2</sub> O | 100 ml |

Hazırlanan solüsyon distile su kullanılarak 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. +4 °C'de Schott şişesi içerisinde saklanmıştır.

### 3.6.24. 10x TAE

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Trisma Base           | 48.4 g   |
| % 100'lük asetik asit | 11.42 ml |
| 0.5 M EDTA            | 20 ml    |
| dH <sub>2</sub> O     | 1000 ml  |

10x TAE stok solüsyonu hazırlamak için 48.4 g Trisma Base tartılmış ve 1000 ml'lik temiz bir mavi kapaklı Schott şişesinin içine konulmuştur. Üzerine 750 ml steril bidistile su eklenerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine % 100'lük asetik asitten çeker ocak içinde

11.42 ml yavaş yavaş eklenmiştir. En son üzerine 20 ml 0.5 M EDTA ilave edildikten sonra steril bidistile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 1-1.5 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra soğumaya bırakılmış ve +4 °C'de Schott şişesi içerisinde saklanmıştır.

#### 3.6.25. 1x TAE

10x TAE stok solüsyonundan 100 ml alınarak içerisinde önceden steril 900 ml bidistile su bulunan mavi kapaklı 1000 ml'lik Schott şişesi içerisine steril şartlar altında konulmuş ve iyice karıştırıldıktan sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.6.26. 10x TBE

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Trisma Base       | 108 g   |
| Borik asit        | 9.3 g   |
| EDTA              | 5.84 g  |
| dH <sub>2</sub> O | 1000 ml |

10x TBE stok solüsyonu hazırlamak için 108 g Trisma Base, 9.3 g Borik asit, 5.84 g EDTA tartılmış ve 1000 ml'lik temiz bir mavi kapaklı Schott şişesinin içine konulmuştur. Üzerine 1000 ml steril bidistile su eklenerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. 121 °C'de 1.2 atm'de buharlı sterilizasyonla 20 dk steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra soğumaya bırakılmış ve +4 °C'de Schott şişesi içerisinde saklanmıştır.

#### 3.6.27. 1x TBE

10x TBE stok solüsyonundan 100 ml alınarak içerisinde steril 900 ml bidistile su bulunan mavi kapaklı 1000 ml'lik Schott şişesi içerisine steril şartlar altında konulmuş ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.6.28. %0.8'lik Agaroze Jel

0.8 g agaroz temiz bir Erlen'e tartılarak üzerine 50 ml +4 °C'de saklanan 1x TAE eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra mikrodalgada kaynamamasına dikkat edilerek eritilmiştir.

### 3.6.29. Primer Konsantrasyonu Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan primerler üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Böylece her bir forward ve reverse primer için 100  $\mu$ M stok yapılmıştır. Stok solüsyondan 10  $\mu$ l alınarak içerisinde 90  $\mu$ l TE Buffer bulunan 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne ilave edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

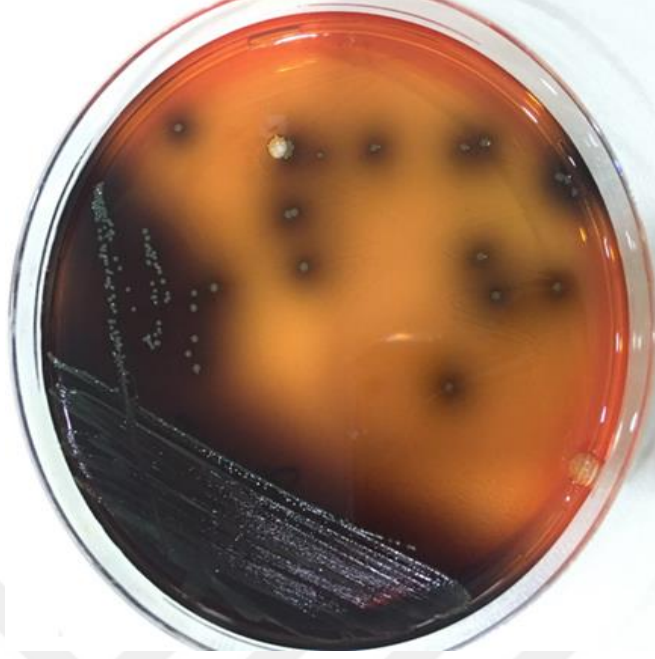


## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, Kasım 2016 – Mart 2017 tarihleri arasında İstanbul'un farklı semtlerinde bulunan market ve yerel pazarlardan satın alınan 119 adet inek sütünden yapılmış beyaz peynir *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmiştir. *Listeria* spp. olarak tanımlaması yapılan bakterilerin antibiyotik direnç profilleri 13 farklı antibiyotik kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Uygulanan biyokimyasal testler sonucunda *Listeria* şüpheli olarak kabul edilen suşlara ait *iap* ve *hlyA* gen bölgeleri PZR yöntemi ile incelenerek *Listeria* bakterilerinin moleküler olarak doğrulaması yapılmıştır.

### 4.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN KÜLTÜR YÖNTEMİYLE İZOLASYONU

FDA tarafından önerilen kültür yöntemi kullanılarak 119 adet beyaz peynir analiz edilmiştir. PALCAM besiyerinde üreyen gri-yeşil renkli etrafı siyah zonlu *Listeria* şüpheli kolonilerden (Şekil 4.1) TSA-YE besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyon yapılmış ve saf kültür elde edilmiştir. TSA-YE besiyerinde üreyen izolatlar, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri açısından incelenmiştir. İnceleme sonucunda, 8 peynir örneğinde Gram pozitif çomak veya kokobasil, katalaz reaksiyonu pozitif, oksidaz reaksiyonu negatif özellik gösteren 19 izolat *Listeria* şüpheli olarak kabul edilmiştir (Tablo 4.1).



**Şekil 4.1:** PALCAM besiyerinde *Listeria* şüpheli gri-yeşil renkli etrafı siyah zonlu koloniler.

**Tablo 4.1:** *Listeria* şüpheli izolatların LEB besiyerindeki inkübasyon süreleri ve kodları.

| Peynir Numarası | LEB Besiyerindeki İnkübasyon Süresi | Kodu |
|-----------------|-------------------------------------|------|
| P8              | 1.hafta                             | N1   |
| P15             | 48.saat                             | N2   |
| P20             | 1.hafta                             | N4   |
|                 | 1.hafta                             | N5   |
|                 | 1.hafta                             | N6   |
| P22             | 1.hafta                             | N7   |
|                 | 1.hafta                             | N8   |
|                 | 1.hafta                             | N9   |
|                 | 1.hafta                             | N10  |
|                 | 1.hafta                             | N11  |
|                 | 1.hafta                             | N12  |
| P44             | 48.saat                             | N3   |
| P51             | 2.hafta                             | N17  |
|                 | 2.hafta                             | N18  |
|                 | 2.hafta                             | N19  |
| P53             | 1.hafta                             | N15  |
| P54             | 48.saat                             | N13  |
|                 | 48.saat                             | N14  |
|                 | 1.hafta                             | N16  |

Kültür yönteminde, *Listeria* izolasyonunun ikincil zenginleştirme aşamasında inkübasyon süresinin önemli olduğu anlaşılmıştır. İnceleme sonucunda *Listeria* şüpheli olarak değerlendirilen izolatlar sadece 3 peynir örneğinde (P51, P53, P54), 48 saat, 1 hafta ve 2 hafta inkübasyondan sonra rastlanıldığı ve genel olarak 1 hafta ve üzerindeki izolasyonun uygun olduğu tespit edilmiştir.

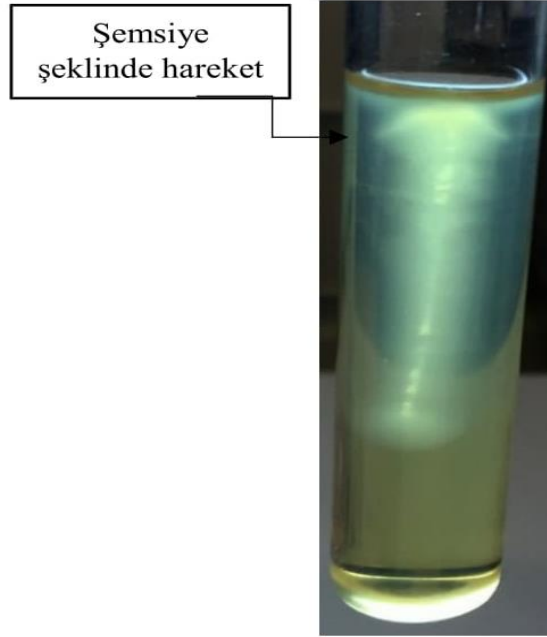
#### 4.2. BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI

Çalışmamızda elde edilen 19 *Listeria* şüpheli izolat hareket (Şekil 4.2), hemoliz, nitrat redüksiyonu, MR-VP, karbonhidrat fermentasyonu (Şekil 4.3) ve CAMP (Şekil 4.4) testleri açısından incelenmiştir. Bu testler sonucunda 19 izolattan 7'si karbonhidrat fermentasyonu dışında kalan tüm testlerde *L. monocytogenes* ile benzer biyokimyasal sonuçlar göstermiştir.

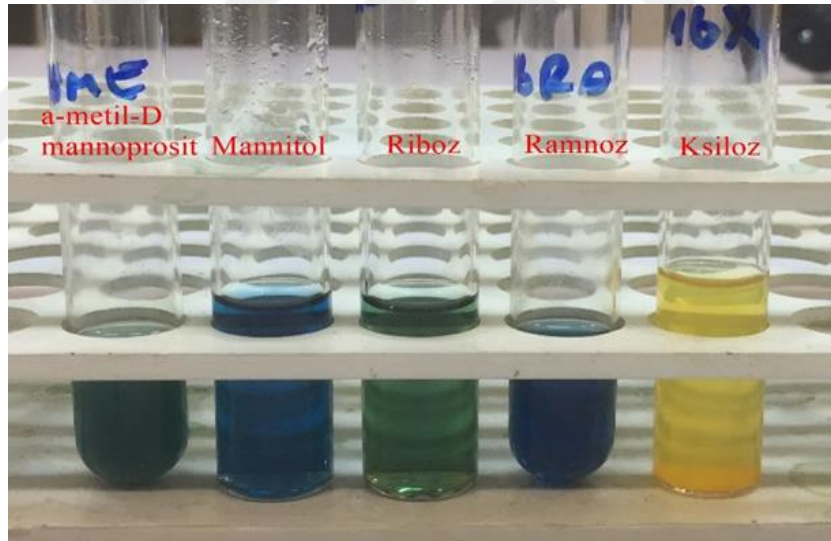
Tablo 4.2 incelendiğinde, biyokimyasal testler sonucunda, 19 izolatın 7'sinin (N12 - N19) MR, VP, nitrat indirgenmesi, hareket, CAMP,  $\beta$ -hemoliz reaksiyonu ve riboz, ksiloz, mannitol, ramnoz, methyl  $\alpha$ -D mannopyranoside fermentasyonu testleri açısından *L. monocytogenes* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Aynı zamanda 7 izolatın *L. monocytogenes*'in aksine karbonhidrat olarak ksilozu kullandığı, ramnoz ve  $\alpha$ -metil-D-mannosit karbonhidratlarını kullanmadığı tespit edilmiştir.

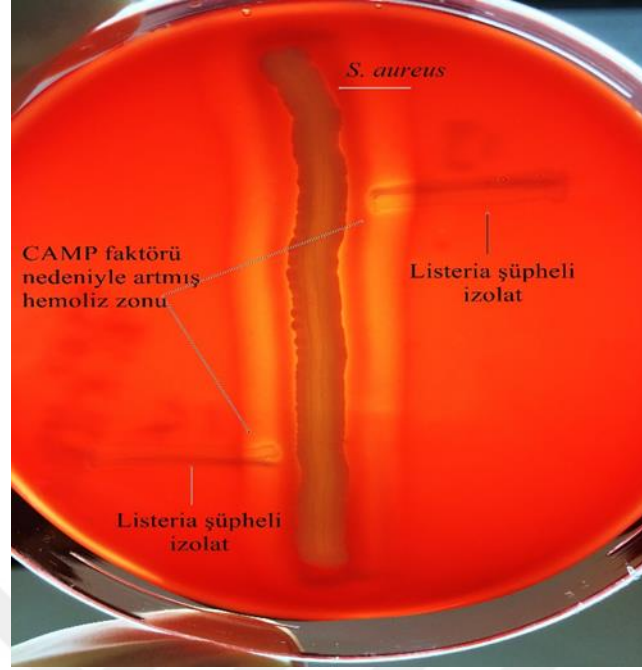
İzole edilen suşların 7'sinin *L. seeligeri* ile benzer biyokimyasal sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.2:** *Listeria* spp. şüpheli izolatın SIM besiyerinde şemsiye şeklinde gözlenen hareketi.



**Şekil 4.3:** *Listeria* spp. şüpheli izolatın karbonhidrat fermentasyon testi sonuçları.



Şekil 4.4: *Listeria* spp. şüpheli izolatın CAMP testi sonucu oluşan artmış hemoliz zonu.

**Tablo 4.2:** *Listeria* spp. şüpheli izolatların biyokimyasal test sonuçları.

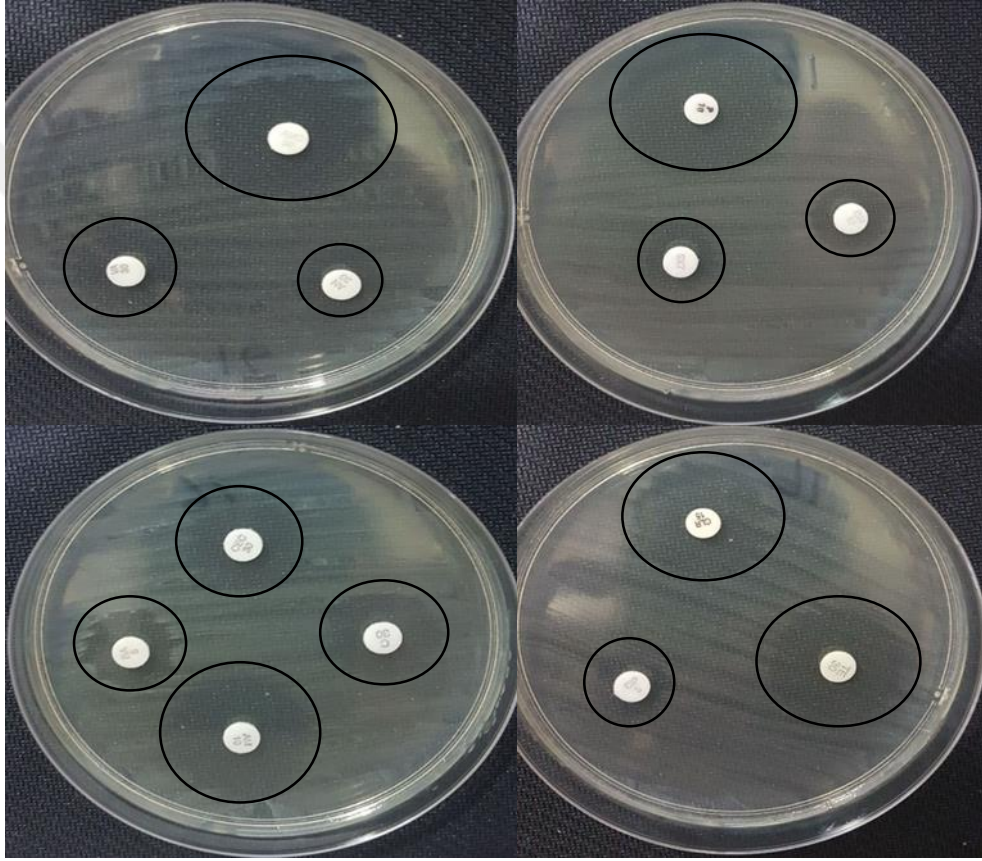
| İzolat No. | Biyokimyasal Testler |    |                        |         |        |                                |          |       |        |      |           |
|------------|----------------------|----|------------------------|---------|--------|--------------------------------|----------|-------|--------|------|-----------|
|            | MR                   | VP | Nitrat<br>İndirgenmesi | Hareket | Ramnoz | $\alpha$ -metil-D-<br>mannosit | Mannitol | Riboz | Ksiloz | CAMP | B-hemoliz |
| N1         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N2         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N3         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N4         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N5         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N6         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N7         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N8         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N9         | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N10        | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N11        | -                    | -  | -                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N12        | -                    | -  | +                      | -       | -      | -                              | -        | -     | -      | -    | -         |
| N13        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| N14        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| N15        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| N16        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| N17        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| N18        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| N19        | +                    | +  | -                      | +       | -      | -                              | -        | -     | +      | +    | +         |
| S.B.       | +                    | +  | -                      | +       | +      | +                              | -        | -     | -      | +    | +         |

S.B.: Standart Bakteri

#### 4.3. *LISTERIA* CİNSİ BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ SAPTANMASI

*Listeria* bakterilerinin antibiyotik duyarlılık deneyleri NCCLS'nin kabul ettiği Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmış ve değerlendirilmiştir (Şekil 4.5).

Tablo 4.5 incelendiğinde beyaz peynirden izole edilen 7 bakterinin 6'sının (% 85.71) siprofloksasine, 3'ünün (% 42.85) penisiline direnç gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde 7 bakteriden ikisinin siprofloksasin ve penisilin olmak üzere iki antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği saptanmıştır (% 28.57). İncelenen izolatların tamamının amikasin, kloramfenikol, rifampin, gentamisin, sefaklor, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, trimetoprim-sulfametoksazol, tetrasiklin, klaritromisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3 - Tablo 4.5).



Şekil 4.5: *Listeria* bakterilerinin MHA besiyerindeki disk difüzyon testi sonuçları.

**Tablo 4.3:** *Listeria* bakterilerinin antibiyotik zon çapları (mm).

| Antibiyotik                        | Bakteri No. |             |            |            |             |             |             |
|------------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|                                    | N13         | N14         | N15        | N16        | N17         | N18         | N19         |
| <b>Siprofloksasin</b>              | 14.83 ±0.41 | 16.33 ±1.51 | 15.5 ±0.71 | 14 ±0.00   | 14.33 ±2.66 | 15.16 ±1.17 | 15.16 ±1.17 |
| <b>Amikasin</b>                    | 23 ±0.89    | 24.83 ±2.14 | 15.5 ±0.71 | 15.5 ±0.71 | 23.5 ±1.38  | 21.83 ±0.75 | 23.16 ±1.33 |
| <b>Penisilin</b>                   | 14.66 ±0.82 | 15.16 ±1.72 | 28.5 ±0.71 | 30.5 ±0.71 | 14.16 ±0.75 | 23.83 ±7.63 | 28.16 ±7.05 |
| <b>Kloramfenikol</b>               | 22.16 ±1.83 | 21.66 ±1.21 | 21 ±1.41   | 18.5 ±2.12 | 20.33 ±1.51 | 19.83 ±1.17 | 20.5 ±2.17  |
| <b>Rifampin</b>                    | 24.16 ±1.17 | 24.5 ±1.22  | 18 ±0.00   | 17 ±0.00   | 23.83 ±0.41 | 25.5 ±0.55  | 23.66 ±0.82 |
| <b>Gentamisin</b>                  | 25.66 ±0.82 | 25.83 ±1.83 | 16.5 ±0.71 | 15 ±0.00   | 25.16 ±1.94 | 25.83 ±1.72 | 25 ±1.55    |
| <b>Sefaklor</b>                    | 28.16 ±1.94 | 27.66 ±0.82 | 22.5 ±0.71 | 19.5 ±2.12 | 25.83 ±0.75 | 28.16 ±1.83 | 28 ±0.89    |
| <b>Ampisilin</b>                   | 37.5 ±1.87  | 34.66 ±2.42 | 22.5 ±0.71 | 26.5 ±0.71 | 38.16 ±1.72 | 34.16 ±4.26 | 35.83 ±2.23 |
| <b>Amoksisilin/Klavulanik asit</b> | 37 ±2.00    | 37.16 ±3.66 | 24.5 ±0.71 | 25.5 ±0.71 | 37.5 ±2.95  | 39 ±3.79    | 37.83 ±1.94 |
| <b>Trimetoprim-sulfametoksazol</b> | 29 ±1.79    | 31.16 ±1.47 | 13 ±1.41   | 14.5 ±0.71 | 28.83 ±2.64 | 28.5 ±1.05  | 29 ±1.26    |
| <b>Tetrasiklin</b>                 | 26.33 ±1.86 | 26 ±1.67    | 28.5 ±0.71 | 24 ±0.00   | 27.33 ±1.51 | 26 ±1.55    | 26.83 ±1.47 |
| <b>Klaritromisin</b>               | 30.16 ±4.26 | 32 ±4.09    | 27 ±0.00   | 24.5 ±0.71 | 29.33 ±2.42 | 32 ±2.37    | 29.66 ±2.07 |
| <b>Vankomisin</b>                  | 27.83 ±0.75 | 27.83 ±1.72 | 22.5 ±0.71 | 17 ±0.00   | 25.83 ±1.72 | 27.16 ±1.47 | 27 ±1.79    |

± Standart Sapma

**Tablo 4.4:** *Listeria* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları.

| Antibiyotik                 | Bakteri No. |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                             | N13         | N14 | N15 | N16 | N17 | N18 | N19 |
| Siprofloksasin              | Di          | Yd  | Di  | Di  | Di  | Di  | Di  |
| Amikasin                    | Du          | Du  | Yd  | Yd  | Du  | Du  | Du  |
| Penisilin                   | Di          | Di  | Du  | Du  | Di  | Du  | Du  |
| Kloramfenikol               | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |
| Rifampin                    | Du          | Du  | Yd  | Yd  | Du  | Du  | Du  |
| Gentamisin                  | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |
| Sefaklor                    | Du          | Du  | Du  | Yd  | Du  | Du  | Du  |
| Ampisilin                   | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |
| Amoksisilin/Klavulanik asit | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |
| Trimetoprim-sulfametoksazol | Du          | Du  | Yd  | Yd  | Du  | Du  | Du  |
| Tetrasiklin                 | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |
| Klaritromisin               | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |
| Vankomisin                  | Du          | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  | Du  |

Di: Diren çİ, Yd: Yarı duyarlı, Du: Duyarlı

**Tablo 4.5:** *Listeria* bakterilerinin antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.

| Antibiyotik                 | n (%)     |              |           |
|-----------------------------|-----------|--------------|-----------|
|                             | Diren çİ  | Yarı Duyarlı | Duyarlı   |
| Siprofloksasin              | 6 (85.71) | 1 (14.28)    | -         |
| Amikasin                    | -         | 2 (28.57)    | 5 (71.42) |
| Penisilin                   | 3 (42.85) | -            | 4 (57.14) |
| Kloramfenikol               | -         | -            | 7(100)    |
| Rifampin                    | -         | 2 (28.57)    | 5 (71.42) |
| Gentamisin                  | -         | -            | 7 (100)   |
| Sefaklor                    | -         | -            | 7 (100)   |
| Ampisilin                   | -         | -            | 7 (100)   |
| Amoksisilin/Klavulanik asit | -         | -            | 7 (100)   |
| Trimetoprim-sulfametoksazol | -         | 2 (28.57)    | 5 (71.42) |
| Tetrasiklin                 | -         | -            | 7 (100)   |
| Klaritromisin               | -         | -            | 7 (100)   |
| Vankomisin                  | -         | -            | 7 (100)   |

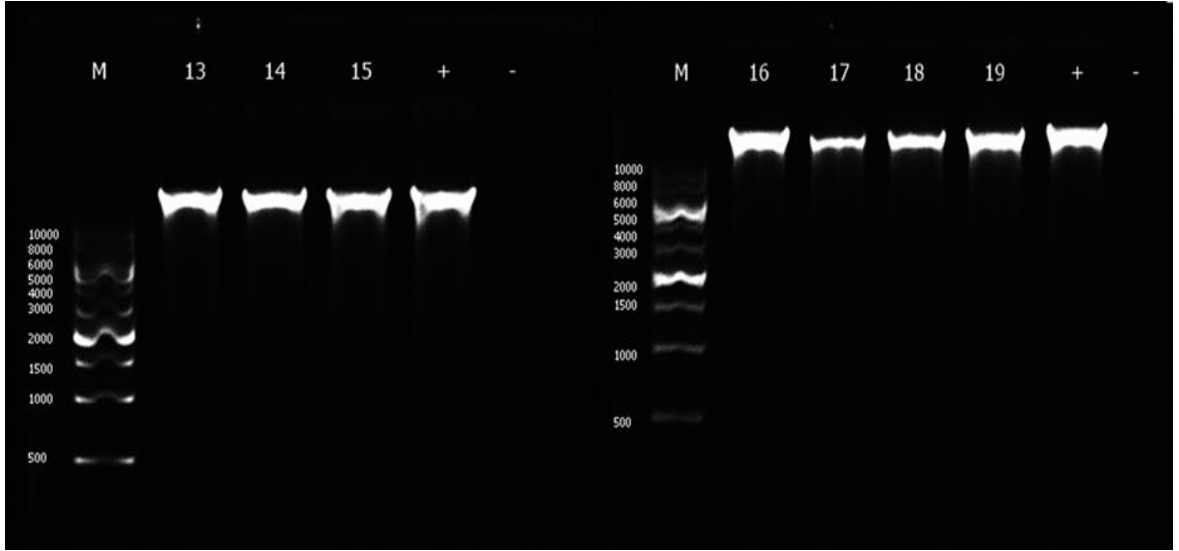
n: Bakteri sayısı

#### 4.4. *LISTERIA* CİNSİ BAKTERİLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ

##### 4.4.1. *Listeria* Şüpheli Bakterilerin PZR Uygulaması ile Doğrulanması

###### 4.4.1.1. DNA Eldesi

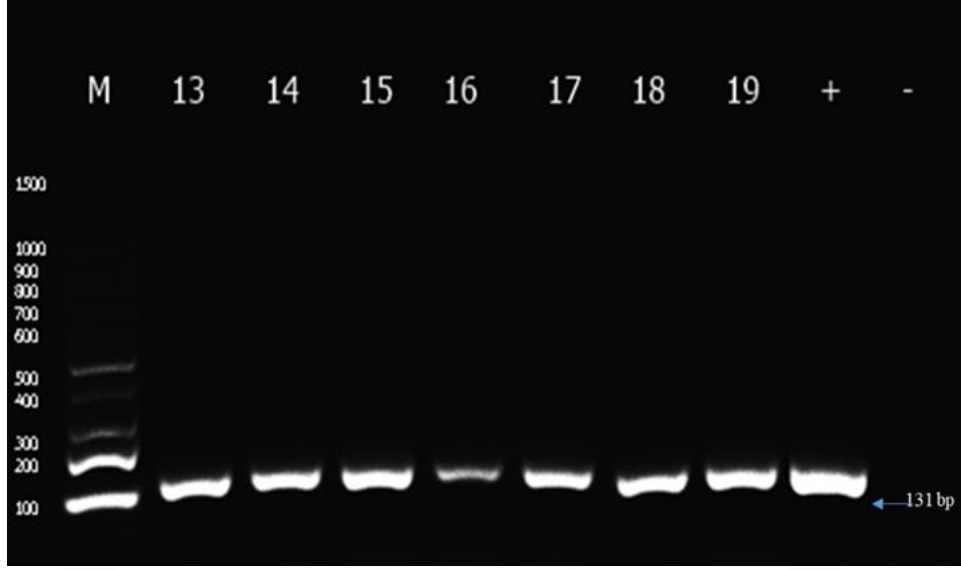
Peynir örneklerinden izole edilen 7 *Listeria* şüpheli bakterilere ait DNA izolasyon bantları Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6:** Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* bakterilerine ait genomik DNA’ların jeldeki görüntüsü. M: 1 Kb DNA marker. 13-19: *Listeria* şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol.

###### 4.4.1.2. PZR Yöntemi Sonuçları

*iap* gen bölgesine ait primerler kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak, GelRed floresan boya ile UV görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen 7 izolatin *iap* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin uzunluğu 100 bp ladder kullanılarak 131 bp olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.7:** Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* bakterilerinin taşıdığı *iap* genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. N13-N19: *Listeria* şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol.

*hlyA* gen bölgesine ait primerler kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak GelRed floresan boya ile UV görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen 7 izolatin *hlyA* genine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin uzunluğu 100 bp ladder kullanılarak 388 bp olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.8:** Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* bakterilerinin taşıdığı *hlyA* genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 100 bp DNA marker. N13-N19: *Listeria* şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol.

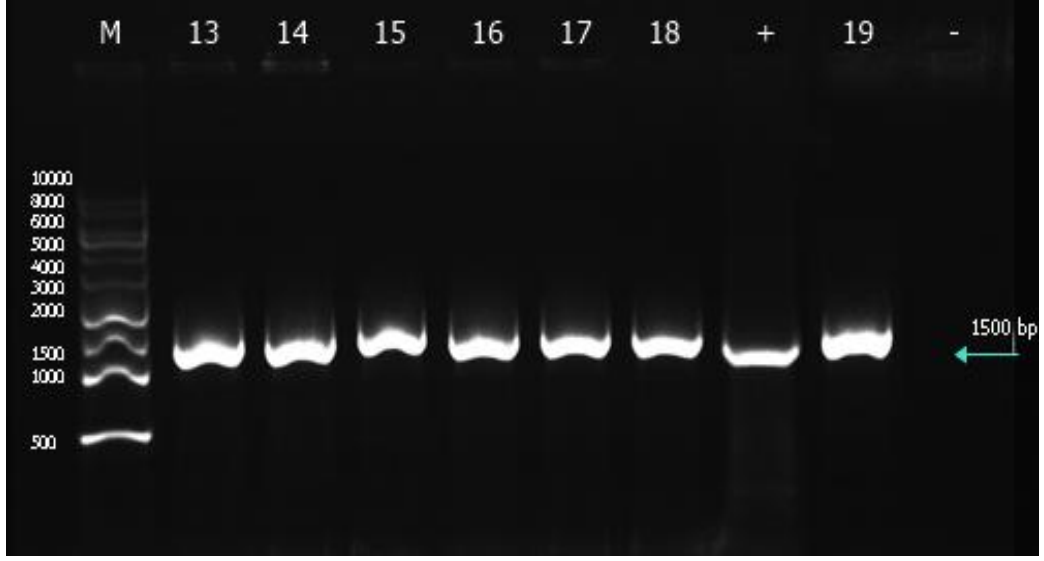
#### 4.4.2. *Listeria* Cinsi Bakterilerin Multipleks PZR ile Serotiplendirilmesi

Peynir örneklerinden izole edilen izolatlarda *iap* ve *hlyA* genlerinin varlığı PZR yöntemi ile incelenmiş, bu bakterilerin *Listeria* cinsinde bulunan *iap* genini içerdiği; ancak *L. monocytogenes*'e özgü olan *hlyA* genini içermediği tespit edilmiştir. Bulgular sonucunda, bu bakterilerin *Listeria* cinsine ait başka bir türe ait olduğu anlaşılmıştır.

Elimizde *L. monocytogenes* bakterisinin serotiplendirilmesine özgü primerler olduğu için serotiplendirme yapılamamıştır.

#### 4.4.3. *Listeria* Cinsi Bakterilerin Filogenetik Analizi

DNA'ları izole edilen *Listeria* şüpheli bakterilere, *16S rRNA* gen bölgesine ait 1492R ve 16S24F primerleri kullanılarak PZR yöntemi uygulanmıştır. PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak GelRed floresan boya ile UV görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiş ve sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin bant uzunlukları 1 kb ladder kullanılarak 1500 bp olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.9:** Peynir örneklerinden izole edilen *Listeria* şüpheli bakterilerin 16S rRNA genine ait jel elektroforez görüntüleri. M: 1 kb DNA marker. 13-19: *Listeria* şüpheli bakteriler. +: Pozitif kontrol (Standart *L. monocytogenes* RSKK 475). -: Negatif kontrol.

16S rRNA primerleriyle elde edilen PZR örnekleri DNA sekans analizi için BM Laboratuvar Sistemlerine (Ankara, Türkiye) gönderilmiştir. Elde edilen 16S rRNA dizileri, ilk önce NCBI BLAST programı kullanılarak GenBank veritabanında halihazırda mevcut olanlara dayalı olarak tanımlanmış ve sıralanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen örneklerin 16S rRNA dizileri GenBank'ta Tablo 4.6'daki erişim numaraları altında kaydedilmiştir.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) sonuçları, 16S rRNA için dizi benzerliğinin % 95-99 oranında olduğunu göstermiştir. Dizi benzerliği dikkate alındığında, elde edilen 7 izolatin, *L. seeligeri* ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.6:** Peynir örneklerinden elde edilen suşların erişim numaraları.

| Peynir No. | Suş No. | % Benzerlik | Erişim No. |
|------------|---------|-------------|------------|
| <b>P51</b> | N17     | % 95        | MK490993   |
|            | N18     | % 98        | MK490994   |
|            | N19     | % 99        | MK490995   |
| <b>P53</b> | N15     | % 99        | MK490991   |
| <b>P54</b> | N13     | % 99        | MK490989   |
|            | N14     | % 99        | MK490990   |
|            | N16     | % 97        | MK490992   |

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*L. monocytogenes*'in yenilmeye hazır gıda ürünlerinde, özellikle buzdolaplarında muhafaza edilen gıdalardaki varlığı, insan sağlığına karşı ciddi tehdit oluşturmaktadır. Organizmanın psikotrof özellikte olması nedeniyle, tüketici kontamine ürünü uygun bir şekilde buzdolabında muhafaza etse bile, soğuk depolama bakterinin gelişimini kontrol etmede yeterli olmayabilir. Bu ve *L. monocytogenes*'in neden olduğu hastalığın şiddeti nedeniyle, tüketime hazır gıdalarda bu bakteri için “sıfır tolerans” düzeyi kabul edilmektedir. *L. monocytogenes* için seçici zenginleştirme prosedürleri ile ilgili temel sorun, tam olarak tür düzeyinde özgüllük gösteren bir zenginleştirme sıvısı formülasyonunun şu anda mevcut olmamasıdır (Dailey ve diğ., 2015). *Listeria* spp. içindeki fenotipik benzerlikler nedeniyle, *Listeria*'nın diğer türlerinin varlığı *L. monocytogenes*'in geri kazanımını zorlaştırabilmektedir (Dailey ve diğ., 2014). Araştırmacılar tarafından *Listeria* spp. izolasyonu için çeşitli kuruluşların önerdiği yöntemler (USDA, FDA, ISO vb.) kullanılmaktadır.

Bu bakterinin tespiti için altın standart geleneksel kültür yöntemidir. Bu yöntem ön zenginleştirme, ikincil zenginleştirme ve seçici izolasyon olmak üzere toplam 3 aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. Ön zenginleştirme aşamasında örnek içindeki zarar görmüş ve strese girmiş bakterilerin yeniden canlandırılması sağlanmaktadır. Gıdalarda *L. monocytogenes* konsantrasyonu genellikle düşüktür (gramında <1 kob) ve bunun tespit edilebilir ve geri kazanılabilir düzeye ulaşması, ikincil zenginleştirme aşaması ile mümkün kılınmaktadır. Seçici izolasyon aşamasında, bakteriye özgü seçici besiyerinde gelişen *Listeria* spp. benzeri koloniler izole edilmektedir.

Çalışmamızda İstanbul'un farklı semtlerindeki market ve pazarlardan satın alınan 119 beyaz peynir örneğinin geleneksel kültür yöntemi ile *L. monocytogenes* varlığı açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Yumuşak ve yarı yumuşak peynirlerdeki su aktivitesi sert peynirlere nazaran daha yüksek olduğu ve *L. monocytogenes*'in gelişimine olanak tanıdığı için (Farber ve Peterkin, 1991), çalışmamızda yumuşak ve yarı yumuşak peynirlerin incelenmesi tercih edilmiştir.

Bu amaçla ilk aşamada FDA'nın süt ve süt ürünlerinden *Listeria* izolasyonu için önerdiği kültür yöntemi kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiş ve *Listeria* şüpheli 19 adet izolat elde edilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen suşlar biyokimyasal testler açısından incelenmiş ve 7 suşun *L. seeligeri* ile benzer biyokimyasal sonuçları verdiği tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında beyaz peynir örneklerinde *L. monocytogenes* bulunmadığı, *L. seeligeri* oranının ise % 2.52 (3/119) olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, Gülmez ve diğ., (2001)'nin Kars ilinde 40 salamura peynir örneğinde, Kaynar ve diğ., (2005)'nin Ankara'da 30 beyaz peynir örneğinde, Alas (2004)'ın Ankara'nın çeşitli semtlerinden alınan 50 beyaz peynir örneğinde *L. monocytogenes* bakterisine rastlamadıklarını rapor eden çalışmaları bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir.

Elmas (2014), Aydın ilinde çeşitli pazarlardan satın alınan 20 beyaz, 20 tulum, 20 lor peyniri ile yaptığı çalışmada, beyaz peynir örneklerinden *L. monocytogenes* izole edilmediğini sadece bir *L. seeligeri* izole ettiğini belirtmiştir. İncelediği 60 peynir örneğinden izole ettiği 10 suşun 3'ünün *L. monocytogenes* (% 5), 7'sinin *L. seeligeri* (% 11.7) olduğunu rapor etmiştir.

Yavuz (2015)'un Kütahya ilinde 57 peynir örneğini incelediği çalışmada, 2 örnekten *Listeria* spp. izole edildiği ve bu suşların da *L. grayi* (% 3.6) olduğu rapor edilmiştir.

Günümüze kadar Türkiye'de gıda kaynaklı bir listeriozis salgınının rapor edilmemesi ve gıda kaynaklı *Listeria* enfeksiyon oranlarının azlığı, bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Diğer gıda ürünleri ile peynir ürünlerinin *L. monocytogenes* kontaminasyonu karşılaştırıldığında düşük oranda prevalans oranı karşımıza çıkmakta, bunun da süte uygulanan pastörize işlemi ve/veya starter kültürlerin ilave edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bizim elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak Çetin ve diğ. (2015), Kırklareli'nde satın alınan beyaz peynir, tereyağı, krema ve kaşar peyniri gibi çeşitli süt ürünlerinden oluşan 79 örneği mikrobiyolojik açıdan incelemiş ve 40 beyaz peynir örneğinin hiçbirinde *Listeria* spp.'ye rastlamamıştır. Atıl ve diğ. (2011), Elazığ'da Şubat 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında, bir yıl boyunca ayda bir kez sığır ve koyun çiftliklerinden süt, peynir, süt soğutma tankı, su, yem, dışkı ve çevre örneklerini incelemişlerdir. 106 süt örneğinde *L. seeligeri* (% 0.19) ve *L. innocua* (% 0.19) izole etmelerine rağmen 28 peynir örneğinde *Listeria* spp. izole edememişlerdir.

Ankara'da yapılan bir çalışmada incelenen 110 adet çiğ süt ve süt ürününden sadece 23 örnekte *Listeria* spp. saptanmıştır ve bu türler 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak incelendiğinde *L. innocua* (% 6.36), *L. ivanovii* (% 5.45), *L. monocytogenes* (% 4.55) ve *L. welshimeri* (% 4.55) oldukları belirlenmiştir. İncelenen beyaz peynir örneklerinde *L. monocytogenes* bulunmadığı

ancak iki (% 6.67) *L. welshimeri*, bir (% 3.3) *L. innocua* ve bir (% 3.33) *L. ivanovii* tespit edildiği bildirilmiştir (Şanlıbaba ve diğ., 2018).

Rahimi ve diğ. (2012), İran'da süt ürünleri ile yaptıkları çalışmada *Listeria* spp. oranını % 7.2 olarak bulmuş ve bu türlerin *L. innocua* (% 66.7), *L. monocytogenes* (% 23.8), *L. murrayi* (% 4.8) ve *L. seeligeri* (% 4.8) olduğunu belirtmiştir.

Bizim elde ettiğimiz bulgulardan farklı olarak, Afyonkarahisar ilinde bulunan semt pazarlarından satın alınan 100 beyaz peynir ile yapılan bir çalışmada peynirlerin % 6'sında *L. monocytogenes* olduğu bildirilmiştir (Akkaya ve Alişarlı, 2006).

Aygün ve Pehlivanlar (2006) tarafından Antakya'da yapılan çalışmada 85 beyaz peynir örneğinin % 8.23'ünün ve 47 çiğ süt örneğinin % 2.12'sinin *Listeria* spp. ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Beyaz peynir örneğinde *L. seeligeri* % 2.35, *L. ivanovii* % 3.52, *L. monocytogenes* % 2.35, *L. innocua* % 3.52 oranında tespit edilmiştir. Çiğ sütte *Listeria* spp. bulunma nedeni olarak fekal kontaminasyon (Griffiths, 1989), sağım, depolama ve nakliye sırasında gerçekleşen çevresel kontaminasyon, süt çiftliklerindeki enfekte olmuş inekler ve yetersiz silaj kalitesi gösterilmiştir (Bemrah ve diğ., 1998).

Azak ve diğ. (2012), Erzincan şehrinden alınan 100 Tulum peynirinin üçünden *L. monocytogenes*, Ceylan ve Demirkaya (2007) Erzurum'da 29 beyaz peynir örneğinin birinden (% 3.45) *L. monocytogenes* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Cardak (2013), Aydın'da yaptığı çalışmada 20 pastörize süt, 20 çiğ süt, 20 kaşar peyniri, 20 beyaz peynir ve 10 tulum peyniri örneğinde sırasıyla 5 (% 25), 1 (% 5), 2 (% 10), 1 (% 5), 2 (% 20) *L. monocytogenes* tespit etmiştir. Güner ve Telli (2011)'nin yaptığı çalışmada incelenen 120 örneğin 34'ünde *L. monocytogenes*, Van otlu peynirinin 9'unda (% 30), Carra peynirinin 14'ünde (% 46.6), Konya küflü peynirinin 7'sinde (% 23.3), Urfa tulum peynirinin 4'ünde (% 13.3) *L. monocytogenes* tespit edilmiştir.

Elshinaway ve diğ. (2017) Mısır'ın Beni Sueyf bölgesinden alınan 240 süt ürünüyle yaptıkları çalışmada 40 adet tereyağlı süt peynirinde ve 40 adet kareish peynirinde *Listeria* spp. varlığının sırasıyla 5 (% 12.5), 5 (% 12.5) olduğunu belirlemişlerdir. Tereyağlı süt peynirindeki *Listeria* spp.; 2 (% 5) *L. monocytogenes*, 1 (% 2.5) *L. welshimeri*, 2 (% 5) *L. grayii*'dir. Kareish peynirindeki *Listeria* spp.; 1 (% 2.5) *L. welshimeri*, 1 (% 2.5) *L. monocytogenes*, 3 (% 7.5) *L. grayii*'dir. Talaga peynirinde ise *Listeria* spp.'ye rastlanmamıştır.

Kevenk ve Gülel (2015), Samsun’da 210 adet süt ve süt ürünü örneğiyle yaptıkları çalışmada, çiğ süt örneklerinde % 12 oranında *Listeria* spp. bakterisine rastlanıldığının ve bunların 5’inin (% 5) *L. monocytogenes* olduğunu tespit etmiştir. Çalışılan 20 beyaz peynir örneğinin 5’inin *Listeria* spp. pozitif olduğu ve bunların birinin (% 5) *L. monocytogenes* olduğunu tespit etmişlerdir.

Bolu’da yapılan çalışmada, satın alınan 142 ev yapımı beyaz peynir örneğinin % 9.2’sinde *L. monocytogenes* ve % 33.1’inde *Listeria* spp. varlığı bildirilmiştir. *L. monocytogenes* harici *Listeria* spp. % 23.9, *L. seeligeri* ise % 5.6 oranında izole edilmiştir (Arslan ve Özdemir, 2008).

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar ile diğer araştırmacıların elde ettiği sonuçlar farklılık göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar ile diğer araştırmacıların sonuçları arasındaki farklılıkların, peynirin üretildiği sütlerin kontaminasyon oranlarının birbirinden farklı olmasından, peynirin üretimi için kullanılan yöntemlerin farklılığından, farklı çevresel şartlardan, coğrafi farklılıklar ve hijyen kurallarının yetersiz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İncelediğimiz beyaz peynir örneklerinde karşılaştığımız *L. seeligeri* varlığı pastörizasyon sonrasında gerçekleşen muhtemel bir kontaminasyona işaret etmektedir. Peynirin üretimi, dağıtımı ve satışı sırasında hijyen kurallarına uyulmaması ve bu ürünlerin satışı ve depolanması sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyonların bir diğer kontaminasyon kaynakları olduğu düşünülmektedir.

Çalışma sonucu elde edilen veriler, İstanbulda satılan beyaz peynirlerin insan sağlığı açısından risk teşkil ettiğini göstermektedir. Peynir üretimi yapılan işletmelerde, sütün sağılmasından peynirin üretilmesi ve sofralara ulaşmasına kadar yapılan tüm işlemlerde HACCP uygulamalarının kullanılması gerekmektedir (Akkaya ve Alisharlı, 2006).

Çalışmamızda biyokimyasal testlerin yapılmasının ardından elde edilen 7 izolatın hepsinin *L. seeligeri* ile benzer biyokimyasal sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak genotipik testler yapılmadan kesin bir sonuca varılamayacağı için *iap* ve *hlyA* primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR deneyi sonucunda kültür yöntemiyle izole edilen 7 suşun sadece *Listeria* cinsine özgü *iap* gen bölgesine sahip olduğu, *L. monocytogenes*’e özgü ve bakterinin virülans özelliği ile ilişkili *hlyA* genine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, peynir örneklerinde *L. monocytogenes* izolasyonunu gerçekleştireceğimiz düşüncesiyle serotiplendirme yapmak amaçlanmıştır. Ancak, elimizde sadece *L. monocytogenes*’e özgü primerler olduğu için elde ettiğimiz suşlara serotiplendirme yapılamamıştır. Bu nedenle,

*Listeria* spp. suşlarının kesin tanımlanmasının yapılması için dizi analizi yapılmıştır. 7 suşun dizi analizi sonucunda, *L. seeligeri* olduğu kesin olarak belirlenmiştir.

Yapılan literatür taraması sonucunda; *L. seeligeri*'nin genellikle doğal ortamlardan izole edildiği ve bazı çalışmalarda bu ortamlardan izole edilen en yaygın *Listeria* türü olduğu (Sauders, 2005) belirtilmiştir. *L. seeligeri* kolesterol bağımlı sitolizinlerden biri olan seeligeriolizin O'yu üretir ve bu madde *L. monocytogenes* tarafından üretilen Listeriolysin O ile % 80 oranında homoloji gösterir (Haas ve diğ., 1992). Hemoliz ve CAMP testleri hemolitik *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* türlerinin tanımlanması ve hemolitik olmayan türler *L. welshimeri*, *L. innocua* ve *L. grayi*'den ayırt edilmeleri için önemli adımlardır.

Hemolizini kodlayan *hly* geninin, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri*'de *prfA* ve *Idh* arasında bulunan *prfA* virulans gen kümesinde mevcut olduğu fakat hemolitik olmayan *L. welshimeri*, *L. innocua*, ve *L. grayi*'nin genomlarında olmadığı bildirilmiştir (Chakraborty ve diğ., 2000; Cai ve Wiedmann, 2001; Schmid ve diğ., 2005). LLO, *L. monocytogenes* tarafından üretilen ve bu bakterinin fagozomlardan sitozolik bölgeye kaçışı için gerekli temel virülans faktörü olarak bilinmektedir. LLO'nun sitolitik aktivitesinin *L. monocytogenes*'in virülansından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

*hly* geni *L. monocytogenes*'te LLO'yu *L. seeligeri*'de LSO'yu kodlar, bu kolestrole bağlı sitolizin *Listeria*'nın konak hücre vakuollerinden hızlı kaçışı için gereklidir (Portnoy ve diğ., 1988; Alouf, 2001). Seeligeriolizin O (LSO)'yu üreten *L. seeligeri* (Leimeister-Wachter ve Chakraborty, 1989; Gouin ve diğ., 1994,) ise fagozomlardan kaçamaz ve bu nedenle LLO'yu kodlayan *hly* genine homolog olan *lso* geninin varlığına rağmen patojenik değildir (Gaillard ve diğ., 1987; Gaillard ve diğ., 1991; Karunasagar ve diğ., 1997). Genom hibridizasyon çalışmaları (Doumith ve diğ., 2004) ve yeni bir genom analizi (Steinweg ve diğ., 2010), *L. seeligeri*'nin *L. monocytogenes* içinde bulunan ve farklı memeli hücre soylarının istilasını için önemli olan proteinleri kodlayan bir dizi internalin (örn., *InlA* ve *InlB*) geninin homologlarını içermediğini göstermiştir (Doumith ve diğ., 2004; Nelson ve diğ., 2004; Hain ve diğ., 2006;). *InlA* ve *InlB*'nin yokluğu, özellikle *L. seeligeri*'nin memeli epitelyal hücre soylarını istila etmeme nedenini açıklayabilse de (Karunasagar ve diğ., 1997; Doumith ve diğ., 2004; Hain ve diğ., 2006), *L. seeligeri* ve *L. monocytogenes* arasındaki ek farklılıklar da *L. seeligeri*'de virülansın yokluğuna katkıda bulunur gibi görünmektedir. *Listeria* spp. içinde yalnızca *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin patojenik (Liu, 2006) olduğu bilinmesine rağmen, *L. seeligeri* ve *L. innocua*'ya

bağlı sporadik insan enfeksiyonlarının da varlığı bildirilmiştir (Rocourt ve diğ., 1986; Perrin ve diğ., 2003). *L. seeligeri* hemolitik özellik gösteren ancak patojenik olmayan bir bakteridir. Buna rağmen öncesinde sağlıklı olan bir yetişkinin akut iltihaplı menenjit geçirdiği bir insan enfeksiyonu vakasının *L. seeligeri* enfeksiyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Rocourt ve diğ., 1986).

Çalışma sonucunda peynir örneklerinden izole ettiğimiz *L. seeligeri* bakterilerinin antibiyotiklere duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu izolatların 6'sının (% 85.71) siprofloksasine, 3'ünün (% 42.85) penisiline direnç gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda bakterilerin beşinin (% 71.42) bir antibiyotiğe ve ikisinin (% 28.57) iki antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. İncelenen tüm suşların amikasin, kloramfenikol, rifampin, gentamisin, sefaklor, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, trimetoprim-sulfametoksazol, tetrasiklin, klaritromisin ve vankomisin antibiyotiklerine duyarlı olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda, penisilin ve siprofloksasin direnci Rahimi ve diğ. (2012)'nin yaptığı çalışma ile örtüşmektedir. İran'da süt ürünleri ile yapılan bir çalışmada, izolatların % 28.6'sının bir, % 23.8'ininde 2 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu bildirilmiştir. İzolatların % 66.7'sinin nalidiksik asite, % 42.9'unun penisiline, % 23.8'inin siprofloksasine ve % 19'unun tetrasiklin antibiyotiğine dirençli olduğu saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz izolatların penisilin antibiyotiğine karşı gösterdiği direnç diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Arslan ve Özdemir (2008) Bolu'da ev yapımı beyaz peynirle yaptıkları çalışmada elde ettikleri 47 *Listeria* spp. izolatının, bizim çalışmamızla benzer olarak penisiline (% 12.8) direnç gösterdiğini, bu suşların aynı zamanda kloromfenikol (% 8.5), klaritromisin (% 6.4), amikasin (% 4.3), tetrasiklin (% 2.1) ve sefaklora (% 2.1) karşı dirençli olduğunu bildirmiştir.

Kevenk ve Gülel (2015) Samsun'da çeşitli süt ve süt ürünleri ile yaptıkları çalışmada, izolatların % 15.3'ünün (8/52) sadece bir antibiyotiğe, % 36.5'unun (19/52) birden fazla antibiyotiğe dirençli olduğu ve kalan 25 izolatın hiçbir antibiyotiğe direnç göstermediğini tespit etmiştir. İnceledikleri 52 suşun tetrasiklin (% 34.6) antibiyotik direncinin yüksek olduğu ve bunu kloromfenikol (% 25) ve penisilin G (% 23) antibiyotiklerinin izlediği bildirilmiştir. Süt ürünlerinden izole edilen 27 suşun 4'ünün (% 14.8) ampisiline, 2'sinin (% 7.4) amoksisilin/klavulanik aside, 5'inin (% 18.5) eritromisine, 7'sinin (% 25.9) kloramfenikole,

7'sinin (% 25.9) oksitetrasikline, 6'sının (% 22.2) penisilin G'ye, 12'sinin (% 44.4) tetrasikline, 7'sinin (% 25.9) vankomisine dirençli olduğu belirtilmiştir.

Aksoy ve diğ., (2018) Kars'ta çiğ süttten üretilen süt ürünleri ile yaptıkları çalışmada 15 *L. monocytogenes* izolatının antibiyotik dirençlerini incelediklerinde, izolatların dördünün (% 26.7) en az bir antibiyotiğe direnç gösterdiğini, birinin (% 6.7) çoklu antibiyotik dirence sahip olduğunu, 4 suş (% 26.7) ile izolatlar arasında en çok trimetoprim-sülfametoksazole karşı direnç gösterildiğini tespit etmişlerdir. *L. monocytogenes* izolatlarının meropenem, penisilin G, vankomisin ve amikasinine karşı 1 (% 6.7) olmak üzere aynı oranda dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Srinivasan ve diğ., (2005) 4 çiftlikten elde ettikleri 38 *L. monocytogenes* izolatının antibiyotik dirençlerini incelemiştir. *L. monocytogenes* izolatlarının çoğu ampisilin (92%), rifampisin (% 84), rifamisin (% 84) ve florfenikole (% 66) ve bazıları tetrasiklin (% 45), penicillin G (% 40), kloramfenikole (% 32) karşı dirençlidir.

Harakeh ve diğ., (2009) Lübnan'da yumuşak beyaz peynir çeşitlerinden elde ettikleri 30 *L. monocytogenes* izolatının en fazla oksasilin (% 93.33), penisilin (% 90), ampisilin (% 60)'e karşı direnç gösterdiğini saptamıştır. Jamali ve diğ., (2013) Malezya'da çiğ süttten elde ettikleri 83 *Listeria* spp. izolatının tetrasiklin (49.4%) ve penicillin G (43.4%)'ye karşı direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. *Listeria* spp.'in % 53 (44/83)'ü en az bir antibiyotiğe, % 24.1 (20/83) ve % 20.5 (17/83)'i sırasıyla bir ve iki antibiyotiğe direnç göstermiştir. İzolatlar en fazla tetrasiklin (49.4%), penisilin G (43.4%), ve amoksisilin-klavulanik aside (14.5%) dirençlidir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz izolatların siprofloksasine karşı olan direnci farklı araştırmalarda da tespit edilmiştir. Conter ve diğ., (2009) gıda ve gıda üretim alanlarından izole edilen 120 *L. monocytogenes* suşuyla yaptıkları çalışmada, 10 (% 8.3) izolatın bir, 3 (% 2.5) izolatın iki ve 1 (% 0.8) izolatın beş antibiyotiğe direnç gösterdiğini saptamışlardır. En çok direnç gösterilen antibiyotiğin klindamisin (% 3.2) olduğu, bunu sırasıyla linezolid (% 3.2), siprofloksasin (% 1.6), ampisilin (% 1.6) rifampisin (% 1.6), trimetoprim/sulphametoksazol (% 1.6), vankomisin (% 0.8) ve tetrasiklin (% 0.8) antibiyotiklerinin izlediği görülmüştür. İrlanda'da gıda işleme tesislerinden elde edilen 207 *Listeria* spp. izolatının, gentamisin (% 5), sulfametoksazol-trimetoprim (% 2), tetrasiklin ve siprofloksasine (% 1.5) dirençli olduğu ortaya çıkarılmıştır (O'Connor ve diğ., 2010).

Walsh ve diğ., (2001) Dublin’de satın aldıkları perakende gıdalardan izole edilen 1001 *Listeria* spp. suşunu (549 *L. innocua*, 39 *L. welshimeri*, 351 *L. monocytogenes*, 62 *L. seeligeri*) antibiyotik duyarlılığı açısından incelediklerinde, genel olarak bir (% 9.1) antibiyotiğe direnç gösterildiğini, iki (% 1.8) ya da daha fazla antibiyotiğe gösterilen direncin de olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek oran tetrasiklin (% 6.7) ve penisilin (% 3.7) direncinde görülmüştür. Yapılan çalışmada *L. seeligeri* bakterilerinin hiçbir antibiyotiğe direnç göstermediği rapor edilmiştir.

Gıdalarda bulunan saprofitik veya kommensal yapıdaki bakterilerin birçok antibiyotiğe direnç gösterdiği ve bu direnç genlerinin gastrointestinal sistemdeki patojenik türleri de içeren diğer gıda kaynaklı bakterilere aktarılabilceği saptanmıştır (Perreten ve diğ., 1997). Hayvanlarda ve insanlarda aşırı antibiyotik kullanımının da bakterilerin antibiyotiklere olan direncini arttırdığı bilinen bir gerçektir. *Listeria* türlerinde antibiyotik direnci, iki tip hareketli genetik elemanın, kendiliğinden transfer edilen plazmidlerin ve konjugatif transpozonların kazanılmasına bağlıdır (Poyart-Salmeron ve diğ., 1990). Yapılan bir araştırmada, *Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinde yaygın olarak bulunan tetrasiklin direnç geninin konjugatif transpozonlar yoluyla *L. monocytogenes*’e taşınmış olabileceği ileri sürülmüştür (Poyart-Salmeron ve diğ., 1992).

Antibiyotik direncinin, sadece patojen *Listeria* türleri için değil, tüm bakterilerde daha yaygın olarak bildirildiği ve non-patojenlerde antibiyotik direncinin ortaya çıkmasının, *Listeria* türleri arasında gerçekleşen direnç genlerinin transferi nedeniyle insan sağlığına yönelik riskler oluşturduğu açıktır.

Antibiyotik direncinin insidansı halen düşük olmakla birlikte, direncin elde edildiği antibiyotiklerin kapsamı geniştir. Bu genişleyen aralığın, listeriyozu tedavi etmek için kullanılan birkaç antibiyotiği içermesi endişelendirmektedir, örn. penisilin, ampisilin, tetrasiklin ve gentamisin (Conter ve diğ., 2009). *L. monocytogenes*’in ampisilin ve penisilin’e karşı direncinin artması, bu antibiyotiklerin insan listeriyozunun tedavisinde yaygın kullanımı nedeniyle halk sağlığı için özellikle ciddi bir endişe kaynağıdır.

*L. seeligeri*’nin patojenik bir *Listeria* türü olmadığı bilinmektedir ancak, literatürde *L. seeligeri* enfeksiyonu nedeniyle menenjitte yakalanan bir hasta vakası bulunmaktadır. Bunun dışında herhangi bir vakaya rastlanılmamasına rağmen bu bakteri de halk sağlığı açısından risk oluşturabilir. Bu nedenle yetersiz pastörizasyon veya pastörizasyon sonrası paketleme dağıtım gibi adımların ve tüm sürecin denetlenmesi zaruri bir önlemdir. Gıda güvenliği tedbirlerinin

alınması ve gıda işletmelerinde HACCP yönergelerinin uygulanması yönünde takiplerin sıkı bir şekilde yapılması, yerel üreticilerin ise pastörizasyon uygulanmayan sütleri kullanmaması önerilmektedir.



## KAYNAKLAR

- Aguado, V., Vitas, A.I., Garcia-Jalon, I., 2004, Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA, *International journal of food microbiology*, 90 (3), 341-347.
- Akın, N., 1996, Peynir yapımında kullanılan süt pıhtılaştırıcı enzimler ve bunların bazı özellikleri, *Gıda*, 21 (6), 435-442.
- Akkaya, L., Alişarlı, M., 2006, Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesi, *Yüzüncü yıl üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 17 (1-2), 87-91.
- Akkaya, L., Alişarlı, M., Kara, R., Telli, R., 2007, Afyonkarahisar'da tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 18 (1), 1-5.
- Aksoy, A., Sezer, Ç., Vatansever, L., Gülbaz, G., 2018, Presence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in raw milk and dairy products, *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 24 (3), 415-421.
- Alas, Z.T., 2004, *Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynir ve sade dondurmada Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, fekal koliform ve E. coli varlığı*, Yüksek Lisans, Gazi Üniversitesi.
- Alouf, J.E., 2001, Pore-forming bacterial protein toxins: an overview, *current topics in microbiology and immunology*, 257, 1-14.
- Anonim, 2019, Ribotyping, <https://courses.cit.cornell.edu/biomi290/microscopycases/methods/ribotype.htm>, [Ziyaret Tarihi: 2 Temmuz 2019].
- Anonim, 2010, Mikrobiyolojik kriterler tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ, *Türk Gıda Kodeksi*, Tarım ve köy işleri bakanlığı, Ankara.
- Anonim, 2011, *Türk gıda kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği*, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>, [Ziyaret Tarihi: 10 Haziran 2019].
- Aras, S., 1992, Polimeraz zincir reaksiyonu, <http://atlasbiyo.com/dosyalar/konferans/15506cc8d91e01.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 23 Haziran 2019].
- Armstrong, R.W., Fung, P.C., 1993, Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review, *Clinical infectious diseases*, 16 (5), 689-702.
- Arslan, S., Özdemir, F., 2008, Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese, *Food control*, 19, 360-363.

- Aryal, S., 2018, *Latex Agglutination Test*, <https://microbenotes.com/latex-agglutination-test/>, [Ziyaret Tarihi: 2 Temmuz 2019]
- Atasoy, A.F., Yetişmeyen, A., Türkoğlu, H., Özer, B., 2008, Effects of heat treatment and starter culture on the properties of traditional Urfa cheeses (a white-brined Turkish cheese) produced from bovine milk, *Food control*, 19 (3), 278-285.
- Atıl, E., Ertaş, H.B., Özbey, G., 2011, Isolation and molecular characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environmental samples, *Veterinari Medicina*, 56 (8), 386-394.
- Aygun, O., Pehlivanlar, S., 2006, *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey, *Food control*, 17 (8), 676-679.
- Azak, M. G., Kılıç, H., Hızlısoy, H., Abay, S., 2012, Erzincan ili tulum peynirlerinden *Listeria* spp. izolasyonu ve identifikasyonu, *Erciyes üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 9 (3), 149-156.
- Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel, C.S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L.K., Fortes, E., Nightingale, K.K., Kephart, D., Wiedmann, M., 2014, *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64 (6), 1882-1889.
- Basher, H.A., Fowler, D.R., Rodgers, F.G., Seaman, A., Woodbine, M., 1984, Pathogenicity of natural and experimental listeriosis in newly hatched chicks, *Research in Veterinary Science*, 36 (1), 76-80.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W., Cerf, O., 1998, Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk, *Preventive veterinary medicine*, 37 (1-4), 129-145.
- Bergey, D.H., 1934, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 4<sup>th</sup> ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C., Meile, L., 2013, *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63 (2), 526-532.
- Bintsis, T., Papademas, P., 2002, Microbiological quality of white-brined cheeses: a review, *International journal of dairy technology*, 55 (3), 113-120.
- Bohnert, M., Dilasser, F., Dalet, C., Mengaud, J., Cossart, P., 1992, Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR, *Research in microbiology*, 143 (3), 271-280.
- Boisivon, A., Guiomar, C., Carbon, C., 1990, In vitro bactericidal activity of amoxicillin, gentamicin, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole alone or in combination against *Listeria monocytogenes*, *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 9 (3), 206-209.

- Börekçi, G., 2010, Flüoresan in situ hibridizasyon (FISH) yönteminin klinik mikrobiyolojide kullanımı, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 40 (3), 131-142.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8<sup>th</sup> ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Burn, C.G., 1936, Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus *Listerella*, *The american journal of pathology*, 12 (3), 341-348.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., Cossart, P., 2002, Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*, *Trends in microbiology*, 10 (5), 238-245.
- Cai, S., Wiedmann, M., 2001, Characterization of the prfA virulence gene cluster insertion site in non-hemolytic *Listeria* spp.: probing the evolution of the *Listeria* virulence gene island, *Current microbiology*, 43 (4), 271-277.
- Call, D.R., Borucki, M.K., Besser, T.E., 2003, Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*, *Journal of clinical microbiology*, 41 (2), 632-639.
- Cardak, A.D., 2013, Gross composition and the presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk and dairy products in Aydin, Turkey, *Journal of food, agriculture environment*, 11 (3-4), 55-62.
- Ceylan, Z.G., Demirkaya, A.K., 2007, Erzurum piyasasından temin edilen salamura beyaz peynirlerde *Listeria monocytogenes* varlığı ve bazı mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi, *Atatürk üniversitesi ziraat fakültesi dergisi*, 38 (2), 137-141.
- Chakraborty, T., Hain, T., Domann, E., 2000, Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species, *International journal of medical microbiology*, 290 (2), 167-174.
- Charpentier, E., Courvalin, P., 1999, Antibiotic resistance in *Listeria* spp., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (9), 2103-2108.
- Charpentier, E., Gerbaud, G., Jacquet, C., Rocourt, J., Courvalin, P., 1995, Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp., *Journal of infectious diseases*, 172 (1), 277-281.
- Chen Y, Knabel S.J., 2007, Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology*, 73 (19), 6299-6304.
- Ciesielski, C.A., Hightower, A.W., Parsons, S.K., Broome, C.V., 1988, Listeriosis in the United States: 1980-1982, *Archives of internal medicine*, 148 (6), 1416-1419.
- Cohen, P., Bouaboula, M. Bellis, M., Baron, V., Jbilo, O., Poinot-Chazel, C., Galiegue, S., Hadibi, E.H., Casellas, P., 2000, Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays, *The journal of biological chemistry*, 275 (15), 11181-11190.

- Colburn, K., Kaysner, C., Abeyta, C.Jr., Wekell, M., 1990, *Listeria* species in a California estuarine environment, *Applied and environmental microbiology*, 56 (7), 2007-2011.
- Colodner, R., Sakran, W., Miron, D., Teitler, N., Khavalevsky, E., Kopelowitz, J., 2003, *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery, *American journal of infection control*, 31 (5), 322-324.
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Ianieri, A., 2009, Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*, *International journal of food microbiology*, 128 (3), 497-500.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., Lecuit, M., 2003, Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions, *Trends in cell biology*, 13 (1), 23-31.
- Cotoni, L., 1942, A propos des bacteries denommees Listerella—rappel d’une observation ancienne de meningite chez l’homme, *Annales De l’Institut Pasteur*, 68, 92-95.
- Çetin, B., Karasu, S., Atik, A., Durak, M.Z., 2015, Investigation of microbiological quality of some dairy products in Kırklareli: detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by Real Time PCR, *Journal of Tekirdag agricultural faculty*, 12 (1), 74-80.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., Griffin, P.M., 1997, An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk, *The new england journal of medicine*, 336 (2), 100-105.
- Dailey, R.C., Martin, K.G., Smiley, R.D., 2014, The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered *Listeria* enrichment broth, *Food microbiology*, 44, 173–179.
- Dailey, R.C., Welch, L.J., Hitchins, A.D., Smiley, R.D., 2015, Effect of *Listeria seeligeri* or *Listeria welshimeri* on *Listeria monocytogenes* detection in and recovery from buffered *Listeria* enrichment broth, *Food microbiology*, 46, 528–534.
- Dalmasso, M., Jordan, K., 2014, *Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of Listeria monocytogenes*, Methods and protocols, Methods in molecular biology, In: Jordan, K., Fox, E.M., Wagner, M. (eds.), Chapter 19, Springer, New York, USA, 63-72.
- Dijkstra, R.G., 1982, The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents of canals of a sewage treatment plant. *Zentralblatt für bakteriologie mikrobiologie und hygiene. 1. Abt. originale b*, 176 (2-3), 202-205.
- Donnelly, C.W., Nyachuba, D.G., 2007, *Conventional methods to detect and isolate Listeria monocytogenes*, *Listeria listeriosis and food safety*, In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (eds.), Chapter 7, Marcel Dekker, New York, USA, 215-249.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., Buchrieser, C., 2004, New aspects regarding evolution and virulence of

*Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays, *Infection and immunity*, 72 (2), 1072-1083.

- El-Hofi, M., El-Tanboly, E.S., İsmail, A., 2010, Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to of white cheese production line, *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria*, 9 (3), 331-342.
- Elmas, S., 2014, *Aydın ilindeki semt pazarlarında satışa sunulan beyaz, tulum ve lor peynirlerinde Listeria monocytogenes ve Salmonella spp. varlığının araştırılması*, Yüksek Lisans, Adnan Menderes Üniversitesi.
- Elshinaway, S.H., Meshref, A.M.S., Zeinhom, M.M.A., Hafez, D.A.A., 2017, Incidence of *Listeria* species in some dairy products Inbeni-Suef governorate, *Assiut veterinary medical journal*, 63 (152), 5-13.
- Errebo Larsen, H., Seeliger, H.P.R., 1966, A mannitol fermenting *Listeria*, *Listeria grayi* sp., *In proceedings of the third international symposium on listeriosis*, 13–16 July 1996 Bilthoven, Netherlands, 35-39.
- Espaze, E.P., Reynaud, A.E., 1988, Antibiotic susceptibilities of *Listeria*: in vitro studies, *Infection*, 16 (2), 160-164.
- Evrensel, S.S., Temelli, S., Anar, Ş., 2003, Mandıra düzeyindeki işletmelerde beyaz peynir üretiminde kritik kontrol noktalarının belirlenmesi, *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 27, 29-35.
- Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, P.E., Casolari, P., Fabio, U., 1991, Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*, *Lancet*, 338 (16), 1272.
- Facinelli, B., Roberts, M.C., Giovanetti, E., Casolari, C., Fabio, U., Varaldo, P.E., 1993, Genetic basis of tetracycline resistance in food-borne isolates of *Listeria innocua*, *Applied and environmental microbiology*, 59 (2), 614-616.
- Farber, J.M., Addison, C.J., 1994, RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*, *Journal of applied bacteriology*, 77 (3), 242-250.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991, *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, *Microbiological reviews*, 55 (3), 476-511.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., Carter, A.O., Varughese, P.V., Ashton, F.E., Ewan, E.P., 1991, Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA, *The Journal of infectious diseases*, 163 (4), 927-928.
- FDA, 1988, *Listeria isolation; revised method of analysis: notice*, Bacteriological analytical manual, Chapter 29, *Federal register*, 53, 44147-44153.
- Feng, P., 1998, *Salmonella*, Bacteriological Analytical Manual, In: Jackson, G.J., (ed.), Chapter 4, AOAC International, Gaithersburg, MD.

- Fenlon, D.R., 1986, Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. *The veterinary record*, 118 (9), 240-242.
- Fenlon, D.R., Wilson, J., Donachie, W., 1996, The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing, *Journal of applied bacteriology*, 81 (6), 641-650.
- Fenlon, D.R., 1985, Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment, *Journal of applied bacteriology*, 59 (6), 537-543.
- Fensterbank, R., Audurier, A., Godu, J., Guerrault, P., Malo, N., 1984, Study of *Listeria* strains isolated from sick animals and from the silage consumed, *Annals of veterinary research*, 15 (1), 113-118.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L., 1985, Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis, *The New England journal of medicine*, 312 (7), 404-407.
- Fox, E.M., Delappe, N., Garvey, P., McKeown, P., Cormican, M., Leonard, N., Jordan, K., 2012, PFGE analysis of *Listeria monocytogenes* isolates of clinical, animal, food and environmental origin from Ireland, *Journal of medical microbiology*, 61 (4), 540-547.
- Franco Abuin, C.M., Quinto Fernandez, E.J., Fente Sampayo, C., Rodriguez Otero, J.L., Dominguez Rodriguez, L., Cepeda Saez, A., 1994, Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38 (7), 1655-1657.
- Freitag, N.E., Jacobs, K.E., 1999, Examination of *Listeria monocytogenes* intracellular gene expression by using the green fluorescent protein of *Aequorea Victoria*, *Infection and immunity*, 67 (4), 1844-1852.
- Frye, D.M., Zweig, R., Sturgeon, J., Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L., Mascola, L., 2002, An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*, *Clinical infectious diseases*, 35 (8), 943-949.
- Fuchizawa, I., Shimizu, S., Kawai, Y., Yamazaki, K., 2007, Specific detection and quantitative enumeration of *Listeria* spp. using fluorescent in situ hybridization in combination with filter cultivation (FISHFC), *Journal of applied microbiology*, 105 (2), 502-509.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., Cossart, P., 1991, Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci, *Cell*, 65 (7), 1127-1141.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P.J., 1987, In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocytelike cell line Caco-2, *Infection and immunity*, 55 (11), 2822-2829.

- Gaillard, J.L., Berche, P., Sansonetti, P.J., 1986, Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*, *Infection and immunity*, 52 (1), 50-55.
- Gaillard, J.L., Beretti, J.L., Boulot-Tolle, M., Wilhelm, J.M., Bertrand, J.L., Herbelleau, T., Berche, P., 1992, Serological evidence for culture negative listeriosis of the central nervous system, *The lancet*, 340 (8818), 560.
- Galsworthy, S.B., Girdler, S., Koval, S.F., 1990, Chemotaxis in *Listeria monocytogenes*, *Acta microbiologica hungarica*, 37 (1), 81-85.
- Garcia, E., De Paz, M., Rodriguez, J.L., Gaya, P., Medina, M., Nuiiez, M., 1996, Exogenous sources of *Listeria* contamination of ewes milk, *Journal of food protection*, 59 (9), 950-954.
- Gellin, B.G., Broome C.V., 1989, Listeriosis, *The journal of the american medical association*, 261 (9), 1313-1320.
- Gellin, B.G., Broome, C.V., Bibb, W.F., Weaver, R.E., Gaventa, S., Mascola, L., 1991, The epidemiology of listeriosis in the United States 1986, *American journal of epidemiology*, 133 (4), 392-401.
- Gendel, S.M., Ulaszek, J., 2000, Ribotype analysis of strain distribution in *Listeria monocytogenes*, *Journal of food protection*, 63 (2), 179-185.
- George, S.M., Lund, B.M., 1992, The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5, *Letters in applied microbiology*, 15 (2), 49-52.
- Gottlieb, S.L., Newbern, E.C., Griffin, P.M., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Baker, N.L., Hunter, S.B., Holt, K.G., Ramsey, F., Head, M., Levine, P., Johnson, G., Schoonmaker-Bopp, D., Reddy, V., Kornstein, L., Gerwel, M., Nsubuga, J., Edwards, L., Stonecipher, S., Hurd, S., Austin, D., Jefferson, M.A., Young, S.D., Hise, K., Chernak, E.D., Sobel, J., 2006, Multistate outbreak of Listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy, *Clinical infectious diseases*, 42 (1), 29-36.
- Gouin, E., Mengaud, J., Cossart, P., 1994, The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species, *Infection and immunity*, 62 (8), 3550-3553.
- Goulet, V., de Valk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocourt, J., Vaillant, V., Jacquet, C., Desenclos, J.C., 2001, Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis France 1987–1997, *Emerging infectious diseases*, 7 (6), 983-989.
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G., Veit, P., 1998, Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993, *The journal of infectious diseases*, 177 (1), 155-160.
- Gouws, P.A., Liedemann, I., 2005, Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products, *Food technology and biotechnology*, 43 (2), 201-205.

- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Dneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.E., Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B.D., 2010, *Listeria marthii* sp. nov. isolated from natural environment Finger Lakes natural forest, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60 (6), 1280-1288.
- Gray, M.L., Killinger, A.H., 1966, *Listeria monocytogenes* and listeric infections, *Bacteriological reviews*, 30 (2), 308-382.
- Gray, M.L., Stafseth, H.J., Thorp, F., Scholl, L.B., Riley, W.F., 1948, A new technique for isolating listerellae from the bovine brain, *Journal of bacteriology*, 55 (4), 471-476.
- Griffiths, M.W., 1989, *Listeria monocytogenes*: Its importance in dairy industry, *Journal of the science of food and agriculture*, 47 (2), 133-158.
- Griffiths, M.W., 2003, *Listeria properties and occurrence*, Encyclopedia of food sciences and nutrition, In: Caballero, B., Trugo L.C., Finglas P.M., (eds.), Academic Press, San Diego, CA, 3573-3582.
- Gronstol, H., 1979, Listeriosis in sheep *Listeria monocytogenes* from grass silage, *Acta veterinaria scandinavica*, 20 (4), 492-497.
- Gudbjonsdottir, B., Suihiko, M.L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjoberg, A.M., Niclasend, O., Bredholte, S., 2004, The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in Nordic countries, *Food microbiology*, 21 (2), 217-225.
- Guenich, H., Muller, H., Schrettenbrunner, A., Seeliger, H., 1985, The occurrence of different *Listeria* species in municipal waste water, *Zentralblatt für bakteriologie, mikrobiologie und hygiene. 1. Abt. originale b*, 181 (6), 563-565.
- Guerra, M.M., Bernardo, F., McLauchlin, J., 2002, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*, *Systematic and applied microbiology*, 25 (3), 456-461.
- Gutekunst, K.A., Pine L., White E., Kathariou S., Carlone G.M., 1992, A filamentouslike mutant of *Listeria monocytogenes* with reduced expression of a 60-kilodalton extracellular protein invades and grows in 3T6 and Caco-2 Cells, *Canadian journal of microbiology*, 38 (8), 843-851.
- Gülmez, M., Güven, A., 2001, Beyaz ve çeşitli peynirlerinde *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması, *Kafkas üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 7 (2), 155-161.
- Gülmez, M., Güven, A., Çetinkaya, A., 2001, Kars'ta tüketime sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 7 (2), 55-62.
- Güner, A., Telli, N., 2011, A survey on the presence of *Listeria monocytogenes* in various semi-hard cheeses from different regions of Turkey, *Journal of animal and veterinary advances*, 10 (14), 1890-1894.

- Haas, A., Dumbsky, M., Kreft, J., 1992, Listeriolysin genes: complete sequence of ilo from *Listeria ivanovii* and of lso from *Listeria seeligeri*, *Biochimica et biophysica acta*, 1130 (1), 81-84.
- Hadorn, K., Hachler, H., Schaffner, A., Kayser, F.H., 1993, Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis, *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 12 (12), 928-937.
- Hain, T., Steinweg, C., Chakraborty, T., 2006, Comparative and functional genomics of *Listeria* spp., *Journal of biotechnology*, 126 (1), 37-51.
- Halkman, A. K., 2013, *Gıda mikrobiyolojisi ders notları*, Ankara üniversitesi, Mühendislik fakültesi.
- Halter, E.L., Neuhaus, K., Scherer, S., 2013, *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 641-647.
- Hamdi, T.M., Naim, M., Martin, P., Jacquet, C., 2007, Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria), *International journal of food microbiology*, 116 (1), 190-193.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N., 2009, Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products, *Science of the total environment*, 407 (13), 4022-4027.
- Hatkin, J.M., Phillips, W.E., Robertson J., 1986, Isolation of *Listeria monocytogenes* from an eastern wild turkey, *Journal of wildlife diseases*, 22 (1), 110-112.
- Hayaloğlu, A.A., Güven, M., Fox, P.F., 2002, Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir', *International dairy journal*, 12 (8), 635-648.
- Hitchins, A.D., 1998, *Listeria monocytogenes*, Bacteriological analytical manual, In: Jackson, G.J., (ed.), Chapter 10, 8<sup>th</sup> ed., Revision A, AOAC International, Gaithersburg, MD, 1001-1013.
- Hitchins, A.D., Jinneman, K., Chen, Y., 2017, *BAM: Detection and enumeration of Listeria monocytogenes*, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes>, [Ziyaret Tarihi: 18 Mayıs 2019].
- Hof, H., 1991, Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis, *Infection*, 19 (4), 229-233.
- Hof, H., Nichterlein, T., Kretschmar, M., 1997, Management of listeriosis, *Clinical microbiology reviews*, 10 (2), 345-357.
- Hof, H., 2003, Listeriosis: therapeutic options, *FEMS immunology and medical microbiology*, 35 (3), 203-205.

- Hofer, E., 1983, Bacteriologic and epidemiologic studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in healthy cattles, *Zentralblatt für bakteriologie mikrobiologie und hygiene series A*, 256 (2), 175-183.
- Husu, J., Sivela, S., Rauramaa, A., 1990, Prevalence of *Listeria* species as related to chemical quality of farmensiled grass, *Grass and forage science*, 45 (3), 309-314.
- ISO, 2017, Microbiology of the food chain horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Part 1: detection method international standard ISO 11290-1, *International organization for standardization*, Geneva, Switzerland.
- Jakobsen, M., Narvhus, J., 1996, Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products, *International dairy journal*, 6 (8-9), 755-768.
- Jacquet, C., Gouin, E., Jeannel, D., Cossart, P., Rocourt J., 2002, Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin, *Applied and environmental microbiology*, 68 (2), 616-622.
- Jamali, H., Radmehr, B., Thong, K.L., 2013, Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks, *Food control*, 34 (1), 121-125.
- Jeffers, G.T., Bruce, J.L., McDonough, P.L., Scarlett, J., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2001, Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases, *Microbiology*, 147 (5), 1095-1104.
- Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S.P., Son, R., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., 2010, Review article: detection of *Listeria monocytogenes* in foods, *International food research journal*, 17, 1-11.
- Jones, E.M., MacGowan, A.P., 1995, Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*, *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 14 (3), 165-175.
- Jorgensen, F., Stephens P.J., Knochel, S., 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*, *Journal of applied bacteriology*, 79 (3), 274-281.
- Junttila, J.R., Niemela, S.I., Hirn, J., 1988, Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*, *The journal of applied bacteriology*, 65 (4), 321-327.
- Karaali, A., 2003, *Gıda işletmelerinde HACCP uygulamaları ve denetimi*, Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- Karunasagar, I., Lampidis, R., Goebel, W., Kreft, J., 1997, Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells, *FEMS microbiology letters*, 146 (2), 303-310.

- Kathariou, S., Kanenaka, R., Allen, R.D., Fok, A.K., Mizumoto C., 1995, Repression of motility and flagellin production at 37 degrees C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*, *Canadian journal of microbiology*, 41 (7), 572-577.
- Kaynar, P., 2011, Ülkemiz peynirleri üzerine mikrobiyolojik araştırmalar, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 41 (1), 1-8.
- Kaynar, Z., Kaynar, P., Koçak, C., 2005, Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, *Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, 62 (1-3), 1-10.
- Keskin, Y., Özyaral, O., Başkaya, R., Susur, M.A., 2006, Semt pazarlarında satılan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 36 (1), 9-19.
- Kevenk, T.O., Gülel, G.T., 2015, Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products, *Journal of food safety*, 36 (1), 11-18.
- Kohler, S., Leimeister-Wachter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F., Goebel, W., 1990, The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*, *Infection and immunity*, 58 (6), 1943-1950.
- Kolören, Z., Çil, E., Ayaz, E., Karaman, Ü., 2017, RFLP yönteminin parazitolojide uygulama alanları, *Ordu Üniversitesi bilim ve teknoloji dergisi*, 7 (2), 215-225.
- Kuhn, M., Goebel, W., 1989, Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells, *Infection and immunity*, 57 (1), 55-61.
- Kurşun, Ö., Güner, A., Kırdar, S.S., Kale, A., 2008, Burdur'da tüketime sunulan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs 2008 Erzurum.
- Lane, D.J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing, Nucleic acid techniques in bacterial systematics, In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.), John Wiley and Sons, New York, 115-175
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Mateos, A.L.F., Roche, S.M., Buchrieser, C., Daniel, V.D., Monnier, A.L., Leuit, M., Allerberger, F., 2010, *Listeria rocourtiae* sp. nov., *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60 (9), 2210-2214.
- Lee, W.H., McClain, D., 1986, Improved *Listeria monocytogenes* selective agar, *Applied and environmental microbiology*, 52 (5), 1215-1217.
- Leimeister-Wachter, M., Chakraborty, T., 1989, Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*, *Infection and immunity*, 57 (8), 2350-2357.

- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A., Broome, C.V., 1988, Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese, *The New England journal of medicine*, 319 (13), 823-828.
- Liu, D., 2006, Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen, *Journal of medical microbiology*, 55 (6), 645-659.
- Loken, T., Aspgy, E., Gronstol, H., 1982, *Listeria monocytogenes* excretion and humoral immunity in goats in a herd with outbreaks of listeriosis and in a dairy herd, *Acta veterinaria scandinavica*, 23 (3), 392-399.
- Lorber, B., 1997, Listeriosis, *Clinical infectious diseases*, 24 (1), 1-11.
- Lovett, J., 1988, Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products, *Association of official analytical chemists*, 71 (3), 658-660.
- Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M., 1987, *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity, *Journal of food protection*, 50 (3), 188-192.
- Lyytikainen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala H., Siitonen, A., 2000, An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland, *The journal of infectious diseases*, 181 (5), 1838-1841.
- MacDonald, P.D., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., Saah, J.R., Graves, L.M., Hunter, S.B., Sobel, J., 2005, Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese, *Clinical infectious diseases*, 40 (5), 677-682.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., 2011, Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview, *American journal of food technology*, 6 (2), 87-102.
- Marquis, H., Doshi, V., Portnoy, D.A., 1995, The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells, *Infection and immunity*, 63 (11), 4531-4534.
- Matar, G.M., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Swaminathan, B., 1997, Listeriolysin O-based latex agglutination test for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in Foods, *Journal of food protection*, 60 (9), 1038-1040.
- McLauchlin, J., 1997, The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective, *Reviews in medical microbiology*, 8 (1), 1-14.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999, Food-related illness and death in the United States, *Emerging infectious diseases*, 5 (5), 607-625.
- Mead, P.S., Dunne, E.F., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P., Bannerman, T., Sauders, B.D., Hayes, P., Dewitt,

- W., Sparling, P., Griffin, P., Morse, D., Slutsker, L., Swaminathan, B., 2006, Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat, *Epidemiology and infection*, 134 (4), 744-751.
- McClain, D., Lee, W.H., 1988, Development of a USDA–FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry, *Journal association of official analytical chemists*, 71 (3), 660-664.
- McKellar, R.C., 1994, Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology*, 60 (12), 4219-4225.
- McLauchlin, J., Audurier, A., Taylor, A.G., 1991, Treatment failure and recurrent human listeriosis, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 27 (6), 851-857.
- Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Björkroth, K.J., Korkeala, H.J., 1999, Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout, *Journal of clinical microbiology*, 37 (7), 2358-2360.
- Mueller J.H., Hinton J., 1941, A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*, *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 48 (1), 330-333.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926, A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.), *The journal of pathology and bacteriology*, 29 (4), 407-439.
- Nelson, K.E., Fouts, D. E., Mongodin, E.F., Ravel, J., DeBoy, R.T., Kolonay J.F., Rasko, D. A., Angiuoli, S.V., Gill, S.R., Paulsen, I.T., Peterson, J., White, O., Nelson, W.C., Nierman, W., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Haft, D.H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forberger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling, L.D., Uhlich, G.A., Bayles, D.O., Luchansky, J.B., Fraser, C.M., 2004, Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species, *Nucleic acids research*, 32 (8), 2386-2395.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V., 2007, Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products, *International journal of food microbiology*, 115 (3), 290-296.
- Norton, D.M., 2002, Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples, *Journal of AOAC international*, 85 (2), 505-515.
- Nunez-Poulsen, P., Carvajal, A., Lester, A., Andreassen, J., 1988, In vitro susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from human blood and cerebrospinal fluid, *Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica*, 96 (3), 223-228.
- Nyfeldt, A., 1929, Etiologie de la mononucleose infectieuse, *Comptes rendus des seances de la societe de biologie*, 101, 590-591.

- O'Connor, L., O'Leary, M., Leonard, N., Godinho, M., O'Reilly, C., Coffey, L., Egan, J., O'Mahony R., 2010, The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment, *Letters in applied microbiology*, 51 (5), 490-498.
- Okutucu, B., Pehlivan S., 2003, *Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve uygulama alanları*, <https://dergipark.org.tr/download/article-file/25451>, [Ziyaret Tarihi: 23 Haziran 2019].
- Olsen, S.J., Patrick, M., Hunter, S.B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W.R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G.A., Frye, D.M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T.F., LaPorte, T.N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D.J., Huang, A.J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E.R., Holcomb, M.E., Woron, R.F., Zansky, S.M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A.R., Tucker, N., Hynes, N.A., Mead, P., 2005, Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat, *Clinical infectious diseases*, 40 (7), 962-967.
- Ooi, A., Hussain, S., Seyedarabi, A., Pickersgill, R.W., 2006, Structure of internalin C from *Listeria monocytogenes*, *Acta crystallographica section d*, 62 (11), 1287-1293.
- Öner, Z., Karahan, A.G., Aloglu, H., 2006, Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening, *Lebensmittel-wissenschaft technologie*, 39 (5), 449-454.
- Özçelik, T., 2003, DNA Mikroarray/DNA Mikrodizilimi: Hematolojide kullanım alanları, <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/dna.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 9 Haziran 2019].
- Painter, J., Slutsker, L., 2007, *Listeriosis in humans*, *Listeria listeriosis and food safety*, In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (eds.), Chapter 4, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 100-101.
- Palumbo, J.D., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Gorski, L., 2003, Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting, *Journal of clinical microbiology*, 41 (2) 564-571.
- Parish, M.E., Higgins, D.P., 1989, Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems, *Journal of food protection*, 52 (3), 144-147.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M., 1997, Antibiotic resistance spread in food, *Nature*, 389 (6653), 801-802.
- Perrin, M., Bemer, M., Delemare, C., 2003, Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia, *Journal of clinical microbiology*, 41 (11), 5308-5309.
- Petran, R.L., Zottola, E.A., 1989, A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* scott A, *Journal of food science*, 54 (2), 458-460.
- Phillips, T., 2019, *RFLP and the DNA analysis applications*, <https://www.thebalance.com/rflp-definition-and-dna-analysis-applications-375574>, [Ziyaret Tarihi: 2 Temmuz 2019].

- Pinner, R.W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Reeves, M., Broome, C.V., Wenger, J.D., Listeria Study Group, 1992, Role of foods in sporadic listeriosis II. Microbiologic and epidemiologic investigation, *The journal of the american medical association*, 267 (15), 2046-2050.
- Pirie, J.H.H., 1927, A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease", *Publications of the south african institute for medical research*, 3, 163-186.
- Pirie, J.H.H., 1940, *Listeria*: change of name for a genus of bacteria, *Nature*, 145, 264.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., Hinrichs, D.J., 1988, Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*, *The journal of experimental medicine*, 167 (4), 1459-1471.
- Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P.A., Courtieu, L., Courvalin, P., 1990, Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*, *Lancet*, 335 (8703), 1422-1426.
- Rahimi, E., Momtaz, H., Sharifzadeh, A., Behzadnia, A., Ashtari, M. S., Esfahani, Z., Riahi, M., Momeni, M., 2012, Prevalance and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from traditional dairy products in chahar mahal bakhtiyari iran, *Bulgarian journal of veterinary medicine*, 15 (2), 115-122.
- Rahman, T., Sarma, D.K., Goswami, B.K., Upadhyaya, T.N., Choudhury, B., 1985, Occurrence of listerial meningoencephalitis in pigs, *Indian veterinary journal*, 62, 7-9.
- Rocourt, J., 1999, *The genus Listeria and Listeria monocytogenes phylogenetic position taxonomy, and identification*, *Listeria listeriosis and food safety*, In: Ryser, E.T., Marth E.H. (eds.), Chapter 1, Marcel Dekker, New York, USA, 9-11.
- Rocourt, J., Cossart, P., 1997, *Listeria monocytogenes*, Food microbiology fundamentals and frontiers, In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds.), Chapter 3, American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington DC, 237-352.
- Rocourt, J., Grimont, P.A.D., 1983, *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov., *International journal of systematic bacteriology*, 33 (4), 866-869.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., Brille, J., 1986, Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult, *Schweizerische medizinische wochenschrift*, 116 (8), 248-251.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., Piffaretti, J.C., 1992, Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species *Listeria grayi* with a revised description of *Listeria grayi*, *International journal of systematic bacteriology*, 42 (1), 171-174.
- Rocourt, J., Seeliger, H.P.R., 1985, Distribution des especes du genre *Listeria*, *Zentralblatt fur bakteriologie mikrobiologie und hygiene series A*, 259 (3), 317-330.
- Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S.M., Holo, H., 2005, Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR, *Letters in applied microbiology*, 40 (4), 301-306.

- Sauders, B., 2005, *Molecular epidemiology diversity distribution, and ecology of Listeria*, Thesis (PhD), Cornell University.
- Sauders, B.D., Durzak, M.Z., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A.J.Jr., Akey, B., Nightengale, K.K., Wiedmann, M., 2006, Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments, *Journal of food protection*, 69 (1), 93-105.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., 1983, Epidemic Listeriosis evidence for transmission by food, *The New England journal of medicine*, 308 (4), 203-206.
- Schmid, M.W., Ng, E.Y.W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 2005, Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes, *Systematic and applied microbiology*, 28 (1), 1-18.
- Schuchat, A., Lizano, C., Broome, C.V., Swaminathan, B., Kim, C., Winn, K., 1991a, Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil, *The pediatric infectious disease journal*, 10 (3), 183-189.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C.V., 1991b, Epidemiology of human listeriosis, *Clinical microbiology reviews*, 4 (2), 169-183.
- Seeliger H.P.R., 1981, Apathogene *Listerien*: *Listeria innocua* sp. nov., *Zentralblatt für bakteriologie Pparasitenkunde infektionskrankheiten und hygiene*, 249, 487-493.
- Seeliger, H.P.R., Hähne, K., 1979, Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species, *Methods in microbiology*, 13, 31-49.
- Seeliger, H.P.R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P.A.D., Jones, D., 1984, *Listeria ivanovii* sp. nov., *International journal of systematic bacteriology*, 34 (3), 336-337.
- Shahamat, M., Seaman, A., Woodbine, M., 1980, Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations, *Zentralblatt für bakteriologie*, 246 (4), 506-511.
- Shank, F.R., Elliot, E.L., Wachsmuth, I.K., Losikoff, M.E., 1996, US position on *Listeria monocytogenes* in foods, *Food control*, 7 (4), 229-234.
- Skalka, B., Smola, J., Elischerova, K., 1982, Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains, *Journal of clinical microbiology*, 15 (3), 503-507.
- Slade, P. J., Collins-Thompson, D.L., 1990, *Listeria* plasmids antibiotic resistance and food, *Lancet*, 336 (8721), 1004.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, N.E., Holt, J.G., 1986, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Southwick, F.S., Purich, D.L., 1996, Intracellular pathogenesis of listeriosis, *The New England journal of medicine*, 334 (12), 770-776.

- Srinivasan, V., Nam, H.M., Nguyen, L.T., Tamilselvam, B., Murinda, S.E., Oliver, S.P., 2005, Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms, *Foodborne pathogens and disease*, 2 (3), 201-211.
- Steinweg, C., Kuenne, C.T., Billion, A., Mraheil, M.A., Domann, E., Ghai, R., Barbuddhe, S. B., Karst, U., Goesmann, A., Puhler, A., Weisshaar, B., Wehland, J., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., Chakraborty, T., Hain, T., 2010, Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*, *Journal of bacteriology*, 192 (5), 1473-1474.
- Swaminathan, B., Hunter S.B., Desmarchelier, P.M., Gerner-Smidt, P., Graves, L.M., Harlander, S., Hubner, R., Jacquet, C., Pedersen, B., Reineccius, K., Ridley, A., Saunders, N.A., Webster, J.A., 1996, WHO sponsored international collaborative study to evaluate methods for subtyping *Listeria monocytogenes*: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and southern hybridization with two probes derived from *L. monocytogenes* chromosome, *International journal of food microbiology*, 32, 263-278.
- Şanlıbaba, P., Tezel, B.U., Çakmak, G.A., 2018, Detection of *Listeria* spp. in raw milk and dairy products retailed in Ankara, *Gıda the journal of food*, 43 (2), 273-282.
- Şener, A., Celasin, N., 2013, Bacterial contamination in fresh white cheeses sold in bazaars Canakkale Turkey, *International food research journal*, 20 (3), 1469-1472.
- Tappero J.W., Schuchat A, Deaver, K.A., Mascola, L., Wenger, J.D., 1995, Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States effectiveness of prevention efforts, *The journal of the american medical association*, 273 (14), 1118-1122.
- Tekinşen, O.C., Patır, B., Alkan, M., 1993, Şavak peynirinde koliform grubu mikroorganizmalar üzerine araştırmalar, *Selçuk Üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 9 (2), 8-12.
- Telli, N., 2012, *Listeria monocytogenes*'in salamura beyaz peynir üretim hattında kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve PFGE metodu ile genotiplendirilmesi, Doktora, Selçuk Üniversitesi.
- Temelli, S., Anar, Ş., Sen, C., Akyuva, P., 2006, Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production, *Food control*, 17 (11), 856-861.
- Türe, M., Altınok, İ., 2013, Pulsed-field jel elektroforez (PFGE) metodu ve akuatik organizmalarda kullanımı, *Eğirdir su ürünleri fakültesi dergisi*, 9 (1), 44-54.
- Ueda, S., Maruyama, T., Kuwabara, Y., 2006, Detection of *Listeria monocytogenes* from food samples by PCR after IMS plating, *Biocontrol science*, 11 (3), 129-134.
- Uğur, A., 2001, Muğla halk pazarında satışa sunulan ev yapımı peynirlerin mikrobiyolojik özellikleri, *Ekoloji dergisi*, 2001, 40 (10), 3-8.

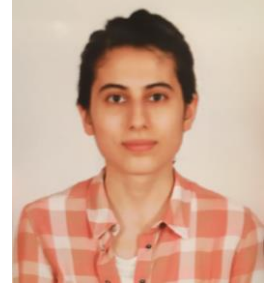
- Urhan, G., 2012, *Ankara'da Çeşitli Kaynaklardan Satın Alınan Beyaz Peynirlerin Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü Üzerinde Araştırmalar*, Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi.
- USDA, 2013, *Isolation and identification of Listeria monocytogenes from red meat poultry and egg products and environmental samples*, <https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/MLG-8.pdf>, [Ziyaret tarihi: 18 Mayıs 2019].
- Wagner, M., McLauchlin, J., 2008, *Biology and pathogenicity*, Handbook of *Listeria monocytogenes*, In: Liu, D. (ed.), Chapter 1, Taylor and Francis Group, New York, USA, 14.
- Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2001, Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods, *Journal of applied microbiology*, 90 (4), 517-522.
- Watkins, J., Sleath, K.P., 1981, Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage sewage sludge and river water, *Journal of applied bacteriology*, 50 (1), 1-9.
- Watson, G.W., Fuller, T.J., Elms, J., Kluge, R.M., 1978, *Listeria cerebritis* relapse of infection in renal transplant patients, *Archives of internal medicine*, 138 (1), 83-87.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., Bakker, H.C., 2015, *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65 (1), 286-292.
- Welshimer, H.J., Donker-Voet, J., 1971, *Listeria monocytogenes* in nature, *Applied microbiology*, 21 (3), 516-519.
- Weis, J., Seeliger H.P.R., 1975, Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature, *Applied microbiology*, 30 (1), 29-32.
- Van Netten, P., Perales, I., Van de Moosdijk, A., Curtis, G.D.W., Mossel, D.A.A., 1989, Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp., *International journal of food microbiology*, 8 (4), 299-316.
- Van Treuren, R., 2019, *Random amplified polymorphic dna (RAPD)*, <https://www.wur.nl/en/show/Random-Amplified-Polymorphic-DNA-RAPD.htm>, [Ziyaret Tarihi: 2 Temmuz 2019].
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J., 2001, *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clinical microbiology reviews*, 14 (3), 584-640.
- Vicente, M.F., Berenguer, J., de Pedro, M.A., Perez-Diaz, J.C., Baquero, F., 1990, Penicillin binding proteins in *Listeria monocytogenes*, *Acta microbiologica hungarica*, 37 (2), 227-231.
- Yavuz, N., 2015, *Kütahya ilinde tüketime sunulan gıdalarda Listeria monocytogenes varlığının araştırılması*, Yüksek Lisans, Dumlupınar Üniversitesi.

Zhang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A.A., Meng, J., 2007, Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods, *International journal of food microbiology*, 113 (1), 47-53.



## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Adı Soyadı       | Nil Kaya                                                                 |
| Doğum Yeri       | Kağızman                                                                 |
| Doğum Tarihi     | 11.08.1993                                                               |
| Uyruğu           | <input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer: |
| Telefon          | 0533 035 04 41                                                           |
| E-Posta Adresi   | nilkaya7@outlook.com                                                     |
| Web Adresi       |                                                                          |



| Eğitim Bilgileri |                       |
|------------------|-----------------------|
| Lisans           |                       |
| Üniversite       | İstanbul Üniversitesi |
| Fakülte          | Fen Fakültesi         |
| Bölümü           | Biyoloji              |
| Mezuniyet Yılı   | 17.06.2015            |

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

| Makale ve Bildiriler                                                                                                                                                                                                                            |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Kaya, N., Arslan-Aydoğdu, E., Kimiran, A., 2017, Investigation of the presence of <i>Listeria monocytogenes</i> in white cheese samples presented for consumption in Istanbul, 10th Balkan congress of microbiology, 16-18 November 2017 Sofia. |  |