T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

NİĞDE'DE SATIŞA SUNULAN ÇİĞ SÜTTEN YAPILMIŞ PEYNİR ÖRNEKLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VARLIĞININ, SEROTİP DAĞILIMININ VE ANTİMİKROBİYEL DİRENÇLİLİK PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Fulden KARADAL

Danışman
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

Doktora Tezi

Ocak 2013
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

NİĞDE'DE SATIŞA SUNULAN ÇİĞ SÜTTEN YAPILMIŞ PEYNİR ÖRNEKLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VARLIĞININ, SEROTİP DAĞILIMININ VE ANTİMİKROBİYEL DİRENÇLİLİK PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Fulden KARADAL

Danışman
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-11-3452 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Doktora Tezi

Ocak 2013
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı- Soyadı:

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Niğde'de satışa sunulan çiğ sütten yapılmış peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* varlığının, serotip dağılımının ve antimikrobiyel dirençlilik profilinin belirlenmesi" adlı **Doktora tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan	**Danışman**
Fulden KARADAL	**Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM**

Veteriner Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD Başkanı V.
Yard. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ

Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM danışmanlığında **Fulden KARADAL** tarafından hazırlanan **Niğde'de satışa sunulan çiğ sütten yapılmış peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* varlığının, serotip dağılımının ve antimikrobiyel dirençlilik profilinin belirlenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Veteriner Gıda Hijyeni ve Teknolojisi** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

19/01/2013

JÜRİ: **İMZA**

Danışman : Doç.Dr. Yeliz YILDIRIM

Üye : Prof.Dr. Ümit GÜRBÜZ

Üye : Prof.Dr.Mustafa ATASEVER

Üye : Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY

Üye : Yrd.Doç.Dr. Nurhan ERTAŞ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun..... tarih ve ...sayılı kararı ile onaylanmıştır.

../../.

Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın bütün aşamalarında yaratıcı zekası, sonsuz güveni ve desteği ile gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, laboratuar bilgisini ve arkadaşlığını benden esirgemeyerek bu zorlu süreci her zaman hatırlayacağım mutlu anılara dönüştüren Yard. Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ'a, yardımlarından dolayı Araş. Gör. Serhat AL ve Yard. Doç. Dr. Seçil ABAY'a, oluşturduğu vizyonla hepimize örnek olan Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi, akademik çalışmaları ile bana ilham veren babam Alaettin CEYLAN'a ithaf etmek istiyorum.

Fulden KARADAL

Kayseri, Ocak, 2013

NİĞDE'DE SATIŞA SUNULAN ÇİĞ SÜTTEN YAPILMIŞ PEYNİR ÖRNEKLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VARLIĞININ, SEROTİP DAĞILIMININ VE ANTİMİKROBİYEL DİRENÇLİLİK PROFİLİNİN BELİRLENMESİ

Fulden KARADAL

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ocak, 2013

Danışman: Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM

ÖZET

Bu çalışma, Niğde ili köy ve pazarlarında tüketime sunulan çiğ sütten yapılmış peynirlerin listeriozis açısından taşıdığı halk sağlığı risklerini değerlendirmek ve peynirlerden elde edilen izolatların serotip dağılımını ve mikrobiyel direnç profillerini belirleyerek tedavi sürecine katkıda bulunmak amacıyla planlanmıştır. Çalışma kapsamında 200 çiğ sütten yapılmış yerel peynir örneği (100 taze beyaz peynir ve 100 tulum peyniri) *Listeria monocytogenes* açısından klasik kültür tekniği ile analiz edilmiş ve PCR ile doğrulanmıştır. Beyaz peynir örneklerinden 1'inin (% 1) ve tulum peyniri örneklerinden yine 1'inin (% 1) olmak üzere toplam 2 (% 1) örneğin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu ortaya konmuştur. *L. monocytogenes* izolatlarının serotip dağılımı 1/2a (beyaz peynir izolatı) ve 4a (tulum peyniri izolatı) olarak belirlenmiştir. Son olarak izolatların hayvan ve insan tedavisinde sıklıkla kullanılan toplam 11 antibiyotiğe (Tetrasiklin, Siprofloksasin, Gentamisin, Ampisilin, Eritromisin, Trimetoprim, Vankomisin, Kloramfenikol, Nalidiksik asit, Penisilin G ve Sülfonilamid) karşı direnç profilleri belirlenmiş ve MIC değerleri ortaya konmuştur. İzolatların her ikisinin de nalidiksik asite dirençli, diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak incelenen örneklerde *L. monocytogenes* prevalansının çok düşük düzeylerde bulunmasına karşın insan listeriozisinden ikinci sırada sorumlu tutulan 1/2a serotipinin belirlenmiş olması halk sağlığı açısından risk unsuru olarak değerlendirilmiştir. *L. monocytogenes*'in diğer bakterilere göre oldukça yavaş antimikrobiyel direnç kazanma özelliği göz önünde bulundurularak, özellikle hayvansal gıdalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının antimikrobiyel direnç profillerinin sürekli gözetim altında tutulması halk sağlığı açısından önem arzetmektedir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyel direnç, *Listeria monocytogenes*, PCR, peynir, serotip dağılımı.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND SEROTYPE DISTRIBUTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATED FROM RAW MILK CHEESE SAMPLES SOLD AT RETAIL IN NIĞDE

Fulden KARADAL

Erciyes University, Institue of Health Sciences

Department of Veterinary Food Hygiene and Technology

Phd Thesis, January, 2013

Supervisor: Associated Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM

ABSTRACT

This study was designed to evaluate public health risks in respect to listeriozis due to consumption of local raw milk cheese sold at retail in villages and public bazaars of Niğde. In addition, this study aims to contribute to the treatment process of listeriozis by determining serotype distribution and microbial resistance profiles of the isolates. During the work, 200 local raw milk cheese samples (100 white and 100 tulum cheeses) were analysed by classical culture technique in terms of *Listeria monocytogenes* and confirmed by PCR. One of white (1 %) and one of tulum cheese (1 %) samples, totally 2 (1 %) of all samples were found contamined with *L. monocytogenes.* Serotype distribution of the isolates were determined as 1/2a (white cheese isolate) and 4a (tulum cheese isolate). Finally, antimicrobial resistance profiles of the isolates against 11 antibiotics (Tetracycline, Ciprofloxacin, Gentamicin, Ampicillin, Erythromycin, Trimethoprim, Vancomycin, Chloramphenicol, Nalidixic acid, Penicillin G and Sulphanilamide) frequently used for both animal and human treatments were determined and the MIC values were specified. Both of the isolates were found to be resistant to nalidixic acid but sensitive to the others analysed. As a result, although low *L. monocytogenes* prevalance rates were detected in this study, it is a public health concern to isolate serotype 1/2a which is secondly incriminated serotype to cause human listeriozis. In addition, it is important in terms of public health to continue surveillance of emerging antimicrobial resistance among *L. monocytogenes* isolated especially from foods of animal origine as this pathogen much slowly develops antimicrobial resistance compared to other bacteria.

Keywords: Antimicrobial resistance, cheese, *Listeria monocytogenes*, PCR, serotype distribution.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK… i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI…… iii
KABUL VE ONAY SAYFASI..…….....iv
TEŞEKKÜR…….....v
ÖZET…… vi
ABSTRACT…… vii
İÇİNDEKİLER…….....viii
KISALTMALAR…….....xi
TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ……. xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER.....4
2.1. TARİHÇE 4
2.2. *LISTERIA* TÜRLERİNİN VE *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN TAKSONOMİSİ.....5
2.3.*LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN MORFOLOJİSİ VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ 8
2.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN FİZYOLOJİSİ 10
2.4.1. Üreme Özellikleri 10
2.4.2. Stres Toleransı 13
2.4.2.1. Isı Stresi Yanıtları.....13
2.4.2.2. Asit Stresi Yanıtları 14
2.4.2.3. Ozmotik Stres Yanıtları 15
2.4.2.4.Stresten Çapraz Korunma 15
2.4.3. Virülans Faktörleri.....16
2.5. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN ANTİBİYOTİK DİRENCİ 29
2.5.1. Doğal Direnç 21
2.5.2. Kazanılmış Direnç 22
2.5.3. Çoklu Direnç 25
2.6. *LISTERIA MONOCYTOGENES* ENFEKSİYONLARI 26
2.6.1. Epidemiyoloji, Bulaşma Yolları ve Tiplendirme.....26
2.6.2. Hayvanlarda Listeriozis 29
2.6.3. İnsanlarda Listeriozis 30
2.7. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN ÇEVREDE DAĞILIMI……...32
2.8. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN GIDALARDA BULUNUŞU 33

2.8.1. Deniz Ürünleri 33
2.8.2. Et ve Et Ürünleri 34
2.8.3. Sebze ve Meyveler 37
2.8.4. Tüketime Hazır Gıdalar 38
2.8.5. Süt ve Süt Ürünleri 38
2.8.5.1. Peynirde *Listeria monocytogenes* 40
2.8.5.2. Diğer Süt Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* 43
3. GEREÇ VE YÖNTEM 44
3.1. GEREÇ 44
3.1.1. Materyal 44
3.1.2. Standart Suş 44
3.1.3. *Listeria* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar 44
3.1.3.1. Half Fraser Broth 44
3.1.3.2. Oxford Listeria Selective Agar 45
3.1.3.3. Kanlı Agar 45
3.1.3.4. Tryptic Soy Broth 46
3.1.3.5. Oksidaz Test 47
3.1.3.6. Katalaz Test 47
3.1.3.7. *Listeria* spp. İdentifikasyon Kiti 47
3.1.4. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar 47
3.1.4.1. Axygen Biosiciences AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit 47
3.1.4.2. *Taq* DNA Polymerase Seti 47
3.1.4.3. dNTP Seti 48
3.1.4.4. Gene Ruler Seti 48
3.1.4.5. Primerler 48
3.1.4.6. 10 X TBE Stok Solüsyonu 48
3.1.4.7. Ethidium Bromide 48
3.1.4.8. Agaroz Jel 48
3.1.5. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri, Antibiyotikler, Çözücü ve Sulandırıcılar 48
3.1.5.1. Mueller Hinton Buyyon Katyon- Ayarlanmış 48
3.1.5.2. Antibiyotikler 48
3.1.5.3. Çözücüler 49
3.1.5.4. Sulandırıcılar 50

,

3.1.6. *Listeria monocytogenes*'in serotiplendirilmesinde kullanılan gereçler 50
3.1.6.1. *Listeria* Antisera Set Denka Seiken 50
3.1.6.2. Brain Heart Infusion Agar 51
3.1.6.3. Brain Heart Infusion Broth....51
3.1.6.4. %0.3 Agar İçeren Brain Heart Infusion Broth....52
3.2. YÖNTEM 52
3.2.1. Peynir Örneklerinden *Listeria monocytoges* İzolasyonu....52
3.2.2.Biyokimyasal Testler 55
3.2.2.1. β-Hemoliz....55
3.2.2.2. Gram Boyama....56
3.2.2.3. Katalaz Test....56
3.2.2.4. Oksidaz Test 57
3.2.2.5. Hareket Muayenesi 57
3.2.2.6. Microbact Testi....57
3.2.3. PCR Tekniği 58
3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu 58
3.2.3.2. PCR Amplifikasyonu 59
3.2.3.3. Elektroforez 60
3.2.4. Serotiplendirme 60
3.2.4.1. O antijeninin Tanımlanması 60
3.2.4.2. H Antijeninin Tanımlanması 62
3.2.5. Antibiyotik Direnç Testi....63
3.2.5.1. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması 63
3.2.5.2. Broth Mikrodilüsyon Testi 66
3.2.5.2.1. Katyonu Ayarlanmış ve %5 Lize At Kanı İçeren Mueller Hinton Broth Hazırlanması....66
3.2.5.2.2. Antibiyotiklerin İlave Edilmesi 66
3.2.5.2.3. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması 66
4. BULGULAR....69
4.1. Klasik Kültür ve Biyokimyasal Test sonuçları 70
4.2. PCR sonuçları 71
4.3. Serotiplendirme Sonuçları 72
4.4. Broth Mikrodilüsyon Testi Sonuçları 73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....75
6. KAYNAKLAR 85
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

aad6	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
actA	Actin activity
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
aph	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase
AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
$\mathbf{a}_w$	Activity of water
BetL	Betaine transport
bilE	Bile exclusion system
bsh	Bile salt hydrolase
CAMP	Christie Atkins Munch Petersen
cat	Chloramphenicol acetyltransferase
CDC	Center for Disease Control and Prevention
Clp	Caseinolytic protein
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic acid
dfr	Dihydrofolate reductase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EN	Europeane Norm
erm	Erythromycin ribosomal methylase
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
g	Gram
Gbu	Glycine betaine porter
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
hlyA	Hemolysin A
htp	Hexose phosphate transporter
HsPs	Heat shock proteins
ISO	International Organization for Standardization
iap	Invasion associated protein
inl	Internalin

int	Integrase
kGy	Kilo Gray
kob	Koloni oluşturan birim
LLO	Listeriolysin O
log	Logaritmik birim
LPXTG	Leucine-Proline-any- Threonine - Glycine
ltr	Low temperature requirement
mef	Macrolide efflux
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MLST	Multilocus Sequence Based Typing
mpl	Metalloprotease
NaCl	Sodyum klorür
$NaNO_2$	Sodyum nitrit
NASBA	Nucleic Asid Sequence Based Amplification
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Disease
OppA	Oligopeptide binding protein
OpuB	Osmoprotectant uptake B
OpuC	Osmoprotectant uptake C
orfX	Open reading frame X
orfZ	Open reading frame Z
PBPs	Penicillin-binding proteins
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC-PLC	Fosfatidilkolin fosfolipaz C
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR- RFLP	PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH	Power of Hydrogen
PI-PLC	Fosfatidilinositole fosfolipaz C
plcA	Phospholipase A
plcB	Phospholipase B
prfA	Positive regulatory factor A

QRDR	Quinolone resistance determining regions
RADP	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR :	Reverse Transcription PCR
σ^B	Alternatif sigma faktör
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
tet	Tetracycline resistance gene
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TMP-STX	Trimethoprim-sulphamethoxazole
TSA	Tyriptic Soy Agar
TSB	Tyriptic Soy Broth
USDA	United States Department of Agriculture
van	Vancomycin resistance gene

TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 2.1. *L. monocytogenes* alt grupları ve serotipleri 6
Tablo 2.2. *Listeria* türlerinin fenotipik özellikleri 9
Tablo 2.3. Gıda ve çevredeki *Listeria* türleri ve *L. monocytogenes*'in izolasyon, identifikasyon ve tiplendirilmesi için kullanılan metotlara genel bakış 12
Tablo 2.4. Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan listeriozis salgınlarından sorumlu tutulan gıdalar ve bu salgınlardan elde edilen izolatların serotipleri.....28
Tablo 2.5. Çiğ ve pastörize süt ile süt üretim çevrelerinde *L. monocytogenes* prevalansı .39
Tablo 2.6. TGK tarafından peynir çeşitleri için belirlenen mikrobiyolojik kriterler tebliği.....41
Tablo 3.1. Antibiyotiklerin sulandırma şeması ve kırılma noktaları.....65
Tablo 4.1. Klasik Kültür ve Biyokimyasal Test sonuçları 70
Tablo 4.2. Peynir Örneklerinde *Listeria* spp. Dağılımı 70
Tablo 4.3. *L. monocytogenes* izolatlarının serotip dağılımı.....73
Tablo 4.4. Tulum ve beyaz peynirlerden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının kırılma noktaları, MIC değerleri ve antimikrobiyel direnç profilleri 74
Tablo 5.1. Serotip 1/2a'nın izole edildiği önemli listeriozis salgınları.....78
Şekil 2.1. Enfekte hüceredeki aktin kuyrukları……. 18
Şekil 2.2. *L. monocytogenes*'in hücre içinde üremesi ve komşu hücreye geçişi 18
Şekil 3.1. Horizontal yöntemle *L. monocytogenes* izolasyonu 53
Şekil 3.2. Half Fraser Broth ile ön zenginleştirme aşaması.....54
Şekil 3.3. Fraser Broth ile selektif zenginleştirme aşaması.....54
Şekil 3.4. Oxford Listeria Selektiv Agar'a ekim aşaması 55
Şekil 3.5. Gram boyama aşaması.....56
Şekil 3.6. Microbact Test Kiti 57
Şekil 3.7. Brain Heart Infusion Agar'da *L. monocytogenes* kolonileri 61
Şekil 3.8. Lam üzerinde aglitünasyon görüntüsü.....61
Şekil 3.9. Hareketli izolatların yukarı doğru üremesi 62
Şekil 3.10. Aglütinasyon tüplerinde H antijeni tespiti 63
Şekil 3.11. Antibiyotik stok solüsyonları.....64
Şekil 3.12. 0.5 Mc Farland bulanıklığı.....67
Şekil 3.13. İnkubasyon sonunda 96 kuyucuklu steril U plate'de bakteri üremesi 68
Şekil 3.14. Oxford Listeria Selectiv Agar'da üreme.....68
Şekil 4.1. Peynir Örneklerinde *Listeria* spp. dağılımı……. 71
Şekil 4.2. *L. monocytogenes*'e spesifik *hlyA* geninin 840 bp'lık bantın görüntüsü 72

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Geçtiğimiz 10-15 yıl içerisinde *Listeria monocytogenes'*den kaynaklanan gıda enfeksiyonları büyük önem kazanmıştır. Listeriozis tüm dünyada oldukça yaygındır. Etkenin doğada, özellikle toprak ve çevrede yaygın olarak bulunması gıdaların kontaminasyonunu ve buna bağlı olarak gıda kaynaklı listeriozis sıklığını artırmaktadır.

Doğada yaygın olarak bulunan *L. monocytogenes'*e çoğunlukla kanalizasyon, bataklık, nehir suyu ve sebzelerde rastlanmaktadır (1,2,3). Ayrıca hayvan yemlerinden, sağlıklı ve mastitisli ineklerin sütlerinden, hasta insan ve hayvan dışkısından, kemirgenlerden, bazı sebzelerden, bazı peynir çeşitlerinden de çok sayıda *Listeria* izolasyonu yapılmıştır (4,5,6,7,8). Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan *L. monocytogenes*'e ilişkin enfeksiyon olgularından genellikle yetersiz pastörizasyon işlemleri ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonlar sorumlu tutulmaktadır (9). *L. monocytogenes* özellikle hijyeninin yetersiz olduğu, üretim ve muhafaza koşullarının uygun olmadığı, ürün yapımında çiğ sütün kullanıldığı, hatalı pastörizasyon işlemlerinin uygulandığı ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonların önüne geçilmediği durumlarda süt ve süt ürünlerinde yaygın olarak bulunabilmektedir.

Listeria monocytogenes'in insan ve hayvanlar için patojen olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Hastalık oldukça düşük bir insidensle seyretmesine rağmen risk grubunda bulunan bireylerde yaklaşık % 30'lara varan ölüm oranlarına ulaşması hastalığın ciddiyetini ortaya koymaktadır (10,11).

Son zamanlarda antimikrobiyel ajanların hayvan yetiştiriciliğinde hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde ve hatta büyümeyi destekleyici olarak kullanılması, dirençli bakterilerin gelişmesine ve bu bakterilerin gıda zinciriyle insanlara taşınmasına neden olmuştur (12.13). Hayvansal gıdalardan geçebilecek dirençli bakterilerin insanlarda yaratabileceği sağlık problemlerine ilişkin halk bilinci artmaktadır. Bunun yanı sıra hayvan ve hayvansal gıdaların dünya çapında ticareti söz konusudur. Bu durumda bütün ülkelerde hayvanlardan elde edilen izolatlarda direnç varlığını belirlemek için standart bir izleme sisteminin kullanılması ve etkin bir biçimde yürütülmesi gerekmektedir (14). Antibiyotiklere dirençli bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlara ilişkin tedavi problemlerinin son derece endişe verici boyutlara ulaşmasından dolayı gıda yoluyla maruz kalınan bakterilerin dirençlilik profillerinin ortaya konması son dönemlerde bilim çevrelerinin önemle üzerinde durduğu bir konu halini almıştır (15).

Türkiye'de sağım hijyeninin yeterli olmaması, peynir yapımında çiğ sütün kullanılması, hatalı pastörizasyon uygulamaları ve üretimin uygun olmayan koşullarda gerçekleştirilmesinin yanı sıra pastörizasyon sonrası kontaminasyonların meydana gelmesi sonucu süt ve ürünleri *L. monocytogenes* ile sıklıkla kontamine olabilmekte ve bu şekilde üretilen süt ve süt ürünlerinin tüketime sunulması halk sağlığı açısından risk teşkil etmektedir.

Bu çalışmada, Niğde ve köylerinde satışa sunulan çiğ sütten yapılmış beyaz peynir ve tulum peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* varlığı öncelikle klasik kültür tekniği ile belirlenmiştir. Kültür tekniği ile *L. monocytegenes* olduğu belirlenen izolatların Polymerase Chain Rection (PCR) tekniği ile doğrulamasının ardından Denka Seiken antiserum seti kullanılarak serotip tayini yapılmıştır. Son olarak, elde edilen izolatların antimikrobiyel duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu sayede Niğde ve köylerinde sıklıkla tüketilen çiğ sütten yapılmış beyaz peynir ve tulum peynirlerinin *L. monocytegenes* açısından taşıdığı halk sağlığı riski ve etkenin antimikrobiyellere karşı dirençlilik profili ortaya konulmuştur.

Küçük çapta üretim yapan işletmelerde özellikle de çiğ sütten yapılan peynirlerde birçok patojen bulunabilmekte ve halk sağlığı riski yaratabilmektedir. Bu çalışma çiğ sütten yapılan ve halk pazarlarında satışa sunulan yerel peynirlerin tüketilmesiyle özellikle listeriozis açısından karşı karşıya kalınan sağlık risklerini değerlendirmek amacıyla planlanmıştır. Elde edilen izolatların hayvan ve insan tedavisinde sıklıkla kullanılan toplam 11 antibiyotiğe karşı direnç profillerinin belirlenmesiyle de hastalığın tedavi sürecinde karşılaşılabilecek problemlere işaret etmek amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Listeria türleri ilk kez 1891 yılında Almanya'da, etkenin hastaların doku örneklerinden izole edilmesi ile bildirilmiştir. Murray, 1926 yılında laboratuar rodentlerinde çıkan bir salgından izole etikleri bakteriye mononükleer lökositoza neden olması sebebiyle *Bacterium monocytogenes* ismini vermişlerdir. Nyfelt 1929'da bakterinin insanlar için de patojen olduğunu bildirmiş ve etkeni *Bacterium monocytogenes hominis* olarak adlandırmıştır. Pirie, 1927 yılında bakteriyi vahşi gerbillerden izole ederek cins isminin cerrah Lord Lister'e atfen *Listerella hepatica* olmasını önermiştir. Murray ve Pirie'nin isimleri birleştirmesiyle *Listerella monocytogenes* ismi oluşturulmuş, daha sonra yapılan taksonomik çalışmalarla bakterinin ismi *L. monocytogenes* olarak değiştirilmiştir (16).

Gıda kaynaklı ilk listeriozis vakası ise 1953 yılında, *L. monocytogenes*'in sebep olduğu mastitisli bir ineğin sütünün içilmesi ile tanımlanmıştır. Söz konusu vakada kontamine sütü tüketen hamile kadının ikiz bebeklerinin öldüğü bildirilmiştir (17). Almanya'da 1966 yılında 279, Fransa'da 1976 yılında 126 kişinin etkilendiği listeriozis vakaları bildirilse de 1981 yılında Kanada'da ortaya çıkan listeriozis salgınına kadar insan enfeksiyonları çok dikkat çekmemiştir (18).

Mortalitenin yüksek olması (% 20-30) hastalığın önemini arttırmaktadır. Her yıl yaklaşık 1600 listeriozis enfeksiyonunun görüldüğü, bunların 400 ila 500 kadarının ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir (19).

2.2. *LISTERIA* TÜRLERİNİN VE *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN TAKSONOMİSİ

Gram pozitif, sporsuz ve katalaz pozitif *Listeria* cinsi bakteriler başlangıçta Corynebacteriaceae familyası içinde sınıflandırılmıştır. *Firmicutes* filusunun rRNA alt unite sekanslarının karşılaştırılması sonucu *Listeria* ve *Brochothrix* cinslerinin, *Firmicutes* filusunun, *Bacilli* sınıfının, *Bacillales* takımının, *Listeriaceae* familyasına ait olduğu bildirilmiştir (20,21).

Listeria monocytogenes 1961 yılına kadar soyunun tek türü olarak kabul edilmiş fakat daha sonra *Listeria grayi, Listeria innocua, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri, Listeria welshimeri* ve *Listeria murrayi* olarak 6 tür daha belirlenmiştir (21). Yapılan çeşitli moleküler çalışmalar ile *L. murrayi*'nin *L. grayi*'nin alttürü olduğu ortaya çıkmıştır (22). *Listeria marthii* ve *Listeria rocourtiae* isimli iki yeni tür ise 2009 yılında rapor edilmiştir (23).

Listeria türlerinden *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. innocua* memeliler için patojendir (24). *L. ivanovii* ve *L. innocua* çoğunlukla ruminantlarda hastalık oluştururken, *L. monocytogenes* hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır (24). Literatürde *L. grayi*'nin immun sistemi baskılanmış hastalarda yol açtığı bakteriyemi ile ilgili 2 vaka bildirilmiştir (25,26).

Listeria monocytogenes, memeli hücrelerine invaze olup üreyen hücre içi bir bakteridir. Fakültatif saprofit patojen olarak toprakta ve çürümüş bitkilerde bulunabilmekte, insan veya hayvanlarda şiddetli bir enfeksiyon tablosu oluşturmaktadır (23).

Listeria monocytogenes ilk olarak 1940 yılında Paterson tarafından serotiplendirilmiş, bu metot Seeliger ve Hohne tarafından geliştirilmiştir (27). Flagellar ve somatik antijenlerine göre belirlenen *L. monocytogenes* serotiplerinin 4 alt grup altında toplandığı bildirilmiştir (28). *L. monocytogenes*'e ait serotipler Tablo 2.1'de yer almaktadır.

Tablo 2.1. *L. monocytogenes* alt grupları ve serotipleri (23)

Alt Grup	İlk İdentifikasyon	Serotipler	Genetik Karakter	Dağılımı
I	Multilokus Enzim Elektroforezis (MLLE) ile tanımlandı	1/2b, 3b, 3c, 4b, 4d, 4e	Serotipler arasında en az çeşitlilik ve rekombinasyon olan alt grup	Çeşitli kaynaklardan yaygın olarak izole edilir. Bunların arasında en çok insan izolatlarının temsilcileri bulunmaktadır.
II	MLLE ile tanımlandı	1/2a, 1/2c, 3a,	Serotipler arasında en çok çeşitlilik ve rekombinasyon olan alt grup	Çeşitli kaynaklardan yaygın olarak izole edilir. Bunların arasında en çok gıda ve gıda ile ilişkili çevreler ile doğal çevrenin temsilcileri bulunmaktadır.
III	Kısmi sekans bilgi analizi kullanılarak tanımlandı.	4a, 4b, 4c	Alt grup I ve II arasında yer alan düzeyde çeşitlilik arzeden seotipler	Sıklıkla ruminantlardan elde edilen izolatlar
IV	Kısmi sekans bilgi analizi kullanılarak IIIB ismi ile tanımlandı. Ward et al. tarafından alt grup IV olarak 2008'de ilk kez rapor edildi.	4a, 4b, 4c	Günümüze kadar çok az izolat analiz edildi.	Sıklıkla ruminantlardan elde edilen izolatlar

Altgrup I ve II'nin insan klinik ve gıda izolatlarından, altgrup III'ün ise hayvan klinik izolatlarından oluştuğu belirlenmiştir (23). Roberts et al. 2006 yılında yaptıkları sekans analizi ile III. altgrup a ve b olarak iki gruba ayrılmış, altgrup IIIb 2008 yılında Ward et al. tarafından altgrup IV olarak isimlendirilmiştir (28,29). Her altgruptan gelen izolatların enfeksiyon oluşturma potansiyeli ve stres koşullarında yaşayabilme kabiliyeti açısından farklılık gösterdiği bildirilmektedir (30). 1/2a serotiplerinin 4°C'de 0,1M Phosphate Buffer Saline'de (PBS) virulanslarının azaldığı, ancak aynı şartlarda 4b serotipinin virulansının azalmadığı belirlenmiştir (31). Serotip 1/2a'nın bakteriyosinlere diğer serotiplerden daha dirençli olması ve serotip 1/2a izolatlarının çevredeki toksik metallere ve bileşiklere karşı direnç göstermelerini sağlayan plazmidleri diğer serotiplerden daha fazla sayıda taşıması, gıdalardaki yüksek prevelansını açıklamaktadır (23). İnsan listeriozis vakalarının % 96'sından 1/2a, 1/2b ve 4/b serotipleri sorumlu tutulmaktadır (30).

Altgrup I'de yer alan daha patojen suşların ince bağırsak epitel hücreleri ve diğer hücre tiplerine invazyonunun altgrup II'dekilerden daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu farka sebep olarak da altgrup II' deki suşların *inlA* geninde oluşan stop kodonu gösterilmektedir. Bu genetik değişiklik altgrup I suşlarında çok nadir görülmektedir

(23). Doğal çevrelerine uyum göstermeyi kolaylaştırmak için *L. monocytogenes* suşları farklı gen setlerine sahiptir. Mesela, alt grup I ve II suşları alt grup III suşlarından daha fazla transkripsiyonel düzenleyici gen taşımaktadır (30). Altgrup III ve IV izolatları gıda ve gıda ile ilgili çevrelerde az bulunmaktadır. Asit ve ısı stresine cevap veren *Imo0038* geninin, altgrup I ve II izolatlarında bulunurken altgrup III ve IV izolatlarında bulunmaması ve bu serotiplerin hayvan yetiştirme çevrelerine gıda üretim çevrelerinden daha iyi adapte olması, söz konusu serotiplerin gıdalarda üreyememesinin sebepleri olarak gösterilmektedir (32). Liu et al. (33) tarafından avirülent olarak nitelendirilen 4a serotipine ait bir izolatın *lmo2821- InlJ* ve transkripsiyonal düzenleyici farzedilen *lmo2672, lmo1134* ve ORF2819 genlerini taşımadığı, farelere $8x10^7$ kob düzeyinde inokule ediğinde dahi ölüm oluşturmadığı bildirilmektedir.

Listeria monocytogenes'in suşları arasındaki farkları ayırt etmek için birçok gruplandırma metodu kullanılmaktadır. Serotiplerin fenotipik karakterlerini temel alan ticari antiserumlar ile serotiplendirme, faj tiplendirme ve izoenzim analizi gibi daha geleneksel metodların yanında ribotiplendirme, pulse-field gel electrophoresis (PFGE), random amplification polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment lenght polymorphism (AFLP), multilocus sequence based typing (MLST), PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve direkt DNA sekanslama gibi genotipik metodlar da bulunmaktadır (34,35,36). Bu metodlarla *L. monocytogenes*'in populasyon genetiği, ekolojisi ve bulaşma yolları hakkında bilgiler edinilmiştir. *L. monocytogenes* için PFGE'nin ribotiplendirme ve MLST'den daha ayırıcı bir metod olduğu belirtilmektedir (37).

Listeria monoctogenes 1/2a'da altgrup I'e spesifik 19 gen bulunmuş, ayrıca *Imo1118* ve *Imo1119* genlerinin sadece 1/2c ve 3c'de bulunduğu bildirilmiştir. *L. monoctogenes* 4b'de ise altgrup II'ye spesifik 5 gen bulunmuş ve bunlardan 3'ünün sadece 4b, 4d ve 4e'de olduğu bildirilmiştir (37). Doumith et al. (37), *L. monoctogenes* serotiplerini ayırt etmek için bir multiplex PCR protokolü geliştirmişlerdir. Ancak bu yöntemle 1/2a 3a'dan, 1/2b 3b ve 7'den, 1/2c 3c'den veya 4b 4d ve 4e'den ayırt edilememektedir. Bunların dışında Palumbo et al. (38) serotiplendirme antiserumlarını kendi geliştirdikleri Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) protokolü ile kullanarak daha güvenilir ve daha fazla örneğe uygulanabilen sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Genetik araştırmalar entitüsü, (The Institute of Genomic Research, TIGR) listeriozis salgınına neden olan üç *L. monocytogenes* suşunun gen sekanslarını yayınlamıştır: 1985'de California/ABD'de salgına neden olan ve peynirden izole edilen F2365 suşu ve 1998- 1999 yılları arasında ABD'de birçok eyalette salgına neden olan ve sosisten bulaşan H7858 suşunun serotip 4b; sporadik vakalardan izole edilen ve hindi sosisinden bulaştığı bildirilen F6854 suşunun ise serotip 1/2a olduğu bildirilmiştir (39). Son zamanlardaki insan listeriozis salgınlarından biri Finlandiya'da, bir hastanedeki immun sistemi baskılanmış hastalar arasında görülmüştür. Etkenin insan listeriozis enfeksiyonlarında çok nadir rastlanan 3a serotipine ait olduğu ve tereyağı tüketimi sonucu bulaştığı bildirilmiştir (40).

2.3.LISTERIA MONOCYTOGENES'İN MORFOLOJİSİ VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Listeria monocytogenes, mikroskop altında 0.4- 0.5 μm eninde ve 1- 2 μm boyunda, Gram pozitif, düzgün çubuk şeklinde, tek başına ya da kısa zincirler halinde görülür (41). Eskimiş kültürlerde gram boya alma özelliğini yitirip Gram negatif olarak görülebildiği gibi direkt frotilerde kokoid görüntü verebilir (20).

Listeria monocytogenes sporsuz, kapsülsüz, peritrik flagellaları ile hareket eden bir ajandır. Hareket yeteneği yarı katı besiyerinde, 30ºC'de, yukardan aşağıya doğru şemsiye şeklindeki üremesi ile gözlenebilir (42).

*Listeria monocytogenes'*in diğer *Listeria* türlerinden identifikasyonu için çeşitli biyokimyasal testler uygulanmaktadır (Tablo 2.2). Bunlara göre *L. monocytogenes,* diğer *Listeria* türleri gibi katalaz pozitif, oksidaz negatiftir ve eskülüni hidrolize eder. Ramnozu fermente ederek asit oluşturur, ksiloz ve mannitolü fermente edemez (43).

Tablo 2.2. *Listeria* türlerinin fenotipik özellikleri (44)

İn Vitro Karakter	Türler[a]					
	L.monocytogenes	***L. ivanovii***	***L. innocua***	***L.welsimeri***	***L. seeligeri***	***L. grayi***
Gram boyama	+	+	+	+	+	+
Katalaz testi	+	+	+	+	+	+
β-hemoliz	+	++	-	-	±	-
Lipaz üretimi	+	+	-	-	+	-
AA Peptidaz	-	+	+	+	+	+
Eskülin hidrolizi	+	+	+	+	+	+
β-D glikosidaz	+	+	+	+	+	+
Asit Üretimi						
D-mannitol	-	-	-	-	-	+
L-ramnoz	+	-	+	±	-	±
D-ksiloz	-	+	-	+	+	-
α-metil, D-mannosit	+	-	+	+	±	±
CAMP testi[b]						
S. aureus	+	-	-	-	+	-
R. equi	-	+	-	-	-	-

[a] +pozitif reaksiyon, - negatif reaksiyon, ±değişken ya da zayıf reaksiyon

[b] CAMP: Hemoliz reaksiyonunda artma

[c]++Güçlü hemolitik reaksiyon

Listeria monocytogenes hücre duvarında iki farklı polianyonik polimer bulunur. Bunlar peptidoglikana kovalent bağ ile bağlanmış teikoik asit (TA) ve lipoteikoik asittir (LTA). Bu polimerler hücre duvarı kuru maddesinin % 50–60'ını meydana getirir. Aynı zamanda bu polimerler, metal katyon dengesinde, iyon, besin maddesi ve protein taşınmasında ve yüzey proteinlerinin sabitlenmesinde önemli fonksiyonları vardır. Ayrıca TA ve LTA, *L. monocytogenes*'in serotipleri arasındaki temel farklılıkları belirlemektedir (45).

Listeria türlerinden *L. monocytogenes, L. ivanovii ve L. seeligeri* koyun, at ya da insan kanı eklenmiş kanlı agarda β-hemoliz yapmakla birlikte *L. ivanovii* diğer türlere göre daha geniş hemoliz alanı oluşturmaktadır. Söz konusu bakterilerin ayrımında CAMP testi kullanılmaktadır (46). Bu teste göre *L. monocytogenes* kanlı agarda *Staphylococcus aureus* ile; *L. ivanovii* ise *Rhodococcus equi* ile sinerjik hemolitik etki göstermektedir.

Listeria monocytogenes tarafından salgılanan A 58-kDa protein Listeriolisin O (LLO), *S. aureus* ile kombine bir şekilde koyun eritrositlerinde kuvvetli hemoliz oluşturmaktadır (47). CAMP testinde *L. monocytogenes*'i doğrulayan ve *S. aureus*'a doğru genişleyen karakteristik β-hemolitik zonu, *S. aureus*'un β-toksin'i ile LLO'un sinerjik etkisi ile oluşmaktadır (46). *L. seeligeri* de *S. aureus* ile sinerjik etki göstermektedir ancak oluşturduğu hemoliz alanı *L. monocytogenes*'e oranla daha dardır. Mathakia et al. (46), 28 *L. monocytogenes* suşunun 23'ünün *S. aureus*' a doğru genişleyen karakteristik hemolitik zon oluşturduğunu, 5'inin hemolizinin ise zayıf olduğunu belirtmişlerdir.

2.4. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN FİZYOLOJİSİ

2.4.1. Üreme Özellikleri

Bakteri psikrotrof özellikte olup 0- 45 ºC arasında üreyebilmektedir. Optimal üreme ısısı ise 30- 37ºC arasındadır (43). *L. monocytogenes*'in buzdolabı ısısında (4ºC) üreyebilmesi, ısı işlemi görmeyen ya da ısı işleminden sonra kontamine olan ve buzdolabında uzun süre muhafaza edilen tüketime hazır gıdalarda çoğalma riskini artırmaktadır (47). Öldürücü düzeyin altında ısıya maruz bırakıldığında bakteri termotoleransının arttığı kanıtlanmıştır (48). Süt ürünlerinde, buzdolabı ısısında bakteri sayısının iki katına çıkma süresinin 1-2 gün olduğu bildirilmektedir (49).

Listeria monocytogenes'in metabolizması anaerobik ve fakültatif anaerobik özellik göstermektedir (42). Nötral ya da hafif alkali ortamları tercih etse de pH 4.3 ile 9.6 arasında üreyebilmektedir. Bakterinin 3.0 ile 12.0 arasındaki pH değerlerinde hayatta kaldığı bildirilmektedir (50,51). Optimal su aktivitesi (a_w) değeri 0.97 olmasına karşın üreyebileceği en düşük a_w değeri 0.92 olarak belirtilmiştir. Ayrıca 0.83 a_w'de de canlılığını muhafaza edebilmektedir (52). Tuza (NaCl) toleranslı olduğu, yaklaşık % 40 civarındaki yüksek tuz konsantrasyanlarında dahi uzun süre canlılığını sürdürebildiği belirtilmektedir (51,53). Bakteri, % 10'luk NaCl ve 200 ppm sodyum nitrit ($NaNO_{2)}$ konsantrasyonunda üreyebilmekte ve gıda üretim çevrelerinde nemli ve kuru ortamlarda yıllarca yaşayabilmektedir (51). Etkenin % 4'lük tuz konsantrasyonunda yüksek ısı, düşük pH ve nisin gibi bariyerlere karşı direncinin arttığı belirtilmektedir (54).

Biofilm oluşturma özelliği, bakterinin endüstriyel gıda hazırlama süreçlerindeki kurutma ve antimikrobiyel ve dezenfektan uygulama işlemlerine karşı direncini artırmaktadır. Biofilm sayesinde bakteri cam eşyalara, paslanmaz çelik gibi metallere ve

plastik kaplara tutunabilmektedir (52). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara karşı *L. monocytogenes*'in saf ve *Pseudomonas aeroginosa* ile karışık kültürlerinin 37°C ve 12°C'de biofilm oluşturduğu, 12°C'de oluşturulan biofilmin dezenfektanlara daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir (53). Gıda hazırlama tezgahlarının *L. monocytogenes* açısından güvenli bir şekilde dezenfekte edilebilmesi için sodyum hipoklorid, kuaterner amonyum bileşikleri ve peroksi asetik asit önerilmektedir (55).

Sosis, rosto ve hindi gibi tüketime hazır etlerde bakteri sayısını 3 log azaltmak için 1.5; 5 log azaltmak için 3.5-4 kGy irradyasyon uygulaması gerektiği belirtilmektedir (56,57). Bakterinin iyonize radyasyona direnç gösterdiği bildirilmiştir (58). Ancak SDA (Sodyum Di Asetil), sitrik asit ve potasyum laktat eklenmesi radyasyon duyarlılığını artırmaktadır. Tüketime hazır hindi jambonuna koruyucu olarak % 2 sodyum laktat - % 1 SDA karışımı ya da % 2 sodyum laktat - % 0.1 potasyum benzoat karışımı eklendiğinde *L. monocytogenes*'in 42 günlük buzdolabı muhafazası boyunca 1 log'dan daha az ürediği tespit edilmiştir (59).

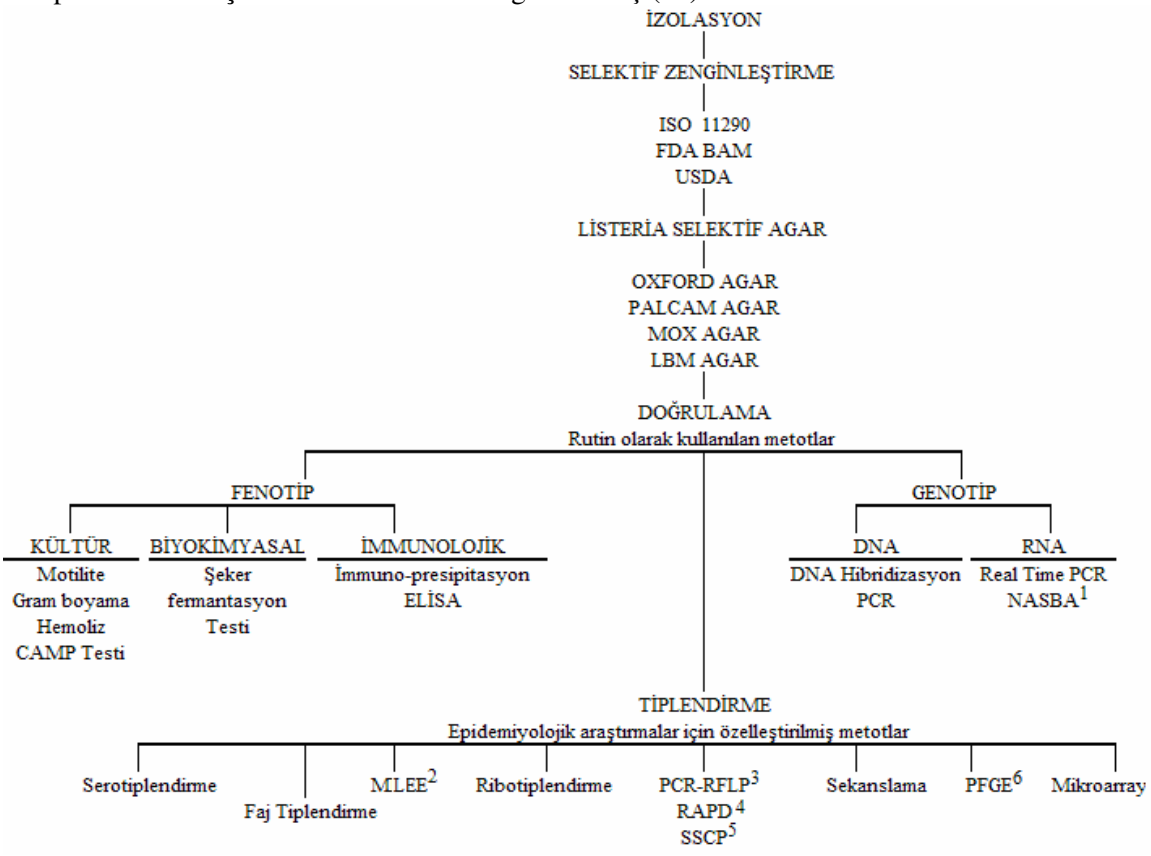
*Listeria monocytogenes'*in sütteki $D_{71.7}$ ºC değeri 2.7-4.1 saniye, etteki $D_{62.8}$ ºC değeri 2.56 dakikadır (41). Biftekte *L. monocytogenes* için D değeri 60 °C'de 4.67 dakika, 65 °C'de 0.72 dakika 71.1 °C'de 0.17 dakika 73.9 °C'de 0.04 dakika olarak bildirilmiştir (60).

Listeria monocytogenes'in serotipleri farklı üreme özellikleri gösterbilmektedir. 4b serotipindeki izolatların soğuk muhafaza sonrası 60°C'lik ısı işlemine 1/2a serotipindekilerden daha dayanıklı oldukları ve lag fazlarının daha kısa olduğu belirtilmiştir (31). Serotip 4b'nin Tyriptic Soy Broth (TSB)'da 1/2a'dan daha fazla biyofilm oluşturduğu, daha az besin içeren dilüe edilmiş TSB'da ise 1/2a serotipinin daha fazla biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (61).

Gıda, gaita ve su gibi ortamlardan *L. monocytogenes*'i izole etmek için International Organization for Standardization (ISO), Food and Drug Administration (FDA), US Department of Agriculture (USDA) ve Association of Official Analytical Chemists'in (AOAC) bildirdiği klasik kültür yöntemleri kullanılmaktadır (62,63,64,65). ISO11290 metodunda iki aşamalı zenginleştirme uygulanmakta ön zenginleştirme için half fraser, selektif zenginleştirme için ise fraser broth kullanılmaktadır. Fraser broth, akriflavin ve nalidiksik asit gibi selektif ajanlar ile *Listeria* türlerinin β-D-glukozidaz aktivitesini ölçen eskülin içermektedir. Zenginleştirme aşamalarından sonra Oxford, PALCAM ya

da MOX agara ekim yapılmaktadır (62). Bakteri, *Listeria* selektif besi yerlerinde, 24- 48 saat inkübasyonun ardından 0.5- 1.5 mm çapında, yuvarlak, yarı saydam, etrafı belirgin ve hafif konveks koloniler oluşturur. Koloniler öze ile toplandığında yapışkandır ve besi yerinde izleri kalır (44). Selektif besi yerlerinin *Listeria* türlerini diğer bakterilerden ayırması eskülinaz reaksiyonuna dayanmaktadır. Ancak *Enterococcus* ve *Bacillus* türleri de eskülini benzer şekilde kullanmaktadırlar. Bu gibi durumlarda şüpheli kültürler Tyriptic Soy Agar (TSA)'a aktarılıp eğimli ışıkta incelenirse, *Listeria* spp. kolonileri verdikleri mavi-yeşil röfle ile diğerlerinden ayrılmaktadır (43). Klasik kültür yöntemlerinin yeterince hızlı olmaması ve son yıllarda epidemiyolojinin önem kazanması nedeniyle birçok izolasyon ve idendifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler Tablo 2.3'de kısaca gösterilmektedir (43).

Tablo 2.3. Gıda ve çevredeki *Listeria* türleri ve *L. monocytogenes*'in izolasyon, identifikasyon ve tiplendirilmesi için kullanılan metotlara genel bakış (43).



[1]NASBA: Nucleic Asid Sequence Based Amplification
[2]MLEE: Multi-Locus Enzyme Electrophoresis,
[3]PCR-RFLP: Polymeraz Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism
[4]RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
[5]SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
[6]PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

Günümüzde rutin olarak kullanılan PCR temelli yöntemler, gıdanın bileşimi (protein, yağ ve kalsiyum gibi), ektraksiyon yöntemi, amplifikasyon koşulları gibi şartlardan olumsuz etkilenebilmektedir (66). Et ve et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in tespiti için PCR protokolü geliştiren Manzano et al. (67)'ın bildirdiğine göre gıdadaki bakteri sayısı 100'ün altında olduğunda PCR yanlış negatif sonuç vermektedir. Dolayısıyla 24 saatlik zenginleştirme işlemi uygulanmalıdır.

2.4.2. Stres Toleransı

Bakteri, sıcaklık, pH, ozmotik basınç, oksidatif stres ve safra tuzları gibi stres faktörlerine karşı çeşitli proteinler sentezlemektedir:

2.4.2.1. Isı Stresi Yanıtları

Birçok organizmada olduğu gibi *L. monocytogenes'*in de ısı stresine karşı, ısı şoku proteinlerinden (Heat shock proteins, Hsps) oluşan korunma mekanizması bulunmaktadır (68). *L. monocytogenes'*in ısı şoku proteinleri, GroELS, DnaKJ, HtrA, Clp (ABCEP) olarak belirlenmiştir (69).

GroEL ve GroES proteinlerini kodlayan *groEL* ve *groES* genleri her ısıda üreme için gereklidir (68). Değişik çalışmalar, GroEL protein üretiminin düşük pH ve osmolarite, etanol ve safra tuzu gibi stres ortamlarında da arttığını göstermektedir (69,70). DnaK ve DnaJ proteinleri *dnaK* operonu üzerinde bulunan *dnaK* ve *dnaJ* genleri tarafından kodlanmaktadır (71). Çeşitli çalışmalarda ölümcül olmayan ısı işlemi uygulamasını takiben GroEL ve DnaK ısı şoku yanıtlarının verildiği belirtilmiştir (68,70). Gıdanın yavaş yavaş ısıtılması, sodyum laktat veya NaCl eklenmesi bakterinin ısıya direncini artırmaktadır (72).

Clp (caseinolitik proteaz) proteinlerini kodlayan *clpB, clpC, clpE*, ve *clpP* genlerinin aynı zamanda basınç toleransında, harekette ve virülansta da rol oynadığı bildirilmektedir (73). HtrA proteinini kodlayan yüksek ısı gereklilik genleri (high temperature requirement, *htr*) değişik bakterilerden de izole edilmektedir. Bu protein asit, antibiyotik, ısı, oksidatif ve ozmotik stres gibi durumlarda bakteriye direnç sağlamakta ve biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır (74).

2.4.2.2. Asit Stresi Yanıtları

Listeria monocytogenes sitoplazmik pH'sını nötrale yakın tutabilmek için asit şok proteinleri (ASPs) üretebilmektedir. Bakterinin glutamat dekarboksilaz, arjinin deiminaz ve F0F1-ATPaz gibi asit direnç mekanizmaları vardır (69).

Glutamat dekarboksilaz (GAD) sisteminde sitoplazmik GAD ekstraselüler kaynaklı glutamatı geri dönüşümsüz olarak dekarboksile eder ve γ-aminobütirat (GABA) oluşturur. Reaksiyon boyunca hücre içi protonlar harcanır böylece sitoplazma asitleşmesi azaltılır ve pH dengesi sağlanır. GABA glutamattan daha az asidiktir ve çevrenin alkalizasyonuna katkıda bulunur. Bu reaksiyonu gerçekleşmesi için ortamda serbest glutamat bulunması gerekmektedir. Gıdalarda asitliği ayarlamak ve aroma sağlamak için gıda katkısı olarak kullanılan glutamat, birçok gıdada *L. monocytogenes'*in gelişimine katkıda bulunmaktadır. GAD sisteminin genetik düzenlemesini yapan *gadD1T1* genleri hafif asit ortamlarda, *gadD2T2* genleri kuvvetli asit ortamlarda hayatta kalmayı sağlamaktadır. Bu genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi, asit ortamda *sigB* geni tarafından kodlanan alternatif sigma faktör (σ^B) tarafından yapılmaktadır. σ^B, asit, alkali, oksidativite ve ozmotik strese dirençte rol oynar, ayrıca bakterinin düşük ısı, yüksek ısı, besin ve karbon yetersizliği gibi şartları tolere etmesini kolaylaştırır (50,75,76).

Arjinin deiminaz (ADI), katabolik ornitin karbamoiltransferaz (cOTCase) ve karbamat kinaz (CK) enzimleri, arjininin ornitin, amonyak ve karbondioksite parçalanmasını sağlamaktadır. Bu reaksiyon sonucu oluşan amonyak (NH_3), sitoplazmik protonlarla birleşerek amonyum (NH_4) iyonlarını oluşturmakta ve sitoplazmik pH'nın dengede kalmasına yardım etmektedir. Bakteri, kullandığı arjinini konak hücresinden temin etmektedir. Arjinin aynı zamanda, konak hücresinin hücre içi patojenlere karşı savunma amaçlı kullandığı nitrik oksitin (NO) ön maddesidir. Bu nedenle konak hücresindeki arjininin azaltılması NO üretim kapasitesini azaltmakta dolayısıyla *L. monocytogenes* infeksiyonuna bağışıklık yanıtı vermek güçleşmektedir. Bu enzim sisteminin genetik kontrolü *arcA, arcB, arcC, arcD, arcE, arcG* ve *arcH* genleri tarafından yapılmaktadır (69).

F_0F_1ATPaz, ATP sentezi ya da hidrolizi sırasında oluşan protonların hücreden çıkarılarak pH dengesinin sağlanmasına yardım eden bir enzim sistemidir. Bu sistemi

kontrol eden operonda, *atpA, atpB, atpC, atpD, atpE, atpF, atpG, atpH* ve *atpI* adlarında 9 gen vardır (77).

2.4.2.3. Ozmotik Stres Yanıtları

Yarı geçirgen yapıdaki bakteriyel sitoplazmik membran, su için geçirgen olmasına rağmen metabolitler için geçirgen değildir. Hiperozmotik şok karşısında bakteri hücresi, "ozmolit" adı verilen ve hücre fonksiyonlarını değiştirmeyen küçük organik molekülleri hücre içinde biriktirmeye çalışır. Glisin betadin, prolin, prolin betadin, asetil karnitin, karnitin, gama-bütirobetadin ve 3-dimetilsülfaniol-propiyonat bilinen ozmolitlerden bazılarıdır. En etkilileri glisin betadin ve karnitindir (69,78). Prolin sentezini düzenleyen *proBA* genini içermeyen *L. monocytogenes* mutantlarının yüksek basınçlı ortamlarda yaşayamadığı bildirilmiştir (78). *L. monocytogenes*'in glisin betadin ve karnitin alımı, BetL, Gbu ve OpuC adı verilen 3 ozmolit taşıyıcısı vasıtasıyla olmaktadır. Glisin betadin, BetL ve Gbu tarafından taşınır. Taşınma işlemini kodlayan *betL* geni osmolaritenin düşmesiyle, *gbuABC* operonu ise ozmotik basıncın artması ya da ısının yükselmesi ile aktive olmaktadırlar. Karnitin taşıyıcısı olan OpuC, *opuC* operonundaki ozmotik basınç ve soğuk stresi ile aktive edilen genler tarafından kodlanmaktadır (79).

Ozmotik stres yanıtlarından ikincisi ozmotik stres proteinleridir. RelA, Ctc, HtrA, KdpE, LisRK, ProBA ve BltA adı verilen proteinler, *ctc, htrA, kdpD, kdpE, orfX, lisRK, proBA* ve *btlA* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu genlerin regülasyonunda σ^B etkilidir (69). BtlA, *L. monocytogenes*'in safra tolerans lokusudur ve bakterinin % 7'lik yüksek osmolaritede üremesini sağlar (80).

2.4.2.4.Stresten Çapraz Korunma

Çapraz koruma veya stres katılaşması terimleri bir stres durumunun diğer stres faktörlerine karşı koruma sağlama yeteneği olarak açıklanabilir. Bu durum maruz kalınan stresin çeşidine ve letalitesine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu fenomen bir çok bakteride tarif edilmiştir ve mevcut gıda işleme teknolojileri modifiye edilirken veya yeni teknolojiler geliştirilirken göz önüne alınması gereken önemli bir ayrıntıdır. Nitekim bu durum gıda muhafaza önlemlerinin etkinliğini azaltarak gıda güvenliğini riske atabilmektedir (54,81). Söz konusu çapraz koruma fenomeni *L. monocytogenes*'de de bulunmaktadır (82). *L. monocytogenes*'de ozmotik basınç, hidrojen peroksit, ısı, etanol ve glikoz adaptasyonu ile indüklenen çapraz koruma sistemi, asit adaptasyonu ile oluşan çapraz korumadan çok daha sınırlı bir çapraz koruma sağlamaktadır. *L.*

monocytogenes'in pH 4.5- 5'e 1 saat maruz bırakılmasının ardından pH 3.5, % 17.5 etanol veya % 0.1'lik hidrojen peroksite maruz bırakıldığında bakteri hücrelerinin canlı kalma yeteneğinin arttığı gözlemlenmiştir (83). Bu durum, asit adaptasyonunun bakteri tarafından daha genel bir stres indikatörü olarak algılandığını öte yandan tuz, sıcaklık, etanol, hidrojen peroksit ve glikozun daha spesifik stres olarak algılandığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak gıda işleme endüstrisinde asite maruz bırakılan mikroorganizmalar, mide ve bağırsakta ve son olarak sistemik enfeksiyon süresince maruz kaldığı invivo streslere iyi bir şekilde hazırlanmış olmakta dolayısıyla adapte edilmiş çapraz direnç bakterinin canlı kalma ve hastalık oluşturabilme yeteneğini desteklemektedir (69).

2.4.3. Virülans Faktörleri

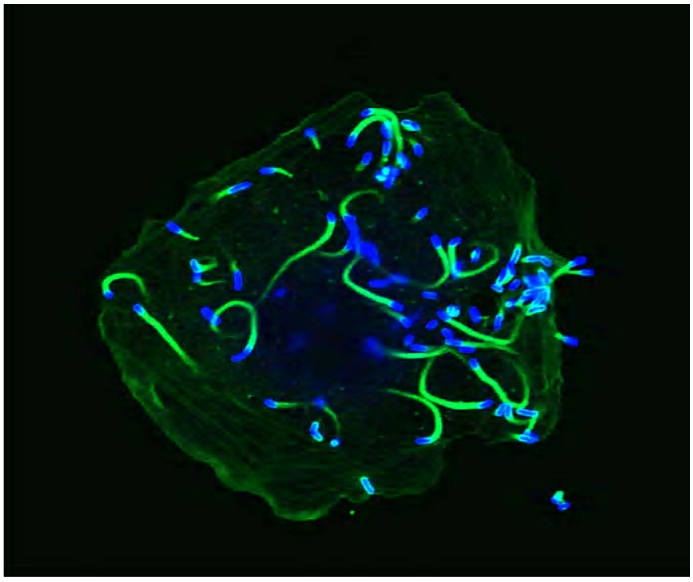
Listeria monocytogenes ile *L. innocua'*nın dairesel gen haritaları Glaser et al (84) tarafından yayınlanmıştır. *Listeria* türlerinde virülanstan sorumlu genlerin bulunduğu 9.6-kb'lık gen kümelerine *Listeria* patojenite adası adı verilmektedir. *Listeria* patojenite adası 1 (LIPI-1) *L. monocytogenes* ile *L. seeligeri*'de bulunurken, *Listeria* patojenite adası 2 (LIPI-2) *L. ivanovii*'de bulunmaktadır. *L. ivanovii'*de bulunan LIPI-2 gen klusteri ruminant eritrositlerindeki posfolipitleri parçalayan fosfokolinesteraz enzimini kodlamaktadır (44,50).

Virülans genlerinin üretilmesi ve düzenlenmesi için *prfA* geni tarafından kodlanan Pozitif Regülator Faktör A (PrfA) ve aynı zamanda stres tolerans genlerini de düzenleyen σ^B gereklidir. Enfeksiyonun gastrointestinal aşamasının σ^B, kanda yayılma aşamasının ise PrfA tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (85). Bağırsakta σ^B tarafından düzenlenen genler: *inlH, inlA, inlB, strA, bsh*; kanda PrfA tarafından düzenlenen genler: *prfA, plcA, plcB, hly, mpl, actA, orfX, orfZ, inlA, inlB, uhpT, inlC* ve *inlJ* olarak belirlenmiştir (85,86).

Hücre içi bir patojen olan *L. monocytogenes*'in hücreye adhezyonu için internalin A ve B proteinleri kullanılmaktadır. İnternalin A (InlA), tüm vücuttaki fagositik olmayan epitel hücrelerine tutunmak için gereklidir. İntestinal bariyeri ve plasentayı geçmede kritik role sahiptir. Söz konusu protein, memeli hücre duvarındaki peptidoglikanda bulunan e-kaderin isimli proteine kovalent bağlanarak hücreye penetre olur ve bakterinin hücreye alınmasını sağlar (87). İnternalin B ise konak hücre duvarında bulunan lipoteikoik asidin insan hepatosit büyüme faktör (HGF) reseptörü olan c-Met

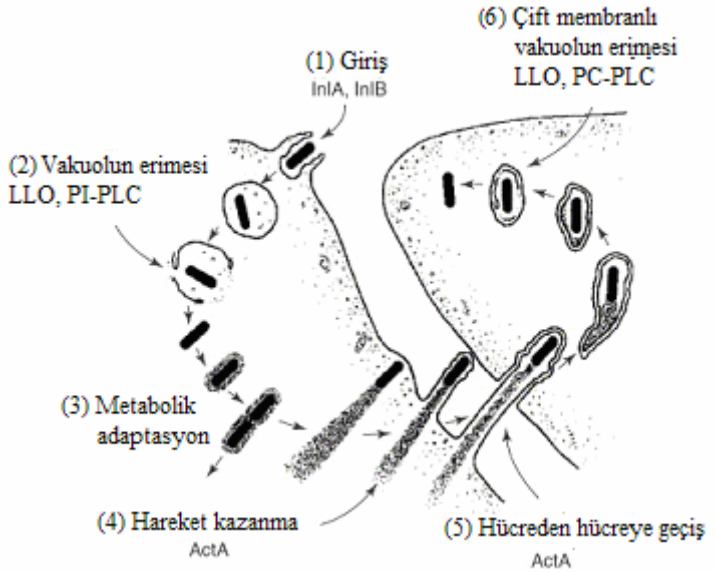
tirozin kinaz bölgesine, non kovalent bağlanır. InlB-Met etkileşimi, *L. monocytogenes*'in hepatosit, endotelyal hücreler ve fibroblastlar gibi InlA'nın bağlanamadığı çeşitli hücre tiplerine invazyonu için gereklidir (45,85). InlA ve B'nin haricinde InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG InlH ve InlJ olarak isimlendirilen ve konak hücresine internalizasyonda rol oynayan başka internalinler de belirlenmiştir. Ancak *L. monocytogenes* serotiplerinin Inl proteinlerini kodlayan *inl* genlerinin hepsini içermeyebileceği ve *inlC* ile *inlJ* genlerini taşımayan serotiplerin virülansının çok düşük olduğu bildirilmektedir (88). *inlC* ve *inlJ* genlerinin varlığı farelere yapılan intraperitoneal inokulasyonda *L. monocytogenes* suşunun potansiyel virülansını gösterse de bu suşların insanlarda oral olarak alındığında hastalık oluşturabileceğini göstermemektedir. 3a, 3b, 3c, 4c, 4d ve 4e gibi serotiplerin virülans potansiyeli yüksek çıkmış olmasına rağmen bu serotipler insanlarda nadiren hastalık oluşturmaktadır. Buna sebep olarak söz konusu serotiplerin intestinal bariyeri etkin şekilde geçememesi ya da immun sistem tarafından baskılanmaları gösterilmektedir. Açık yaradan ya da inravenöz olarak bulaşmadığı sürece bu serotiplerin hastalık oluşturmayacağı belirtilmiştir (30,88). Chen et al. (89) 4a serotipindeki *L. monocytogenes* izolatlarının *inlA* ve *inlB* haricindeki inl genlerinden hiçbirini içermediğini ve 4a serotipindeki izolatların farelerdeki virülensinin önemsenmeyecek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir.

İnternalin proteinleri ile konak hücreye penetre olan bakteri, konak hücre tarafından vakuol içine alınır. Tek membranlı vakuolden kurulmak için *hlyA* geni tarafından kodlanan (LLO) salgılanır. LLO, fosfolipidleri parçalayan ve *plcA* geni tarafından kodlanan fosfoditil inositol fosfolipaz (PI-PLC) ile birlikte vakoul memranını lize ederek sitoplazmaya geçer (50,90,91). Bakteri, tekrar üreyebilmek için hücre içi ortama adapte olur. Metabolik adaptasyon için bakteri hücresine şeker alımı gerekmektedir. Bu alım, heksoz fosfat transporter (*hpt*) ve benzeri genlerin ekspresyonu ile gerçekleştirilir (85). Hücre içinde 1 saatte çoğalan bakteri, komşu hücreye geçmek için hareket kazanmak zorundadır. Bunun için *actA* geni tarafından kodlanan aktin polimerizasyon proteini (ActA) ile konak hücrenin sitoplazmasındaki polimerize aktini kullanır ve flagella benzeri bir yapı oluşturarak hareket kazanır (85,90). Enfekte hücredeki aktin kuyrukları Şekil 2.1.'de görülmektedir.



Şekil 2.1. Enfekte hüceredeki aktin kuyrukları. Bakteriler antilisteria antikorları ile mavi renkte, aktinler, antiaktin antikorları ile yeşil renkte işaretlenmiş (93)

Bakteri hücre dışına hiç çıkmadan konak hücreden komşu hücreye geçtiğinde etrafı çift memranlı vakuol ile çevrilidir. Bu membranı geçmek için *plcB* geni tarafından kodlanan fosfaditil kolin fosfolipaz (PC-PLC) gereklidir. PC-PLC'nin aktivasyonu için ise *mlp* geni tarafından kodlanan metalloproteinaz (Mlp) proteinine ihtiyaç vardır (30). Mlp proteini tarafından aktive edilen PC-PLC, fosfaditilkolini parçalayarak hücreden hücreye geçişi sağlar (94). Hücre içi üreme ve hareket yeni hücrede de devam eder (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *L. monocytogenes*'in hücre içinde üremesi ve komşu hücreye geçişi (95)

Bu sürece katkıda bulunan çeşitli proteinlerden p104 isimli yüzey proteini, bağırsak hücrelerine tutunmayı sağlar. Tüm *Listeria* türlerinde bulunan *iap* geni tarafından

kodlanan p60 isimli hücre dışı protein ise InlB ile birlikte patojen *Listeria* türlerinde fibroblastlar gibi fagositoz yeteneği olmayan hücrelere invaze olmayı sağlar (96). PrfA aynı zamanda, sarfa direncinine katkıda bulunan safra tuzu hidrolaz (bile salt hydrolase gene, *bsh*) ve safra atım sistemi (bile exclusion system, *bilE*) genlerini regüle etmektedir (97,98). Yine PrfA tarafından düzenlenen *vip* geni ise LPXTG proteinlerini kodlamaktadır. Patojen *Listeria* türlerinde bulunan bu proteinler, konak sinyal sistemine ve immun yanıtına engel olmaktadır (99,100).

Ağız yoluyla alınan bakteri sekum ve kolon lamina propriasının altındaki fagositik hücrelere geçer. Kan ve lenf yoluyla mezenterik lenf yumrularına, dalağa ve karaciğere ulaşır (101). Karaciğer ve dalak, bakteriyel üreme için birincil hedef organlardır. Bakteri bu organlarda apse oluşturur. Deneysel intravenöz enfeksiyondan 10 dakika sonra inokulumun % 90'ının karaciğerde, % 5- 10'unun dalakta toplandığı, ilk 6 saatte karaciğerde bulunan canlı bakteri hücre sayısının 10 kat azaldığı görülmüştür (85). Deneysel olarak enfekte edilen hayvanlarda bakterinin, dalak ve karaciğerdeki fagositik hücreler tarafından ilk enfeksiyondan 10-14 gün sonra kandan temizlenebildiği görülmüştür. Ancak özellikle immun sistemi yetersiz bireylerde, aktive edilmemiş fagositik hücrelerdeki bazı bakterilerin yaşamaya devam ettiği ve hepatositler gibi diğer konak hücrelerine yayıldığı daha sonra da kan-beyin ve plasenta gibi bariyerleri geçebilmesinden dolayı uterusa ya da sentral sinir sistemine invaze olduğu bildirilmiştir. Bu olay, bazı hastalarda kontamine yiyecek tüketiminden sonra, 3 aydan uzun süren inkübasyon süresini açıklamaktadır (101).

2.5. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Antimikrobiyel direnç, insan ve veteriner hekimliğinde gittikçe artan bir krize neden olmaktadır. Antimikrobiyel direnç, mikroorganizmaların gösterdiği bir adaptasyon süreci olmasına rağmen, antibiyotiklerin hatalı kullanılması sonucu mikroorganizmalar arasında direnç artışı hızlanmıştır (12). Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi, bakterilerin farklı antibiyotiklere direnç geliştirebilmesinden dolayı gittikçe karmaşıklaşmaktadır (15). Antibiyotiklerin büyümeyi destekleyici olarak kullanılması Avrupa Birliği'nde yasaklanmış olmasına rağmen ABD, Kanada ve dünyanın birçok yerinde halen bu amaçla kullanılmaktadır (13).

*Listeria monocytogenes'*in genellikle gram pozitif bakterilere karşı kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu (III. kuşak sefalosporinler, bazı kinolonlar ve fosfomisin

hariç) bildirilmektedir. Son zamanlarda listeriozisin standart tedavisinde β-laktam antibiyotiklerden ampisilin tek başına ya da gentamisin gibi aminoglikozidlerle birlikte, β-laktam alerjisi olan hastalarda ise trimetoprim (TMP) ile birlikte sulfometoksazol (STX) gibi bir sülfonamid türevi kullanılmaktadır. Ayrıca vankomisin ve eritromisinin de bakteriyemi ve hamilelerde listeriozisin tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir (102,103). Bilinen ve listeriozis tedavisinde kullanılan antibiyotiklere direnç gösteren *Listeria* türlerine ait artan sayıda izolat bildirilmektedir (102). Yakın zamanda tetrasiklin, TMP- STX, kloramfenikol, eritromisin, streptomisin ve vankomisine dirençli izolatlar bildirilmiştir (103,104,105). Gentamisin, penisilin, ampisilin, kanamisin, sulfonamid ve rifampisin de *L. monocytogenes*'in dirençli olduğu antibiyotikler arasında rapor edilmiştir (106). Grayo et al. (107) *L. monocytogenes*'in moksifloksasin gibi yeni florokinolonlara duyarlı olduğunu ve bu ilaçların listeriozis tedavisinde alternatif olarak düşünülebileceğini belirtmişlerdir.

İn vitro antimikrobiyel duyarlılığın belirlenmesinde: Disk difüzyon, e-testi, agar dilüsyon, broth mikrodilüsyon ve broth makrodilüsyon gibi metotlar kullanılmaktadır. Antimikrobiyel duyarlılık testleri (AST: Antimicrobial Susceptibility Testing) klinik sonuçlara olan pozitif etkileri, antimikrobiyellerin etkisini sürdürmelerine yardımcı olmaları, klinisyenlerin antimikrobiyelleri güvenli bir şekilde kullanmasına imkan vermelerinden dolayı son derece önemlidir. Sonuçların farklı laboratuarlar arasında karşılaştırılabilir olması açısından standardize edilmiş ve uluslar arası kabul gören metotların kullanılması ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir (108).

AST calışmaları, bakteri izolatlarını test edilen her bir antimikrobiyel ajan icin, MIC düzeylerine veya zon çaplarına göre "duyarlı (susceptible: S)", "orta duyarlı (intermediate: I)" veya "dirençli (resistant: R)" olarak kategorize etmeyi amaçlamaktadır. Böyle bir klasifikasyon onaylanmış kriterler çerçevesinde yapılmalıdır. Son zamanlarda iki farklı yorum kriteri bulunmaktadır. Bunlar: Klinik breakpoints (kırılma noktası) ve epidemiyolojik cut- off değerleridir Yapılan çalışmanın önceliğine göre hangi kriterin kullanılması gerektiği ortaya çıkacaktır. Eğer veriler terapotik yaklaşımlara rehberlik etmeyi amaçlıyorsa (Ör: Çalışmanın amacı hangi antimikrobiyel ajanın terapotik amaçla kullanılacağını belirtmekse) klinik kırılma noktaları kullanılmalıdır. Epidemiyolojik cut- off değerleri bakterinin MIC dağılımlarını klinik

bir amaç gütmeden belirtmek için kullanılır. Klinik breakpoint ve epidemiyolojik cut-off değerleri birbirine çok benzer hatta bazı bakteri ilaç kombinasyonları için tamamen aynı olabilir fakat epidemiyolojik cut-off değerleri dozaj, antimikrobiyel ajanın uygulanma şekli, ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik parametreleri gibi klinik etkinlik çalışma sonuçlarını göz önünde bulundurmamaktadır. "Breakpoint" terimi, klinik kırılma noktalarını belirtmek için ve duyarlı, orta duyarlı ve dirençli kategorilerini tanımlamak için kullanılmalıdır (14).

Bakterilerin antimiktobiyal ajanlara karşı gösterdikleri in vitro duyarlılıkları saptamak için kullanılan laboratuar testleri: Disk difüzyon, broth ve agar dilüsyon teknikleridir (108). *L. monocytogenes*'in antimikrobiyel direncinin belirlenmesinde CLSI (108) broth mikrodilüsyon yönteminin kullanılmasını önermektedir. Broth mikro dilüsyon yöntemi, bilinen bir bakteri kültürüne karşı antibakteriyel ajanın niceliksel in vitro aktivitesini ölçmek için kullanılır. Bir seri kuyucuk içerisine çeşitli konsantrasyonlarda antimikrobiyel ajan eklenmiş agar ya da broth ile hazırlanır. Sonra, uygun şekilde standardize edilmiş test organizması kuyucuklara inokule edilir. 35°C'de bir gecelik inkubasyondan sonra testler incelir ve MIC değeri tanımlanır. MIC, logaritmik tabana göre sıralanmış (1, 2, 4, 8, 16 µg//mL gibi) iki katlı dilüsyonlardan elde edilmiş konsantrasyonların kullanılması ile tanımlanmıştır (108). İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan *L. monocytogenes*'in antimikrobiyel direncini araştırmak; yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı direnç değişim durumunu takip edebilmek, antimikrobiyel ajanların kullanımını kontrol edebilmek ve çoklu ilaç direncine sahip izolatların yayılmasını önlemek için önemlidir (109).

2.5.1. Doğal Direnç

Bazı bakteriler, fenotipik özelliklerinden dolayı bazı antibiyotiklere doğal direnç gösterebilmektedir. Bakterinin, antibiyotiğin hedefi olan yapıyı içermemesi, antibiyotiğin hedefe ulaşmasını engelleyecek bir yapıya sahip olması veya antibiyotiği inaktive edecek enzimleri taşıması ile gerçekleşen bu durum doğal direnç olarak isimlendirilmektedir (110,111).

Bakteri hücresinde transgikozilasyon ve transpeptidasyon reaksiyonlarını yürüten enzimler penisilin bağlayıcı proteinler (PBPs) olarak bilinmektedir. Penisilin, karbepenem, monobaktam ve sefalosporin gibi β-laktam antibiyotikler PBP'leri dönüşümsüz olarak bağlayarak transpeptidasyon reaksiyonlarını ve buna bağlı olarak

hücre duvarı sentezini engellerler (112). PBP'ler multimoduler yapıda oldukları için her PBP β-laktam antibiyotiklere aynı şekilde affinite göstermez. *L. monocytogenes* suşları 5 farklı PBP'ye sahiptir. Bunlardan PBP3, β-laktam antibiyotikler için öncelikli hedeftir ve bu enzimin engellenmesi bakterinin inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Geniş spektrumlu (III. kuşak) sefalosporinler ve monobaktamlar PBP3'e yüksek affinite ile bağlanmadıklarından *L. monocytogenes* suşları söz konusu antibiyotiklere doğal direnç göstermektedir (113). Li et al. (114), Yan et al. (102) ve Lotfollahi et al (115) araştırmalarında *L. monocytogenes*'in III. kuşak sefalosporinlerden olan sefotaksime yüksek direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Troxler et al. (113) tarafından bakterinin; sefdinir, sefpodoksim, seftriakson, sefuroksim, sefetamet ve seftazidim gibi diğer III. kuşak sefalosporinlere de dirençli olduğu rapor edilmiştir.

Ayrıca *L. monocytogenes* nalidiksik asit, fusidik asit ve fosfomisin gibi antibiyotiklere doğal olarak dirençli olduğundan listeria selektif broth ve agarlarda bu antibiyotikler diğer mikroorganizmaların üremesine engel olmak amacıyla kullanılmaktadır (103,104,116).

2.5.2. Kazanılmış Direnç

Bakteriler antibiyotiklere karşı mutasyon ya da aktarım yoluyla direnç kazanmaktadırlar (15,117). *L. monocytogenes* antibiyotik direncini mobilize plazmid ve konjugatif transpozon olarak iki farklı aktarım yoluyla kazanmaktadır. Konjugasyon yoluyla kazanım daha fazladır (118). Yapılan bazı çalışmalarda enterokokal ve streptokokal plazmidlerin ve transpozonların antibiyotik direnç genlerini konjugasyon ile *Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinden *Listeria* türlerine, *Listeria* türlerinin de kendi aralarında transfer edebildikleri ortaya konmuştur (119). Ancak Fransa'da gıda ve klinik izolatları üzerinde yapılmış iki farklı çalışmada, *L. monocytogenes* izolatları arasındaki kazanılmış direnç oranının % 2'den fazla olmadığı rapor edilmiştir (120,121).

Streptomisin, neomisin, kanamisin ve gentamisin gibi aminoglikozidler, ribozomdaki 30S alt biriminde bulunan 16S rRNA'ya bağlanarak protein sentezini engellemektedirler. Aminoglikozidlere gösterilen direnç genellikle, özel enzimler vasıtasıyla, ilacın yapısının değiştirilmesi şeklinde olmaktadır (15). *L. monocytogenes* izolatlarında sterptomisin direnci *aad6* geni tarafından kodlanan *6-N*-streptomisin adeniltransferaz enziminin etkisi ile gelişmektedir (118). Streptomisine dirençli

izolatlarda bulunan 54 kb'lık plazmidin tranfer edilebilir nitelikte olduğu bildirilmiştir (122).

Eritromisin, spiramisin ve linkomisin gibi makrolid antibiyotikler 50S ribozomal alt birimdeki peptidil transferaz merkezine etki ederek protein sentezini engellemektedirler. Makrolidlere karşı direnç; *erm* genleri tarafından şifrelenen ribozomal hedef değişimi, *mef* genleri tarafından şifrelenen membran- fırlatma effluks proteinlerinin oluşturduğu aktif ilaç effluks mekanizması, 23S rRNA'daki mutasyonlara ile oluşmaktadır (15). Eritromisin direnci gösteren *L. monocytogenes* klinik izolatlarının *erm* genlerinden yalnızca *erm*(B)'yi taşıdığı, diğer *erm* genleri ile *mef* genlerini taşımadığı rapor edilmiştir (121). *Enterococ* türlerinin bazı *erm* genlerinin donörü olduğu bildirilmektedir (123). Plazmid pAMß1'in eritromisine direnç özelliğini *Enterococcus faecalis*'ten *L. monocytogenes*'e konjugasyonla transfer edebildiği tespit edilmiştir (118).

Kloramfenikol, 50S ribosomal alt üniteye bağlanarak bakteride protein sentezine engel olmaktadır. Bakterilerde *cat* geni tarafından şifrelenen kloramfenikol asetiltransferaz enzimi ilacı değiştirerek ribozoma bağlanmasını engellemektedir (15). İlk olarak *Streptococcus agalactiae*'de bildirilen geniş-konaklı plazmid pIP501'deki genler, kloramfenikol, makrolid, linkozamid ve streptograminlere karşı gelişen antimikrobiyel direnci kodlamaktadır. Bu plazmidin konjugasyon yoluyla antimikrobiyel dirençlilik genlerini *S. agalactiae*'dan *L. monocytogenes* ve *L. grayi*'ye transfer edilebildiği ve *Listeria* türlerinin plazmidi çoğaltarak kendi türleri arasında ve diğer bakterilere aktarabildiği bildirilmektedir (121,124).

Vankomisin, teikoplanin, ristosetin ve avoparsin gibi glikopeptid antibiyotikler peptidoglikan oluşumunda kullanılan peptidil D-alanin-D-alanin uç kısmına bağlanıp bakteride hücre duvarı sentezini önleyerek etki göstermektedirler (125). Glikopeptid antibiyotiklere karşı direnç, *van* genlerinin şifrelediği bir mekanizma ile ilacın bağlandığı hedef molekülün değiştirilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. *van* genlerinin transpozon üzerende bulunduğu ve gram pozitif bakteriler arasında kolaylıkla taşınabildiği rapor edilmektedir (126). Vankomisin direncini kodlayan *vanA* geninin plazmidler vasıtasıyla *Enterococcus faecium*'dan *L. monocytogenes*'e, *L. ivanovii*'ye ve *L. welshimeri*'ye aktarılabildiği ortaya konmuştur (127). *L. monocytogenes*'in vankomisine direnç gösterdiği çeşitli çalışmalar mevcutken (103,109). Aurelia et al.

(104) tarafından yapılan bir çalışmada ise 148 suşun hepsi vankomisine duyarlı çıkmıştır.

TMP ve STX gibi sülfonamidler bakterilerde folik asit metabolizmasını engelleyerek nükleik asit sentezine engel olmaktadırlar. Sülfonamidler PABA (para- amino benzoik asit)'nın yerine geçerek dihidropteroat sentetaz (DHPS) enzimi inhibe ederler. Trimetoprim ise dihidrofolik asitin analoğudur ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine bağlanarak enzimi inhibe eder ve folik asit metabolizmasını engeller. Trimetoprim için geliştrilen direnç mekanizmalarından biri *dfr* genleri tarafından şifrelenen aşırı DHRF üretilmesidir (15). *L. monocytogenes'*deki TMP direnç geni *drfD*, *Staphylococcus haemolyticus*'tan izole edilen ile aynı olduğu ve söz konusu genin geniş konak spektrumlu ve hem gram (+) hem de gram (-) bakterilerde bulunan pIP823 plazmidi üzerinde bulunduğu belirtilmiştir (128). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *L. monocytogenes* izolatlarının, β-laktam antibiyotiklere alerjisi olan hastalarda başarıyla kullanılan TMP'ye karşı gösterdiği dirence dikkat çekilmektedir (102,103,109).

Florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek bakteride DNA sentezini engellemektedirler (15,129). Gram pozitif bakterilerde kromozom tarafından kodlanan florokinolon direnci, DNA giraz ve topoizomerazın moleküler hedeflerinin mutasyonları veya efluks pompasında ortaya çıkan aşırı atım sonucu oluşmaktadır. Efluks pompası ile ilgili mutasyon, DNA girazın ve topoizomeraz IV'ün altünitelerini kodlayan, spesifik "belirlenmiş kinolon direnci- quinolone resistance determining regions (QRDR)" bölgesinde bulunan *gryA, gryB, parC* ve *parE* genlerinde oluşmaktadır (130). Korsak et al. (131) gıdadan elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatının siprofloksasine gösterdiği direncin *Ide* geni tarafından kodlanan aktif efluks sisteminin aşırı çalışması sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir. Aktif efluks sisteminin *L. monocytogenes*'in çevreye uyumunda önemli rolü olduğu düşünülmektedir (132).

Tetrasiklinler ribozom 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini engellemektedirler (133). Gram pozitif bakterilerde 7 sınıfa ait tetrasiklin direnç genleri (*tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O) *tet(*P) *tet*(S) ve *tet*(T)) tanımlanmıştır. Ancak *L. monocytogenes* izolatlarından sadece *tet*(M), *tet*(S) ve *tet*(L) genleri izole edilmiştir (102,118). *tet*(M) ve *tet*(S) genleri, ribozomu koruyarak direnç oluştururken, *tet*(L) tetrasiklinin bakteriden aktif efluksu için protein kodlamaktadır (118). *tet*(K), *tet*(L) sadece tetrasiklin direnci verirken *tet*(M) *tet*(S) ve *tet*(T) ribozomu koruma yoluyla hem tetrasikline hem de

minosikline karşı direnç oluşturmaktadır (134). *tet*(M) ve *tet*(L) streptokoklar ile enterokoklar arasında yaygın oldu ve *Listeria* türlerine bu bakterilerden transfer edildiği bildirilmektedir (135). Birçok çalışmada *tet*(M)'nin, gıdadan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının taşıdığı tek tetrasiklin geni olduğu rapor edilse de (106,114,118,119,136), Yan et al. (102) çalışmalarında tetrasiklin direnci gösteren 14 izolatın birinden t*et*(S) geni izole ettiklerini bildirmişlerdir. *L. monocytogenes*'deki kazanılmış tetrasiklin direnci, transfer edilebilir plazmidler ya da konjugatif traspozonlar (Tn*1545*- Tn*916* gibi) aracılığıyla gerçekleştirilen horizontal bir gen transferidir (118). *tet* genleri taşıyan *L. monocytogenes* izolatlarının bu genleri transfer edebilme özelliği Tn*1545*- Tn*916* ailesindeki transpozonları taşımasına göre değişmektedir (102,131). Tn*1545*- Tn*916* ailesindeki transpozonların bakterideki varlığının belirlenmesinde integraz geni (*int*) indikatör olarak kullanılmaktadır. Korsak et al. (131) çalışmalarında elde ettikleri tetrasiklin direnci gösteren ve *tet*(M) geni taşıyan *L. monocytogenes* suşunun *int* geni dolayısıyla da Tn*1545*- Tn*916* ailesindeki transpozonları taşımadığını bildirmişlerdir. Yan et al. (102) araştırmalarında *tet*(M) geni taşıyan *L. monocytogenes* 13 izolatından 9'unun transfer edilebilir Tn*916* transpozonu taşıyıcısı olduğunu dolayısıyla bakterinin mobil *tet* genini gıda zincirine taşıyabileceğini rapor etmişlerdir.

Tn*1545* transpozonunun birden fazla direnç genini içerdiği ve *Enterococcus faecalis'*ten *L. monocytogenes*'e transfer edildiği belirtilmektedir. Bu transpozonun içerdiği kanamicin (*aph*), eritromicin (*erm*), and tetrasiklin (*tet*) direnç genleri de transpozonla birlikte *Listeria* türlerine konjuge edilmiştir (137).

2.5.3. Çoklu Direnç

Çoklu direnç gösteren ilk *L. monocytogenes* izolatı 1998'de Dijon hastanesinde 84 yaşındaki meningoensefalitli hastadan izole edilmiştir. İzolatın, kloramfenikol (MIC 64 µg/ml), eritromisin (MIC 2048 µg/ml), streptomisin (MIC 256 µg/ml) ve tetrasikline (MIC 128 µg/ml) direnç gösterdiği ve sırasıyla *cat221*, *erm*(B), *aad6* ve *tet*(S) genlerini ve kendi kendine transfer edilebilir plazmid pUBX1 taşıdığı taşıdığı bildirilmiştir (118,138). Söz konusu plazmidin *L. monocytogenes*, *E. feacalis*, *Streptococcus agalactiae* ve *S. aureus* arasında konjugasyon yoluyla transfer edilebildiği vurgulanmaktadır (118).

Çoklu direnç gösteren ikinci izolat ise 1990 yılında bir septik abort vakasından izole edilmiştir, kloramfenikol, eritromisin ve tetrasikline direnç göstermektedir ve sırasıyla *cat221*, *erm*(B) ve *tet*(S) genlerini taşımaktadır (121). Bunların haricinde biri İsviçre'de bir endokarditis hastası, diğeri de Yunanistan' da neonatal menenjit vakası olmak üzere dünyada çoklu direnç gösteren klinik izolatı iki kez daha rapor edilmiştir (139,140).

2.6. LISTERIA MONOCYTOGENES ENFEKSİYONLARI

2.6.1 Epidemiyoloji, Bulaşma Yolları ve Tiplendirme

Listeria monocytogenes konağın farklı dokularına kolonize olarak farklı klinik semptomlara neden olan multisistemik invaziv bir patojendir. Bu semptomlardan bazıları, diğerlerinden daha sık olarak rastlanan ve etkenin spesifik olarak beyine ve plasentaya affinite gösterdiğini ortaya koyan meningoensefalit ve abort şeklinde görülen semptomlardır. Çoğu durumda etken zayıf ve immun sistemi baskılanmış bireylerde kendini gösterdiği için *L. monocytogenes* oportunist bir patojen olarak değerlendirilebilir. Etken aynı zamanda kuşlar ve memeliler de dahil olmak üzere birçok hayvan türünde hastalığa neden olabilmektedir. Hayvanlarda ve insanlarda görülen patolojik bulgular birbirine benzemektedir ki bu durum patogenez mekanizmasının bütün duyarlı konaklarda aynı olduğunu ortaya koymaktadır. Son yıllarda *L. monocytogenes'*e ilişkin virülans determinantları ve mevzuat düzenleme konuları en önemli araştırma başlıkları arasında yer almaktadır (90,101).

Listeriozis genellikle sporadik olarak seyreden ancak salgınların da görüldüğü ve çoğunlukla gıda ile bulaşan bir hastalıktır. Listeriozis salgınlarında, sorumlu gıdanın belirlenmesi diğer gıda kaynaklı infeksiyonlarına oranla daha zordur. Bakterinin uzun inkübasyon periyodu (90 günün üzerine çıkabilir), bulaşmaya neden olan gıdanın mikrobiyolojik araştırmada kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Geniş salgınlarda bile, vaka kontrol çalışmaları sorumlu gıdayı her zaman tanımlayamamaktadır (141).

Gıdalar, listerozisin bulaşmasında temel faktör olarak yer alsa da hastalığın başka bulaşma yolları da vardır. Hasta hayvanla ya da hayvan materyali ile temas, veteriner hekimler ve çiftlik çalışanlarında çeşitli deri ve göz semptomlarının oluşmasına neden olabilmektedir (141). Yeni doğan bebeklerde çapraz kontaminasyon yoluyla oluşan enfeksiyonların belirtileri, bebek hastaneyi sağlıklı olarak terk ettikten 5- 12 gün sonra görülmektedir. Bu enfeksiyonlarda bulaşma, genellikle aynı bakım ünitesindeki bebeklerde kullanılan ortak ekipman ya da çalışan hemşireler yoluyla gerçekleşmektedir

(143). Ayrıca anneden bebeğe plasenta ya da enfekte doğum kanalı yoluyla da bulaşma gerçekleşebilmektedir (144).

Listeria monocytogenes mastitis etkenlerinden biri olmasına rağmen, gıdaların enfekte hayvandan direkt kontaminasyonu nadir görülmektedir. *L. monocytogenes,* vahşi kuşların, atların, domuzların, sığırların ve kümes hayvanlarının dışkılarından, çiftlik balıklarının bağırsaklarından izole edilmiştir (145). Gıda üretiminde kullanılan hayvanların *L. monocytogenes* taşıyıcısı olması, bu hayvanlardan elde edilen gıdalara ve gübrelere bakteri bulaşmasına ve bu gübrelerden de sebzelere bulaşmasına neden olmaktadır (146).

Bakterinin pastörizasyon ısısında inaktive olması *L. monocytogenes* içeren gıdaları ısı işleminden sonra güvenli hale getirmektedir. Çoğunlukla çiğ tüketilen ya da rekontamine gıdaların listeriozise neden olduğu belirtilmektedir. Rekontaminasyonun en önemli nedeni ise üretim sürecinde gıda imalathanelerinde hijyen ve sanitasyona dikkat edilmemesidir (145). Gıda üretim çevrelerinde kullanılan ahşap ekipman, dilimleme makinasi, ahşap ya da metal raflar, delikli taşıyıcı bant gibi temizlenmesi zor ekipmanların temizliğine gerekli özenin gösterilmemesi, üretim ünitesinde gıda kalıntıları, sıkışık soğutma odası ve yetersiz drenaj gibi olumsuz faktörler bakteri üremesine fırsat vermektedir (145). Kontamine gıda matriksinin *L. monocytogenes* üremesine uygun olması (yüksek su aktivitesi, nötral pH), yüksek oranda kontamine olması ($>10^3$kob/g), tüketime sunulmadan önce uzun süre buzdolabında bekletilmesi ve çiğ tüketilmesi hastalık riskini artırmaktadır (147). Kontamine gıda mideyi geçerken, asit ortam *L. monocytogenes* sayısında önemli ölçüde azalmalara neden olmaktadır. Ancak antiasit tedavisi gören hastalarda bakterinin mideden geçişinin kolaylaştığı bildirilmektedir. Bazı gıdaların tampon kapasitesi de bakteriyi ortam asitiliğinden korumaktadır (143).

Avrupa ülkelerinde 2000 yılında 1.9–7.5 vaka/milyon kişi arasında bildirilen listeriozis insidensinin 2000 yılından beri özellikle 65 yaş üzerindeki kişilerde artış gösterdiği belirtilmektedir (148). ABD'de 1998- 2002 boyunca gıda kaynaklı hastalıkların neden olduğu ölümlerin yaklaşık % 43'üne *L. monocytogenes*'in sebep olduğu rapor edilmiştir (102).

Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan bazı listeriozis salgınlarından sorumlu tutulan gıdalar ve bu salgınlardan elde edilen izolatların serotipleri tablo 2.4'de gösterilmiştir (149,150,151, 152,153,154,155,156).

Tablo 2.4. Süt ve süt ürünlerinden kaynaklanan listeriozis salgınlarından sorumlu tutulan gıdalar ve bu salgınlardan elde edilen izolatların serotipleri.

Ülke	Yıl	Tüketilen Ürün	Etkilenen Toplam Kişi Sayısı	Toplam Ölüm	Sorumlu Serotip	Literatür
İsviçre	1983-1987	Yumuşak peynir	122	34	4b	151
Fransa	1995	Yumuşak peynir	17	4	4b	151
ABD	1994	Çikolatalı süt	45	0	1/2b	151
ABD	2000-2001	Meksika stili peynir	13	5	4b	150
İsveç[a]	2001	Süt ürünleri	42	0	1/2a	154
Japonya[a]	2001	Peynir	38	0	1/2b	155
Kanada	2002	Peynir	17	0	4b	156
ABD	2007	Pastörize süt	5	3	4b	149
Çek Cumhuriyeti	2006	Peynir ve salata	75	12	1/2b	152
Almanya, Avusturya ve Çek Cumhuriyeti	2009-2010	Çökelek peyniri	34	8	1/2a	153

[a]Gastrointestinal listeriozis

Listeria monocytogenes'in altgruplarının belirlenmesi, etkenin virülans karakteri ve kaynağının tanımlanması açısından çok önemlidir (157). Gıda kaynaklı listeriozisten etkili bir korunma sağlamak için öncelikle *L. monocytogenes*'in evrimini ve ekolojisini anlamak, daha sonra ise kontaminasyon kaynaklarını belirleyerek bu kaynakları uygun şekilde izlemek gerekmektedir. Listeriozis salgınına neden olan suşlar ve gıdalarda bulunan suşların benzerliklerini ortaya koymak için çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır (23). Jiang et al. (157) *L. monocytogenes* izolatlarını alttiplerine ayırmak için MLST ve PFGE yöntemlerini kullanmışlar; her iki yöntemin de kontaminasyon kaynağını belirlemede benzer kesinlikte olduğunu belirtmişlerdir.

2.6.2. Hayvanlarda Listeriozis

Sığır, keçi, koyun gibi çiftlik hayvanları başta olmak üzere 40'tan fazla vahşi ve evcil hayvan türünün listeriozis enfeksiyonuna duyarlı olduğu belirtilmektedir (48). Hayvanlarda listeriozisin belirtileri, meningoensefalit, abort, endoftalmit, septisemi ve mastititstir (158). Meningoensefalit gelişen hayvanlarda kendi ekseni etrafında dönme hareketi ile karakterize tipik semptom ilk kez 1933 yılında Gill tarafından Yeni Zellanda'da tanımlanmıştır (6). Meningoensefalitli bufaloların beyinlerinden 4b, infertil sığırların endometriumundan ise 4b ve 1/2c serotipleri izole edilmiştir (158).

Silajla beslenen hayvanlarda *L. monocytogenes*'in prevalansı belirgin şekilde artmaktadır. Silajın kötü kalitede olması, pH'sının 5.5'in üzerinde olması ve modern sistemlerde büyük balyalar halinde toplanması riski artırmaktadır (48,159). Hayvanlarda listeriozis bulaşıcı olmayan sporadik vakalar şeklinde ortaya çıkar. Fakat silaj gibi kontamine kaynaklar koyunlarda salgınlara yol açabilir. Hastalık özellikle kış ve ilkbahar aylarında çok sık görülür. Kış aylarında sık görülmesinin nedeni olarak silajla beslenmenin yanı sıra diğer patojenlerin üremesinin baskılandığı düşük ısılarda bakterinin üreyebilmesi gösterilmektedir. (160).

Akça ve Şahin, (5), 96'sı atık yapmış 250 inekten aldıkları süt ve vajinal sıvap örneklerinin 9'unda *L. monocytogenes* izole ettiklerini, süt örneklerinden izole edilen 2 suşun atık yapan ineklerden elde edildiğini, vajinal sıvap örneklerinden izole edilen 7 suşun 5'inin atık yapan ineklerden elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Monogastrik hayvanlarda listeriozis nadir olarak septisemi ve meningoensefalitise neden olmaktadır. Hastalık kuşlarda septisemi ve miyokardial nekroz ile birlikte seyretmektedir (6).

Listeria monocytogenes enfeksiyonuna maruz kalan hayvanların atık fötusları, salgıları ve sütleri çevresel kontaminasyona sebep olabilmektedir. Hastalığın insidensi düşük olsa da antibiyotik tedavisine rağmen özellikle gebe hayvanlarda mortalite yüksektir. Bakterinin hücre içi gelişmesi ve hücre dışına çıkmadan hücreden hücreye geçmesi buna sebep olarak gösterilmektedir. Hastalığın tedavisi için antibiyotik uygulamalarına ilaveten kuvvetli bir konak hücre savunması da gereklidir (48).

Listeria ivanovii ruminantlarda aborta ve mastite neden olmaktadır (158). Bakteri, *smcL* geni tarafından kodlanan sfingomiyelinaz enzimini taşımaktadır. Bu enzim, ruminant

epitel hücrelerinde üremeyi 2 ila 4 kat artırmaktadır. Ruminantların hücre zarlarında yüksek oranda sfingomiyelin olması *L. ivanovii*'nin ruminant hücrelerinde üremesini kolaylaştırmaktadır (161).

Ayrıca *L. innocua*'nın da koyunlarda meningoensefalitise neden olduğu bildirilmektedir (24).

2.6.3. İnsanlarda Listeriozis

Listeriozis; genellikle hamile kadınlar, yaşlılar, yeni doğanlar, çocuklar ve steroid veya sitotoksik tedavi gören ya da kötü huylu tümörü olan immun sistemi zayıflamış yetişkinler gibi yüksek risk grubundaki bireyleri etkilemektedir. (156) Besin ile birlikte alınmış bakteri sayısı, virülansı ve patojenik özellikleri ile konağın immünolojik durumu, enfeksiyona ait klinik belirtilerin ciddiyetini belirlemektedir (11,30). Hastalığın insidensi düşük olmasına rağmen özellikle risk grubundakilerde yüksek mortalite (yaklaşık %30) görülebilmektedir (10,11).

Hastalığın invaziv formunda etken, yüksek risk grubundaki bireylerde bakteriyemi ile birlikte hedef organları etkileyerek ensefalit, menenjit ve abort gibi ciddi semptomlarla seyredebilmektedir (36,162). Listeriozis vakalarının % 7.5'inde endokarditis şekillenmekte ve hastaların % 50'si kalp nakline ihtiyaç duymaktadır. (163).

Listeriozisin son yıllarda bildirilen non-invaziv formu ise duyarlı olmayan kişilerde gastroenteritis, ateş, kusma, mide krampları, diyare ve grip benzeri semptomlarla seyretmektedir. Gıda, fazla sayıda bakteri ile kontamine ise bu semptomlar bir iki gün içerisinde başlamaktadır. Vakaların çok azı ciddi sistemik enfeksiyonlara dönüşmektedir (164). Listeriozis klinik tablolarında nadir olarak artritis, hepatitis, endoftalmitis, deri lezyonları ve endokarditis ile sonuçlanan peritonitis görülür (141).

Veteriner, çiftlik çalışanı gibi enfekte hayvan veya havyan materyali ile temas eden kişilerde papüler ya da püstüler kutaneöz lezyonlar görülebilir. Bu lezyonlar, genellikle sığır abortundan 1-4 gün sonra abort materyali ile temas etmiş kişilerin kol ya da bileklerinde görülür ve tedaviye ihtiyaç duyulmaksızın geçer. Aynı şekilde yine temas yoluyla konjuktivitis oluşabilmektedir (6).

Vakaların % 10-20'si hamile ve yeni doğanlarda görülmektedir. Maternal listeriozis gebelik süresince devam edebilir fakat semptom göstermediği için 20 haftalıktan önce nadiren anlaşılır. Listeriozisli gebelerin % 5'inde hastalık fötusa geçmez. ABD'de 2007

yılında pastörize sütten bulaşan salgında etkilenen hamile kadınlardan birinin erken doğum yaptığı ancak bebeğin sağlıklı olduğu bildirilmiştir (149). Bazı gebelerde titreme, ateş, sırt ağrısı, boğaz enfeksiyonu ve baş ağrısı, bazen ise konjuktivitis, diyare ve uyuşukluk gibi çok yumuşak semptomlar görülebilir. Bunun yanında kan, vajinal svap, dışkı ve idrar kültürleri pozitiftir (141). Ateş başladığında fötal hareket azalır ve yaklaşık 1 hafta içinde doğum, ölü doğum ya da abort meydana gelir. Prematüre bebeklerin yaklaşık %70'inde erken neonatal listeriozis gelişmektedir. Erken neonatal listeriozisin semptomları genellikle pneumoni, hepatosplenomegali, peteşi, karaciğer ve beyinde apseler, peritonitis ve enterokolitistir (158). Yeni doğanlarda hastalık hastaneden bulaştığı zaman belirtiler 5. günden sonra başlar ve geç neonatal listeriozis olarak adlandırılır. Hastalığın bu formu menenjit ile birlikte seyreder. Geç neonatal listerioziste ölüm oranı % 10 civarında iken erken neonatal listerioziste % 30-60 arasındadır (141,158).

Anneden fetusa geçiş haricinde insandan insana listeriozis bulaşması gerçekleşmediğinden hastaları izole etmek gerekmemektedir. (165)

Hastalıktan korunmak için:

1- Çiğ hayvansal gıdaların uygun bir şekilde pişirilmesi.

2- Çiğ olarak tüketilecek sebzelerin yenmeden önce bol su ile iyi bir şekilde yıkanması

3- Isı işlemi görmemiş hayvansal gıdaların sebzelerden ve pişirilmiş ve tüketime hazır gıdalardan uzak tutulması

4- Çiğ süt veya ürünlerinin tüketiminden kaçınılması

5- Isı işleminden sonra gıdaların tekrar kontamine edilmemesi

6- Çiğ gıdaları hazırladıktan sonra ellerin, bıçakların, tezgahların ve kesme tahtalarının yıkanması. Mümkünse çiğ olarak tüketilecek olan sebzeler ve çiğ etin doğranması için farklı renkte iki ayrı doğrama tahtası bulundurulması gerekmektedir.

Ayrıca yüksek risk grubundaki bireyler için:

1- Meksika stili, feta, brie, camembert gibi yumuşak peynirlerin, mavi damarlı peynirlerin tüketilmemesi tavsiye edilmektedir. Buna karşın sert peynir, krem

peynir ve yoğurt tüketiminde listeriozis riskinin çok daha düşük olduğu belirtilmektedir.

2- Buzdolabında muhafaza edilen yemeklerin ve tüketime hazır gıdaların tüketilmeden önce yeterli derecede ısı işlemine tabi tutulması tavsiye edilmektedir.

3- Listeriozis açısından riskli gıdaların tüketilmemesi de önemle vurgulanmaktadır.

2.7. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN ÇEVREDE DAĞILIMI

Listeria türleri çevrede, toprakta, suda ve kalitesiz silajlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu kaynaklardan hayvanlara ve hayvanların dışkı, kan ve sütleri ile de çevreye bulaşmaktadır. Sanitasyon uygulamalarının yetersiz olduğu durumlarda ise gıda maddeleri üretim, taşıma ve tüketim prosesleri boyunca kontamine olmaktadır (166). *Listeria* türleri, hücre içinde yaşamaları, olumsuz çevre şartlarına ve buzdolabı ısısına dirençlilikleri, sağlıklı insan ve hayvanlarda hastalığa neden olmadan varlıklarını sürdürebilmeleri ve her yerde bulunabilmeleri nedeniyle çok dikkatli değerlendirilmelidirler (5). Abay ve ark. (167) sığır kıymalarından, koyun dışkısından ve listeriozisli hastalardan izole ettikleri farklı sayıdaki suşların % 90'dan büyük oranda moleküler benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Sindirim sisteminde bulunmasına rağmen *Listeria* türleri saprofitik hayata adapte olmuş bakterilerin birçok özelliğini gösterir. Hayvanların gastrointestinal kanallarında nadiren ve geçici olarak bulunurlar (44).

Steril ve doğal toprağın *L. monocytogenes'*in yaşamasına ve üremesine imkan sağladığı, bakterinin tarımsal olmayan alanlarda da yaşayıp üreyebildiğini bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, steril toprak süspansiyonuna inokule edilen yaklaşık 10^5 kob/ml *L. monocytogenes'*in 154 gün sonra 2.14×10^7 kob/ml'ye çıktığı belirtilmiştir (145). David and Odeyemi (168) 36 toprak örneğinden 32'sinin (% 91.6) ve 20 sığır dışkısı örneğinden 17'sinin (% 85) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Atıl ve ark. (4) sığır ve koyun çiftliklerinden topladıkları dışkı, su ve yem örneklerinin *L. monocytogenes* ile kontaminasyon oranının sırasıyla % 0.8, % 2.3 ve % 0.8 olduğunu bildirmişlerdir.

Kanada'da nehir havzasındaki yüzey sularından alınan örneklerden elde edilen izolatların serotip dağılımının belirlenmesine yönelik olan bir çalışmada, izolatların 1/2c

ve 3c hariç diğer serotipler arasında dağılım gösterdiği bulunmuştur (2). Çevreden elde edilen izoloatların serotip dağılımının mevsimsel olarak değiştiği bildirilmektedir. Serotip 4b'nin durgun sularda ve yaz aylarında daha sık rastlandığı, serotip 1/2a'nın ise kışın ve soğuk sularda daha fazla bulunduğu bildirilmiştir. (2, 169).

2.8. *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN GIDALARDA BULUNUŞU

Epidemiyolojik çalışmalara göre listeriozis olgularının önemli bir bölümü kontamine gıdalardan kaynaklanmaktadır. Listeriozis salgınları gıda endüstrisi ile ilgili olduğundan, *L. monocytogenes*'in gıda üretimindeki epidemiyolojisi ile ilgili bilgilere ulaşmak çok önemlidir (36). Etken, süt ve süt ürünleri (peynir, dondurma) kırmızı et, kanatlı eti, balık, sebzeler ve gıda üretim tesislerinden izole edilmiştir (66,170). Ayrıca sebzeler ve sebze salataları ve tüketime hazır gıdalar da etkenin önemli taşıyıcıları arasındadır (10).

Gıda ürünlerine *L. monocytogenes* bulaşmasındaki en önemli faktör, gıdanın hazırlanması sırasında oluşan çapraz kontaminasyonlardır (66). *L. monocytogenes*'in gıda ile bulaşmasını önlemek için, gıda işletmelerinde hammadde ile işlenmiş ürünlerin birbirinden ayrılması, hammaddenin kontamine edilmemesi, toplama, işleme, taşıma ve satış esnasında hijyen kurallarına uyulması, ürünün işlenmesi sırasında kontaminasyonların önlenmesi için etkin temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerinin yapılması ve yapılan uygulamaların etkinliğini ölçmek için gerekli kontrollerin yapılması, kısaca HACCP kurallarına uyulması gerekmektedir. (171).

2.8.1. Deniz Ürünleri

Soğuk tütsülenmiş balık ürünleri üretim aşamasında teknolojisi gereği *Listeria* türlerini inaktive edecek herhangi bir işlemden geçmemekte dolayısıyla listeriozis bulaşmasında risk teşkil etmektedir (145). Finlandiya'da 1999 ylında tütsülenmiş soğuk alabalığın neden olduğu listeriozis salgını ateş ve gastroenteritis ile seyretmiştir (172). Söz konusu salgına neden olan balığın hastalar tarafından tüketilmeden 17 gün önce vakum paketlenmiş olduğu ve 4.6°C'de muhafaza edildiği rapor edilmiştir (172).

Nakamura et al. (173), 95 tütsülenmiş soğuk balık örneğinin 12'sinden *L. monocytogenes* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. On üç izolatın 8'inin 1/2a, 2'sinin 4b, 1'inin 3a serotipinde olduğu bildirilmiştir. Buna karşın Wang et al. (174) çalışmalarında 90 karides, balık ve ahtapot örneğininin hiç birinden *L. monocytogenes* izole edilemediğini belirtmişlerdir. Yan et al. (102) 343 deniz ürünü inceledikleri

çalışmalarında 4 örnekten *L. monocytogenes* izolatı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Cenet (175) Manisa'da bulunan bir alabalık çifliğinden satın aldığı 66 alabalık fletosunun 3'ünün *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmiştir.

2.8.2. Et ve Et Ürünleri

Et ve ürünlerinin *L. monocytogenes* ile kontaminasyonu kesim aşamasında başlamaktadır. Kesimhanelerde hayvan dışkı, deri ve ayakları ayrıca işletmede çalışan personel, iş kıyafetleri, kullanılan sular, çevre ve ekipman bulaşmanın başlıca kaynağıdır (176). Navratilova et al. (9) yaptıkları çalışmada kesim aşamasında kontamine olmayan etlerden işleme aşamasında alınan örneklerin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada et üretim tesisindeki ekipmandan da *L. monocytogenes* izole edildiği belirtilmiştir. Rorvik et al.(146) tarafından tavuk kesimhanelerinde yapılan çalışmada tavuk dışkısının tavuk ürünlerinden bulaşan *L. monocytogenes* için önemli bir kaynak olamayacağı, tavuk ürünlerinin muhtemelen kesim ve işleme esnasında kontamine olabileceği belirtilmiştir. Özmen ve Kılıç (177), 100 tavuk karkası ve 100 tavuk bağırsak içeriği örneklerinin sırası ile % 24 ve % 5'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Bağırsak içeriklerinden izole edilen *L. monocytogenes* sayısının karkaslardan düşük olmasını; kesimhanelerdeki hijyen kalitesinin düşüklüğüne, etlerin uzun sürelerde çözündürülmesine (24 saat) ve *L. monocytogenes*'in psikrofilik özelliğine bağlamışlardır (177). Kanatlı eti ve ürünlerinin *Listeria* türleri ile yüksek düzeyde kontamine olmasında kanatlı kesim işleminin tüy yolma, iç organ çıkarma, soğutma ve parçalama gibi kritik aşamalarında oluşan çapraz kontaminasyon büyük rol oynamaktadır. İnsanlardaki tüm listeriozis olgularının % 6'sınının iyi pişmemiş kanatlı eti tüketiminden kaynaklandığı bildirilmektedir (178). Ayaz ve ark. (179) donmuş piliç karkaslarının % 20.2'sinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu saptamışlardır. Erol ve ark. (178), çalışmalarında taze piliç ve parça et (but, göğüs, kanat) örneklerinin % 23,3'ünden *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Şireli ve ark. (180), Ankara'dan satın alınan 40 kıyma, 30 köfte ve 30 burgerden oluşan 100 tavuk eti ürününde *Listeria* spp. kontaminasyon düzeyini belirledikleri çalışmalarında 3 üründe de *L. monocytogenes* tespit ettiklerini ve en fazla kontaminasyonun tavuk kıyma örneklerinde olduğunu rapor etmişlerdir. Arslan ve ark. (181), tavuk et parçaları ve karkas yıkama sularında *Listeria* türlerini

araştırdıkları çalışmalarında but, boyun, kanat, göğüs ve karkas yıkama suyundan alınan 20'şer örneğin 8'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, izole edilen suşların 2'sinin boyundan, 2'sının ise buttan elde edilmiş olmasını, kesim sonrasında kursak ve sindirim sistemi içeriği ile kontaminasyona işaret ettiğini öne sürmektedirler (181). Hindi eti üzerinde yapılmış araştırmalarda; Bilir Ormancı ve ark. (182), 180 paketlenmiş taze parça hindi etinden 23'ünün (% 12.7), Ayaz ve Erol (183), 180 hindi eti örneğinden 32'sinin (% 17.7) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Hayvan orijinli tüketime hazır gıdalar, kanatlı eti içerenler başta olmak üzere tüketime hazır et ürünleri, yüksek oranda kontaminasyon riski taşımaktadır. Sporadik vakaların % 32'si şarküteri tezgahında hazırlanarak tüketime sunulan et ürünlerine dayandırılmaktadır (143). Son 15 yıl içinde tüketime hazır et ve kanatlı ürünlerinden kaynaklanan çeşitli listeriozis salgınları bildirilmiştir. 1998- 1999 yıllarında sosis ve tüketime hazır diğer et ürünlerinin neden olduğu *L. monocytogenes* salgınında 101 hastadan 21'inde ölüm meydana gelmiştir (72). Tüketime hazır hindi etinin neden olduğu 2000 yılındaki salgında ise 29 kişi hastalanmış 4 ölüm ve 3 abort görülmüştür (184). Hazır tüketime hazır hindi etinin sebep olduğu 2000'deki listeriozis salgınından 9 eyalette 54 kişi etkilenmiş, 7 kişi ölmüş ve 27.4 milyon paundluk işlenmiş gıda ürünü geri toplanmıştır. Bu rakam ABD'de bildirilen en fazla miktardaki gıda toplatma vakasıdır. (185). Kanada'da 2008 yılında tüketime hazır et ürünlerinden bulaşan salgından 57 kişi etkilenmiş ve hastaların 23'ü ölmüştür (186). Danimarka'da 2009 yılında ortaya çıkan salgından 8 kişi etkilenmiş ve 2 kişi ölmüştür. Hastaların 7'sinin hastalık belirtileri ortaya çıkmadan 3 hafta önce aynı yemek şirketinin hazırladığı tüketime hazır ve dilimlenmiş sığır etini sipariş ettiği bildirilmiştir (187).

Bu patojenin çiğ etlerdeki prevalansının daha yüksek olduğu bildirilse de pişmiş et ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığı da (% 4.9) Uyttendaele et al. (188) çalışmasında rapor edilmiştir. Yan et al. (102) çalışmalarında inceledikleri 733 çiğ et ve 302 pişmiş et örneklerinden 46'sı çiğ etten ve 10'u pişmiş etten olmak üzere toplam 56 *L. monocytogenes* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Bu konuda ülkemizde yapılmış olan bir çalışmada da Yücel et al. (189) inceledikleri çiğ et örneklerinden 42 kıyma örneğinin 2'sinin, 26 tavuk eti örneğinin 3'ünün ve 19 sığır eti örneğinin 1'inin; pişmiş et

örneklerinden ise 31 kırmızı etten 2'sinin, 28 tavuk etinin ise 1'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir.

Manzano et al. (67) çalışmalarında domuz, sığır, tavuk gibi çeşitli hayvanların et ve kıymaları ile fermente sosisten oluşan 85 örneği incelediklerini, bunların 25'inde *L. monocytogenes* saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca Wang et al. (174) sığır eti, tavuk ciğeri ve domuz bağırsağından oluşan 90 örneğin 16'sından *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Buna karşın Jajali et al. (190) çalışmalarında toplam 332 et, kıyma ve hamburger örneğinin sadece 4'ünde *L. monocytogenes* saptadıklarını belirtilmişlerdir. Çiğ et, kıyma ve et ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığı ile ilgili ülkemizde yapılan bir çalışmada Güven ve Patır (191), Elazığ ilinden temin edilen 100 kıyma, 80 sucuk, 80 tavuk eti ve 70 parça kırmızı et örneğinde sırası ile % 13, % 7.5, % 38.8 ve % 11.4 oranında *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Vakumlu paketlenmiş et ve ürünlerinde *L. monocytogenes*'in canlılığı, muhafaza sıcaklığı, kullanılan katkı maddeleri, ürünün pH değeri ve doğal mikrofloranın ürettiği antibakteriyal ajanların miktarına bağlıdır (175). *L. monocytogenes*'in tüketime hazır etler ile bulaşmasına engel olmak için etler paketlenmeden önce pastörizasyon, irradyasyon veya antimikrobiyel katkı ilavesi gibi işlemlerden geçirilmektedir. Gıda güvenliği ve inceleme birimi (FSIS) nisin, EPL (ε-poly-L-lysine), ACS (Asidik kalsiyum sülfat) ve LAE (Laurik arjinat ester) gibi antimikrobiyellerin tüketime hazır et ve tavuk ürünlerinde tek başına ya da kombine olarak kullanılmasına izin vermektedir (192). Nisin ve ACS'ın *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör etkilerinin, sinerjik; ELP ve ACS etkilerinin ise antagonist olduğu belirtilmiştir (193). Tüketime hazır et ürünlerinde *L. monocytogenes* üremesini engellemek için kullanılan hurdle (engeller) teknolojisi uygulamalarında ısı işlemi, vakum paketleme, soğukta depolama ve nitrit ilavesi birlikte kullanılmaktadır (194). Sommers and Fan (194) irradyasyon ile antimikrobiyal madde uygulamalarının birlikte kullanılmasını tavsiye etmektedir.

Sucuk, sosis, salam ve pastırma ile ilgili çalışmalardan birinde, 25 sucuk örneğinin 6'sı, 25 sosis örneğinin 3'ü, 25 pastırma örneğinin ise 4'ü *L. monocytogenes* ile kontamine bulunurken, 25 salam örneğinde *L. monocytogenes* bulunmadığı rapor edilmektedir (195). Benzer şekilde Sancak ve ark. (176) vakumlu paketlenmiş 20'şer adet sucuk, salam ve sosis örneğinden sadece 1'inden, ambalajlanmamış 20'şer adet sucuk, salam ve sosis örneğinden ise toplam 10 *L. monocytogenes* izole edildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, salamlardaki *L. monocytogenes* izolasyon oranının sosislerden daha düşük bulunmasına sebep olarak salamlara 80°C 1 – 3 saat haşlama şeklinde uygulanan ısı işlemini göstermektedirler.

Türk tipi fermente sucuklarda olgunlaşma süresinden sonra floraya laktobasiller hakim olmaktadır. Bu bakterilerin oluşturduğu bakteriosinler asit ortamda, pH, tuz, nitrit ve sarımsağında etkisi ile *L. monocytogenes*'in yaşam ve gelişimini engellemektedir (191). Sucuk üretiminde olgunlaşmanın başlangıç safhasının *L. monocytogenes* gelişimi açısından en kritik aşama olduğu, bu aşamada pH değerinin hızlı bir şekilde düşürülmemesi halinde *L. monocytogenes* sayısının arttığı belirtilmektedir (196). Ülkemizde sucuk üretiminde starter kültür kullanımı bazı büyük işletmeler hariç pek yaygın olmadığından, bazı işletmelerde sucukların 2-3 gün içerisinde ve yeterince olgunlaşmadan piyasaya sürülebildiğinden, yeterince ısı işlemi görmeden veya çiğ olarak tüketilen sucuklar listeriozis açısından tehlike arz edebilmektedir (196). Bu konuda yapılan iki ayrı çalışmada pediosin üreten *Pediococcus acidilactici* ve sakasinA üreten *Lactobacillus sakei*'nin starter kültür olarak kullanıldıkları sucuklarda *L. monocytogenes* sayısının hızlı bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (196,197).

Ayaz ve Erol (198), hindi etinden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının % 51.4'ünün 4b (ya da 4d ya da 4e), % 27.0'sinin 1/2a (ya da 3a) ve % 21.6'sının 1/2b (ya da 3b) serotipinde olduğunu, kış aylarında toplanan örneklerden elde edilen izolatların çoğunun 4b serotipinde olduğunu bildirmişlerdir.

2.8.3. Sebze ve Meyveler

Hayvanlarla ilgili tarımsal çevrelere ek olarak *L. monocytogenes,* bitki yetiştirilen tarım çevrelerinden de izole edilmektedir. Değişen tüketim alışkanlıkları ve tercihleri doğrultusunda, tüketime hazır çiğ sebze tüketiminin artmasıyla bu gıdalar insan listeriozis salgınlarına neden olmaktadır (145). Sebze tüketiminin neden olduğu listeriozis salgınlarından ilkinin 1981 yılında Kanada'da lahana salatasından kaynaklandığı bildirilmiştir (200). İkincisi ise 1997 yılında İtalya'da bildirilmiş, konserve mısır ve ton balığı salatasının sorumlu tutulduğu salgından etkilenen 1566 kişide ateş ve gastroenteritis ile birlikte seyreden listeriozis semptomları görülmüştür (141). ABD'de 28 eyalette görülen ve 146 kişinin etkilendiği ve 31'inin öldüğü 2011 yılındaki büyük salgından sorumlu gıdanın kavun olduğu açıklanmıştır (201).

2.8.4. Tüketime Hazır Gıdalar

Tüketime hazır gıdalar geniş bir alana dağıtılmakta ve hazırlanma kaliteleri değişiklik göstermektedir. Bu tür gıdaların uzun depolama süreleri, tuza ve düşük pH'ya dayanıklı olan ayrıca düşük sıcaklıklarda üreyebilen *L. monocytogenes*'i bulaştırma potansiyellerini arttırmaktadır (157). Commission Regulation, tüketime hazır gıdaların gram ya da mililitresinde maksimum 100 kob *L. monocytogenes* bulunma sınırı getirmiştir (202).

Jiang et al. (157) çeşitli gıdalar ve hazırlanma süreçleri üzerine yaptıkları çalışmada, *Listeria* spp. kontaminasyonunun çoğunlukla işleme sürecinde gerçekleştiğini ve bu açıdan tüketime hazır gıdaların riskli olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Gombas et al. (203) da tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* prevelansının üretim aşamasından paketlenmiş ürünün depolama aşamasına kadar % 0.17 ile % 4.7 arasında değiştiğini rapor etmişler, paketlenmiş ve depolanmış üründeki bakteri sayısının belirgin olarak yüksek olmasını *L. moncytogenes*'in muhafaza sırasında üremesine bağlamışlardır.

Ülkemizde sevilerek tüketilen tüketime hazır gıdalardan etsiz ve etli çiğ köfte ile ilgili çalışmalarda: Taban (204), 70 etsiz çiğ köfte örneğinden 12'sinin (% 17.1) ve İşleyici ve ark. (205), 50 çiğ köfte örneğinden 6'sının (% 12) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

2.8.5.Süt ve Süt Ürünleri

Bilinen en büyük listeriozis salgınlarından biri 1983 yılında ABD'nin Massachusetts eyaletinde yaşanmış, salgından 49 kişi etkilenmiş ve 14 kişi ölmüştür. Salgından sorumlu tutulan gıda pastörize süt olarak açıklanmıştır (206).

Süt ve yumuşak peynir gibi süt ürünleri listeriozisi bulaştırmaları bakımından risk değerlendirmesine göre özel gıdalar kategorisinde sınıflandırılmaktadır. Bu ürünlerin herhangi bir ısı işlemi olmadan geleneksel olarak üretildiği ülkelerde, çiğ süt kontaminasyonunun çiftlik düzeyinde azaltılması gündeme gelmiştir (207). Bakterinin çiğ sütlerdeki prevelansı % 2-5 arasındadır (163). Çiğ sütteki *L. monocytogenes* kontaminasyonu sağım, depolama ve taşıma esnasında özellikle silajla beslenen hayvanlardan veya enfekte hayvanlardan kaynaklanan fekal ve çevresel bulaşmayla olmaktadır. Taşçı ve ark. (208), Burdur yöresinden toplanan 75 silaj, 85 silaj ile

beslenen inek sütü ve 90 silajla beslenmeyen inek sütündeki *Listeria* türlerini araştırdıkları çalışmalarında, silaj örneklerinden 5'inin (% 6.66), silajla beslenen inek sütü örneklerinden 1'inin (% 1.17) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu, silaj ile beslenmeyen ineklerden alınan süt örneklerinde ise hiçbir *Listeria* türü izole edilemediğini rapor etmişlerdir. *L. monocytogenes* izole edilen silaj örneklerinin pH değerinin 5.1- 8.3 arasında olduğu ve bu örneklerin a_w değerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (208).

Navratilova et al. (9) çiğ ve pastörize süt ile süt üretim çevreleri için bildirdikleri *L. monocytogenes* prevalansı Tablo 2.6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre sütün pastörizasyon için bekletildiği süreçte bakteri hızla üremektedir. Ancak pastörizasyon ısısı ile inaktive olmaktadır.

Tablo 2.5. Çiğ ve pastörize süt ile süt üretim çevrelerinde *L. monocytogenes* prevalansı (9)

Örnekler	**İncelenen örnek sayısı**	**Kontamine örnek sayısı**	**İzole edilen *L. monocytogenes* sayısı**
Çiğ süt	278	6 (% 2.1)	11
Tankerden alınan çiğ süt	77	4 (% 5.1)	8
Pastörizasyon öncesi ana tanktan alınan çiğ süt	20	3 (% 15.0)	6
Pastörizatörün balans tankından alınan çiğ süt	14	2 (% 14.0)	3
Pastörize süt	20	1 (% 5.0)	3
Yarı işlenmiş ürün (semi finished product)	10	0	0
Son ürün	200	0	0
Toplam	619	16 (% 2.6)	31

Deve sütünün *L. monocytogenes* üzerinde bakteriyostatik etkisi olduğu bildirilmektedir (209). Rahimi et al. (209) 90 çiğ inek sütü örneğinin 1'inden, 62 çiğ koyun sütü örneğinin 4'ünden, 60 çiğ keçi sütü örneğinin 1'inden *L. monocytogenes* izole ettiklerini ancak söz konusu etkenin 48 çiğ deve sütü örneğinin hiçbirinden izole edilemediğini rapor etmişlerdir.

Aurora et al. (35) 471 çiğ inek sütü ve 627 tüketime hazır süt ürününden oluşan 1098 örnekten 18'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen

izolatları serotiplendirmek için multiplex PCR kullandıklarını ve suşların 13'ünün 4b (4d ya da 4e); 4'ünün 1/2b (ya da 3b); 1'inin ise 1/2a (ya da 3a) serotipinde olduğunu belirtmişlerdir.

Ülkemizde de çiğ süt örneklerinde *L. monocytogenes* prevelansı üzerinde çalışmalar yapılmıştır: Sağun ve ark. (210) çalışmalarında inceledikleri 250 çiğ süt örneğinin 3'ünden (% 1.20), Uraz ve Yücel (211) 211 çiğ süt örneğinin 2'sinden (% 0.94), Dümen ve ark. (212) 300 çiğ süt örneğinin 12'sinden *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirilmişlerdir. Uysal ve Anğ (213), 221 çiğ süt örneğinin sadece 1'inden *L. monocytogenes* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Aygün ve Pehlivanlar (214) Antakya'dan toplanan 157 çiğ süt örneğinin hiçbirinin *L. monocytogenes* ile kontamine olmadığını bildirmişlerdir.

Ülkemizde çiğ sütten elde edilen izolatların serotiplendirilmesi ile ilgili olarak da Ünlü ve ark. (215), Sivas ilinden topladıkları 100 adet çiğ süt örneğinin 4'ünün *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu, elde edilen izolatların serotiplerinin 1/2b ve 4b olarak belirlendiğini, bir süt örneğinden iki farklı serotipte izolat izole edildiğini rapor etmişlerdir.

2.8.5.1. Peynirde *Listeria monocytogenes*

Çiğ sütten yapılmış peynirler, geleneksel tatları ve organoleptik özellikleri bakımından tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (170). Ancak çiğ sütün florasındaki mikroorganizma çeşitliliğinin organoleptik özelliklere katkısı bilinmektedir. Bununla birlikte patojen varlığının engellenebilmesi için söz konusu floranın kontrol edilmesi gerekmektedir. Patojenlerin güvenli bir şekilde ortadan kaldırılabilmesi için süte mutlaka ısı işlemi uygulanması gerekmektedir. Isı işlemi uygulanmış sütlerden yapılan peynirlerde geleneksel lezzetlere ulaşabilmek zor olmaktadır. (170). Rahimi et al. (209) çalışmalarında 30 ticari peynir örneğinin hiçbirinde *L. monocytogenes* bulamazken, geleneksel yöntemlerle üretilmiş 60 peynir örneğinin 9'undan *L. monocytogenes* izole edildiği belirtmişlerdir. Türkiye'de süt genellikle köy çiftliklerinde üretilmekte ve üretilen sütün büyük bir kısmı süt ürünleri haline getirilerek ev tüketimi için ayrılmaktadır. Evde üretilen peynirlerin küçük bir bölümü taze olarak, büyük kısmı ise salamurada olgunlaştıktan sonra tüketilmektedir (216). Sağun ve ark. (210) çalışmalarında en çok izolasyonun yaz aylarında ikinci olarak da sonbaharda olduğunu, ilkbahar ve kış aylarında hiç izolasyon olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu

durumu, izolasyonun daha çok olduğu yaz ve sonbahar dönemlerinde piyasadaki peynirlerin henüz olgunlaşmamış taze ve kısmen olgunlaşmış peynirler olmasına bağlamışlardır (210). Kum ve ark.(8) 29'u çiğ sütten üretilen, 21'i ısı işlemi görmüş sütten yapılmış olan 5 çeşit peynir örneği içinde *L. monocytogenes* ile kontaminasyon yüzdesi en yüksek olanın (% 22,7) ev yapımı çömlek peyniri olduğunu rapor etmişlerdir.

Dünyada 1000'den fazla peynir çeşidi tanımlanırken, ülkemizde bu rakam 40-50 civarındadır ve sadece kaşar peyniri, beyaz peynir ve tulum peyniri uluslar arası alanda ekonomik öneme sahiptir (210). Türk Gıda Kodeksi (TGK)' nin peynir çeşitleri için belirlediği mikrobiyolojik kriterler tebliği tablo 2.7'de görülmektedir (217).

Tablo 2.6. TGK tarafından peynir çeşitleri için belirlenen mikrobiyolojik kriterler tebliği (217)

Gıda	**Mikroorganizmalar**	**Numune Alma Planı**		**Limitler**[1]		**Uygulanacak Yöntem**
		n	**c**	**Min.**	**Max.**	
Peynir (eritme peynir hariç diğer tüm peynirler)	Koagulaz pozitif stafilokoklar	5	2	10^2	10^3	EN/ISO 6888-1 veya 2
	Salmonella	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 6579
	L. monocytogenes	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 11290-1
Eritme peynirler ve eritme peynir ürünleri	Stafilokokal enterotoksinler	5	0	25 g'da bulunmamalı		
	E. coli	5	0	$<10^1$		ISO 16649-1 ve 2
	L. monocytogenes	5	0	0/25 g-mL		EN/ISO 11290-1

[1]Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir.

L. monocytogenes'in beyaz peynirdeki canlılığının starter kültür eklenmesi, tuz oranı ve başlangıçtaki bakteri miktarına bağlı olduğu, bakterinin 4°C'de 3 ay muhafazaya dayanabildiği belirtilmektedir (218,219). Yıldırım ve Sarımehmetoğlu (220) *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*'un starter kültürler ile birlikte beyaz peynir yapımında kullanıldığı çalışmalarında *L. monocytogenes*'in inhibisyon

profilini belirlemişlerdir. Starter kültür içeren peynirlerde *L. monocytogenes* olgunlaşmanın son aşamalarında inhibe olurken stater kültüre ilave olarak probiyotik içeren peynirlerde daha erken inhibe olduğu ve probiyotiklerin *L. monocytogenes* açısından ekstra bir güvenlik sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca, starter kültür ilave edilmeyen peynirlerde olgunlaşma periyodu süresince % 6.6- 7.2 arasında saptanan tuz konsantrasyonunun *L. monocytogenes*'in inhibisyonu için yeterli olmadığı belirtilmiştir (220). Benzer şekilde Arıcı ve ark. (221), *L. monocytogenes*'in beyaz peynirde 18 haftalık olgunlaşma süresi sonunda toplum sağlığı için potansiyel risk oluşturduğunu, 4°C'de 20 haftadan fazla canlı kalabildiğini rapor etmişlerdir.

Filiousis et al. (136) sert peynir ve feta peynirinde *L. monocytogenes* bulunamamasına rağmen 10 yumuşak peynir örneğinin 4'ünde bulunduğunu bildirmişlerdir. Pintado et al. (222) çiğ koyun sütünden geleneksel yöntemlerle yapılmış 63 yumuşak peynirin 47'sinin *Listeria* türleri ile kontamine olduğunu ve bunların 29'unun *L. monocytogenes* olduğunu bildirmişlerdir. Gorgonzola peyniri (küflü ve yumuşak bir peynir türü) üzerine yapılan bir çalışmada 1656 peynir örneğinin paketlendikten sonraki *L. monocytogenes* kontaminasyonu % 2,1, peynirlerin son tüketim tarihindeki (paketlendikten 30 ila 60 gün sonra) kontaminasyonu ise % 4,1 olarak belirlenmiştir (223). Benzer şekilde Abrahao et al. (224) çalışmalarında nem oranına göre 10 gruba ayrılan 90 peynir örneğinin % 6.7'sinden *L. monocytogenes* izole ettiklerini ancak nem oranı düşük peynirlerden hiç bakteri izole edemediklerini rapor etmişlerdir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda: Aygun ve Pehlivanlar (214) 85 Türk tipi beyaz peynir örneğinin 2'sinden Sağun ve ark.(210) ise 254 adet otlu peynir örneğinin 10'undan *L. monocytogenes* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Uysal ve Anğ (213), Trakya, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu bölgeleri ve İstanbul'dan toplanan 271 peynir örneğinin 11'inden *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kum ve ark. (8), ısı işlemi görmüş peynirlerden 5 lor peyniri örneğinin 1'inin (% 20) ve 7 tel peynir örneğinin 1'inin (%14,2) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Bolu'da açık pazarlardan toplanan 142 ev yapımı beyaz peynir örneğinin 47'sinin *Listeria* türleri ile kontamine olduğu ve bunların 13'ünün *L. monocytogenes* olduğu bildirilmiştir (225). Gönç ve ark. (226), 82 beyaz peynir örneğinin %13,4'ünde, Arıcı ve ark. (221), 50 koyun peyniri örneğinin % 4'ünde *L. monocytogenes* saptadıklarını bildirmişlerdir. Gülmez ve Güven (227), Kars ilinde satışa sunulan 40 taze, 40 salamura olmak üzere

toplam 80 beyaz peynir ile 40 çeçil peyniri örneğinden 3'ünün (% 2.5) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu, salamura peynirlerden *L. monocytogenes* izolasyonu yapılamadığını rapor etmişlerdir. Akkaya ve Alişarlı (228) Afyonkarahisar ilinden toplanan 100 beyaz peynir örneğinin 6'sının, Ceylan ve Demirkaya (229) Erzurum'dan temin edilen 29 beyaz peynir örneğinin 1'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu belirtmişlerdir. Dümen ve ark. (212) 150 beyaz peynir örneğinden 3'ünün, 150 kaşar peyniri örneğinden 4'ünün ve 100 krem peynir örneğinden 1'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir.

2.8.5.2.Diğer Süt Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*

Dondurma, tereyağı, yoğurt ve ayran gibi süt ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığını araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Geleneksel yöntemle yapılmış ev dondurmalarının *L. monocytogenes* ile kontaminasyonu pastörize süt ile yapılmış ticari dondurmalardan belirgin derecede yüksektir (209). El-Sharef et al. (230) 160 dondurma örneğini inceledikleri çalışmalarında açıkta satılan dondurmalardan 7'sinin (% 4) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu ancak pakette satılanlarda *L. monocytogenes* bulunmadığını rapor etmişlerdir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada ise Abrahao et al. (224) marketlerden temin ettikleri 60 dondurma örneğinin hiçbirinden etkeni izole edemediklerini belirtmişlerdir. Kayseri'de satışa sunulan sade ve meyveli dondurmalardaki *Listeria* türlerinin, ISO 11290- 1/ A1-2004 metodu kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada 25 sade dondurmadan 3'ünün sadece *L. monocytogenes* ile 2'sinin de hem *L. monocytogenes* hem de *L. ivanovii* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada aynı sayıdaki meyveli dondurma örneklerinden ise 1'inin sadece *L. monocytogenes*, 1'inin *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri*, 1'inin ise *L. monocytogenes* ve *L. grayi* ile kontamine olduğu belirtilmiştir (231). Buna karşın Keskin ve ark. (232) İstanbul'dan satın alınan 50 sade dondurma örneğinden *L. monocytogenes* izole edemediklerini belirtmişlerdir.

Yoğurt, kashk gibi laktik asit bakterilerinin hakim olduğu ve pH'sı düşük süt ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığı bildirilmemektedir (136,174,190,209,214). Ayrıca tereyağında da ya hiç bulunmamakta ya da çok az miktarda bulunmaktadır (213,214).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Materyal

Çalışma kapsamında Niğde ili halk ve köy pazarlarından, 2011 Nisan- Haziran ayları arasında toplanan çiğ sütten yapılmış 100 taze beyaz peynir ve 100 tulum peyniri olmak üzere toplam 200 peynir numunesi kullanıldı. Steril poşetlere alınan peynir örnekleri soğuk zincir altında laboratuara ulaştırıldıktan sonra en geç 1-2 saat içerisinde analiz edildi.

3.1.2. Standart Suş

Listeria monocytogenes'in izolasyon, identifikasyon ve PCR analizlerinde kullanılmak üzere *L. monocytogenes* ATCC 7644 referans suşu ve Niğde Üniversitesi Bor Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nden temin edilen *L. monocytogenes* saha izolatı kontrol suş olarak kullanıldı. *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testlerinde negatif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nden temin edilen *S. aureus* ATCC 25923 referans suşu kullanıldı.

3.1.3. *Listeria* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

3.1.3.1. Half Fraser Broth

Fraser Listeria Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398.0500)

Bileşim

Proteose peptone	5.0 g
Peptone from casein	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Meat extract	5.0 g
Sodium chloride	20.0 g
Disodium hydrogen phosphate	9.6 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.35 g
Esculin	1.0 g
Lithium chloride	3.0 g
pH	7.0 ± 0.2

Fraser Listeria SelectiveSupplement (Merck, 1.11883)

Hazırlanışı

Ön zenginleştirme aşaması için toz halindeki ticari besiyerinden 18 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü, pH'sı ayarlandı ve otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50ºC'ye soğutulduktan sonra üzerine 1 ml steril distile su ile süspanse edilmiş Fraser Supplement'ten ve 1 ml steril distile su ile süspanse edilmiş Amonyum iron (III) citrate'den 1'er vial eklendi.

3.1.3.2. Oxford Listeria Selective Agar

Oxford Listeria Selective Agar (Merck 1.07004.0500)

Bileşim

Peptone	23.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Glucose	0.5 g
Starch	1.0 g
Lithium chloride	15.0 g
Esculin	1.0 g
Ammonium(III) citrate	0.5 g
Agar	13.0 g
pH	7.0± 0.2

Oxford Listeria Selective Supplement (Merck 1.07006)

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 29.25 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7.0 ± 0,2'ye ayarlandı. Manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica ARE) eritildikten sonra otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 ºC'ye soğutulduktan sonra üzerine 2.5 ml etanol ve 2.5 ml steril distile su karışımı ile sulandırılmış 5 ml Listeria Selektive Supplement eklendi. Besi yeri steril petrilere dökülerek kullanılana kadar +4ºC'de muhafaza edildi.

3.1.3.3. Kanlı Agar

Blood Agar Base (Merck 1.10886.0500)

Bileşim

Nutrient substrate (heart extract and peptones, kalp ekstraktı ve peptonlar)	20.0 g/L
NaCl	5.0 g/L
Agar-agar	15.0 g/L
pH	6.8

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 40 g tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica ARE) eritildi. Karışımın pH değeri 6.8 ± 0.2'ye ayarlanarak otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edildi. 50 ºC'ye soğutulduktan sonra üzerine % 5 defibrine koyun kanı eklendi. Steril petrilere dökülerek 4ºC'de muhafaza edildi.

3.1.3.4. Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Bileşim

Peptone from casein	17.0 g/L
Peptone from soymeal	3.0 g/L
D(+) Glukose monohydrate	2.5 g/L
Sodium chloride	5.0 g/L
di-potassium hydrogen phosphate	2.5 g/L
pH	7.3

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 30 g tartılarak 1 lt distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7.3 ± 0.2'ye ayarlandı. Karışım, manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica ARE) eritildi ve 121ºC'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.3.5. Oksidaz Test

Bactident Oxidase (Merck 113300) Stick

3.1.3.6. Katalaz Test

Hydrogen Peroxide (H_2O_2) (Merck 8597)

Hazırlanışı

Ticari % 30'luk hidrojen preoksitten 2 ml alınarak 27 ml distile suyla karıştırıldı ve % 3'lük H_2O_2 solusyonu hazırlandı.

3.1.3.7. *Listeria* spp. İdentifikasyon Kiti

Listeria spp. izolatlarının identifikasyonu için Microbact 12L test kiti (Microbact Listeria 12L Listeria identification system MB1128 Oxoid) kullanıldı. Bu identifikasyon kitinde 11 farklı şeker ve 1 hemoliz test kutucuğundan oluşan mikro düzeyde biyokimyasal test sistemi vardır. Şüpheli her bir koloninin 18-24 saat inkübasyonu sonrasında oluşan renk değişimi değerlendirilmektedir. Renk değişimi, kontrol kartlarına işlenerek elde edilen 4 basamaklı kod özel bilgisayar programına girilmektedir. Özel bilgisayar programı, girilen koda göre koloninin hangi *Listeria* türüne ait olabileceğini % olarak vermektedir.

3.1.4. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar

3.1.4.1. Axygen Biosiciences AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit

DNA ekstraksiyon kiti. AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit, 50-prep LotNo: KC40091203.

3.1.4.2. *Taq* DNA Polymerase Seti (Vivantis)

Bileşimi

Taq DNA polymerase 500 U (5 U/µl)

PCR Buffer 10 x

MgCl2 25 mM

3.1.4.3. dNTP Seti (Vivantis)

Bileşimi

dATP 100 mM

dCTP 100 mM

dGTP 100 mM

dTTP 100 mM

3.1.4.4. Gene Ruler Seti (Vivantis)

Bileşimi

DNA Ladder Plus (G210A) 100bp

Blue/Orange Loading Dye 6x (G190A)

3.1.4.5. Primerler

*Hly*A (listeriolizin-O) 840 bp

Primer Dizilimi

primer A [5`-CCT AAG ACG CCA ATC GAA-3`]

primer B [5`-TAG TTC TAC ATC ACC TGA GAC AGA-3`]

Border ve ark. (1990) tarafından bildirilen ve liyofilize olarak temin edilen primerler üretici firmanın önerdiği miktarlarda steril distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

3.1.4.6. 10X TBE Stok Solüsyonu (GIBCO, Invitrogen, 15581-004)

Bileşimi

Tris Base	1.0 M
Boric Acid	0.9 M
EDTA	0.01 M

Hazırlanışı

10xTBE stok solüsyondan 50 ml alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanıp 1xTBE solüsyonu elde edildi.

3.1.4.7. Ethidium Bromide (Merck 1.11608.0030)

Hazırlanışı

Stok solüsyon 1:9 oranında sulandırılarak 1 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı.

3.1.4.8. Agaroz Jel (Vivantis, AG6330)

Hazırlanışı

Yüzde 1,5'luk agaroz jel hazırlamak için 100ml 1xTBE Buffer içinde 1.5 gram agaroz jel mikrodalga fırında eritildi ve 50ºC'ye soğutuldu. Üzerine 4µL etidium bromid ilave edildi ve elektroforez küvetine döküldü.

3.1.5. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri, Antibiyotikler, Çözücü ve Sulandırıcılar

3.1.5.1. Mueller Hinton Buyyon Katyon- Ayarlanmış

Mueller Hinton Buyyon (Katyon- Ayarlanmış) (GLB, REF-LOT: 0263-8511)

İçerik (1 litrede):

Et enfüzyonu	3 g.
Kazein asit hidrolazı	17.5 g.
Nişasta	1.5 g.
Kalsiyum	20 mg
Magnezyum	10 mg.
Distile su	

3.1.5.2. Antibiyotikler

Penisilin G sodium salt 10MU	(Sigma Aldrich, Lot# 071M074V)
Trimethoprim 25g	(Sigma Aldrich, Pcode: 100946080)
Vancomisin HCl 5g	(Multicell Lot#400138010)
Chloramphenicol 25g	(Sigma Aldrich Lot#100M0061V)
Erythromycin 25g	(Sigma Aldrich Lot#090M1715V)
Nalidixic acid 25g	(Sigma Aldrich Lot#020M1562V)
Tetracycline hydrochloride 25g	(Sigma Aldrich Lot#110M1693V)
Ciprofloxacin 25g	(Sigma Aldrich Lot#BCBC7322V)
Sulfanilamide 100g	(Sigma Aldrich Lot#STBB4751V)
Ampicilin Sodium 10g	(Duchefa Biochemie Lot#006701.05)
Gentamicin Sulfate Salt Hydrate 250mg	(Fluka Lot#SZBA050XV)

3.1.5.3. Çözücüler

Steril Distile Su

Distile su cihazından (Millipore France) elde edildi ve 121ºC'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

1 mol/l NaOH

1 litre distile suya 4 g NaOH (Merck 106462.9050) eklenerek çözdürüldü.

2.5 mol/l NaOH

1 litre distile suya 10 g NaOH (Merck 106462.9050) eklenerek çözdürüldü.

%95'lik etanol

Etil Alkol, (Tekkim TK.200650.05000)

pH 8,0'lık 0,1mol/l fosfat tamponu:

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (sodyum dihidrojenfosfat)	7.8 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (sodyum hidrojenfosfat)	17.9 g
pH	8.0

3.1.5.4. Sulandırıcılar

0.05 mol/l HCl

100 ml distile suya 0.41ml %37'lik HCl (Carlo Erba, 403872) eklenerek çözdürüldü.

pH 6,0'lık 0,1mol/l fosfat tamponu:

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (sodyum dihidrojenfosfat)	7.8 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (sodyum hidrojenfosfat)	17.9 g
pH	6.0

3.1.6. *Listeria monocytogenes*'in serotiplendirilmesinde kullanılan gereçler

3.1.6.1. *Listeria* Antisera Set Denka Seiken

Listeria Antisera Set Denka Seiken (2mlx8, 5mlx4, 294616, Japan)

3.1.6.2. Brain Heart Infusion Agar

Brain Heart Infusion Agar (Merck 1.13825, Darmstadt Germany)

Bileşim

Nutrient substrate	27.5 g
D(+) Glukose	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
di- Sodium hydrogen phospate	2.5 g
pH	7.4

Hazırlanışı

Hazır besiyerinden 26 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü ve manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica ARE) çözündürüldü. Karışımın pH'sı ayarlandıktan sonra otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edildi. Besi yeri steril petrilere dökülerek kullanılana kadar +4ºC'de muhafaza edildi.

3.1.6.3. Brain Heart Infusion Broth

Brain Heart Infusion Broth (Merck, 1.10493, Darmstadt Germany)

Bileşim

Nutrient substrate	27.5 g
D(+) Glukose	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
di- Sodium hydrogen phospate	2.5 g
pH	7.4

Hazırlanışı

Hazır besi yerinden 18.5 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü ve manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica ARE) çözündürüldü. Karışımın pH'sı ayarlandıktan sonra otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edildi.

Agar No.2

Agar No.2 (LAB M, International Diagnostics Group plc Q24969).

3.1.6.4. %0.3 Agar İçeren Brain Heart Infusion Broth

Hazırlanışı

Brain Heart Infusion Broth (Merck, 1.10493) hazır besiyerinden 18.5 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü, üzerine 1.5 g agar agar (Agar No.2 LAB M) ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica ARE) çözündürüldü. 121ºC'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Su banyosu

Su banyosu (Nüve BM 302)

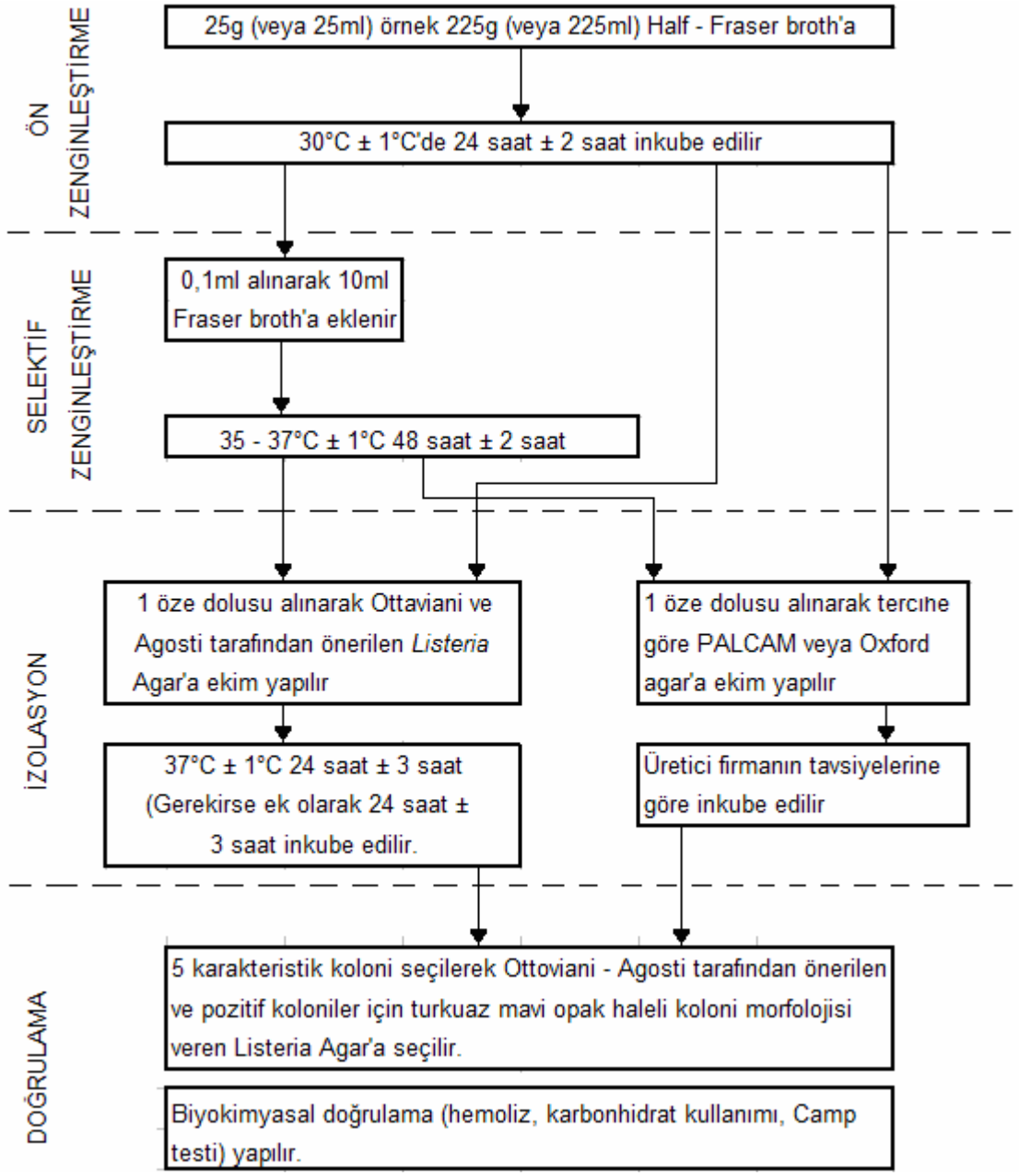
***%2* sodyum klorid**

2 g NaCl 100 ml distile suda çözündürüldü. 121ºC'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Peynir Örneklerinden *L. monocytoges* İzolasyonu

Aseptik şartlarda alınarak soğuk zincir altında laboratuara getirilen peynir örneklerinde *L. monocytogenes*'in varlığı ISO 11290-1/A1- 2004 metodu ile saptanmıştır (62). Söz konusu metodun aşamaları şekilde özetlenmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Horizontal yöntemle *L. monocytogenes* izolasyonu. ISO11290-1/A1-2004 (62).

ISO 11290-1/A1-2004 metodu çerçevesinde 25'er g peynir örneği steril filtreli numune poşetlerine (Bag Fitler 400P, Interscience, St. Nom La Breteche, Fransa) tartıldı. Üzerine 225 ml 1/2 konsantrasyonda (inhibitörleri yarım konsantrasyonda içeren) Fraser Listeria Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398) besiyeri ilave edilerek stomacherde (BagMixer, Interscience, France) 2 dk homojenize edildi ve ön zenginleştirme amacı ile 30^{o}C 'de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.2).

İnkübasyon süresi sonunda ön zenginleştirme yapılmış kültürlerden 0.1 ml alınarak 10'ar ml'lik tam kuvvette hazırlanan (inhibitörleri normal konsantrasyonda içeren) Fraser Listeria Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398) tüplerine ilave edildi ve 37^{o}C'de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.3).

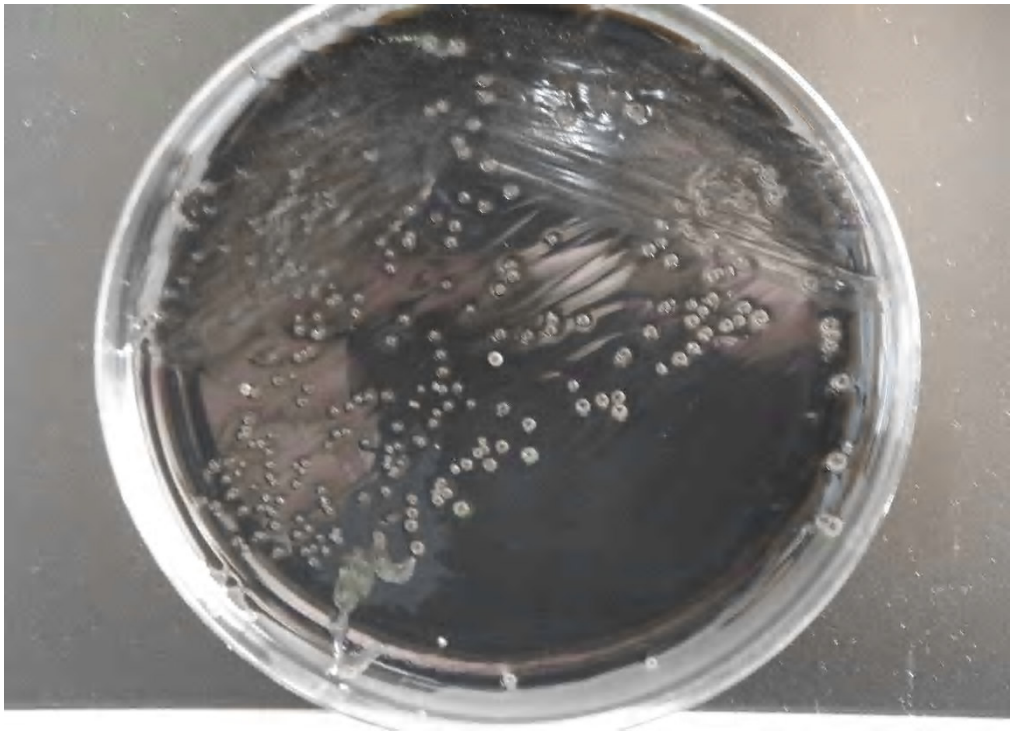


Şekil 3.2. Half Fraser Broth ile ön zenginleştirme aşaması



Şekil 3.3. Fraser Broth ile selektif zenginleştirme aşaması

Daha sonra brothlardan öze yardımıyla polymyxin- acriflavin- lithium chloride-ceftazidime-esculin- mannitol içeren Oxford Listeria Selective Agar besiyerlerine (Merck 1.07004.0500) çizme plak yöntemiyle ekim yapılarak 37^{o}C 'de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Oxford Listeria Selektiv Agar'a ekim aşaması

L. monocytogenes şüpheli kolonilerden 1-5 adet koloni seçilerek biyokimyasal testleri gerçekleştirmek için kanlı agara geçildi ve 37^{o}C 'de 24 saat inkübe edildi.

3.2.2.Biyokimyasal Testler

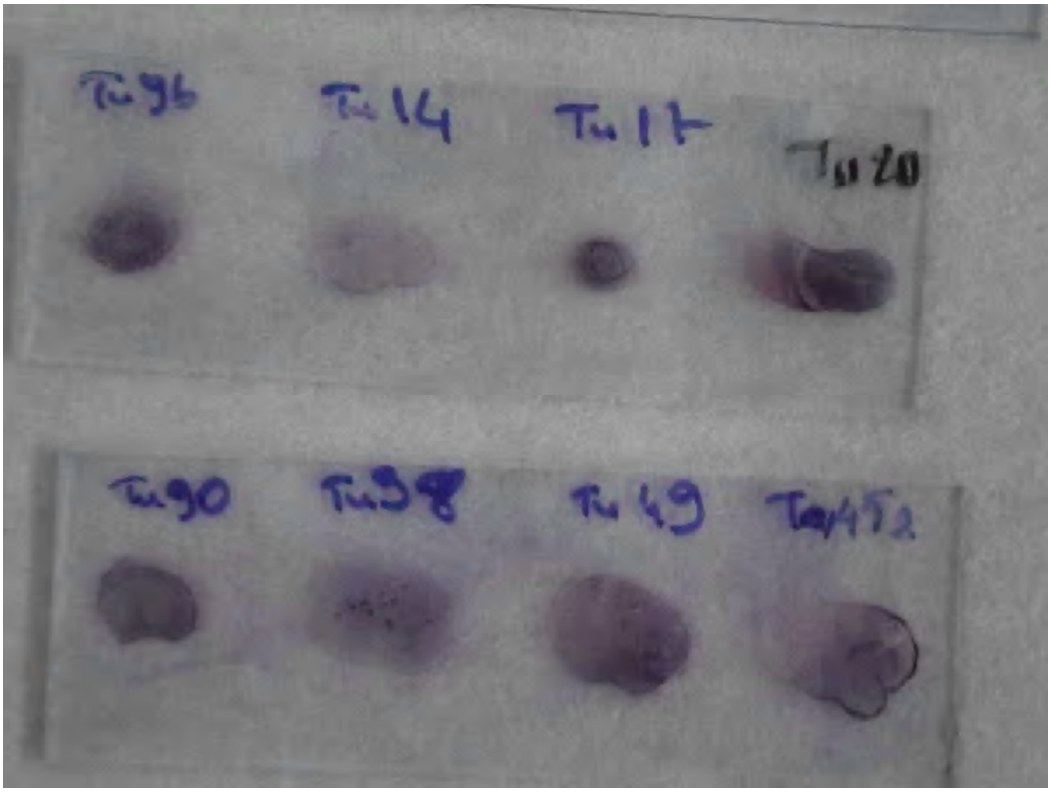
Kanlı agarda β-hemoliz oluşturarak üreyen kolonilere sırasıyla Gram boyama, Katalaz (Hydrogen Peroxide Merck) ve Oksidaz (Bactident Oxidase, Merc 113300) testleri yapıldı.

3.2.2.1. β-Hemoliz

Listeria spp. şüpheli koloniler defibrine koyun kanı ile hazırlanan % 5'lik kanlı agarlara ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda etrafında açık renkli berrak zon oluşan koloniler β-hemoliz pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2.2.Gram Boyama

Şüpheli koloniler lam üzerinde preparatları hazırlanarak alevde tespit edildi. Preparatlar kristal viyole ile 1-2 dakika boyandıktan sonra saf su ile yıkandı. Bir dakika lugol çözeltisi uygulamasını takiben önce % 96'lık alkol ile daha sonra saf su ile yıkandı. Yıkanan preparatlar sulu karbon fuksin çözeltisi ile 10-20 saniye boyandıktan sonra tekrar saf su ile yıkanıp kurutuldu. Bu şekilde Gram boyaması yapılan preparatlar mikroskobun (Nikon Alphaphot-2, Japonya) immersiyon objektifinde incelendi ve mavi-menekşe renk almış, kısa çubuk, kokobasil formundaki mikroorganizmalar *Listeria* spp. şüpheli olarak kabul edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Gram boyama aşaması

3.2.2.3. Katalaz Test

Kanlı agardan alınan şüpheli koloniler bir lam üzerinde öze yardımıyla bir damla % 3'lük H_2O_2 ile karıştırıldı. 1-2 saniye içinde görülen köpürme şeklindeki gaz oluşumu katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2.4. Oksidaz Test

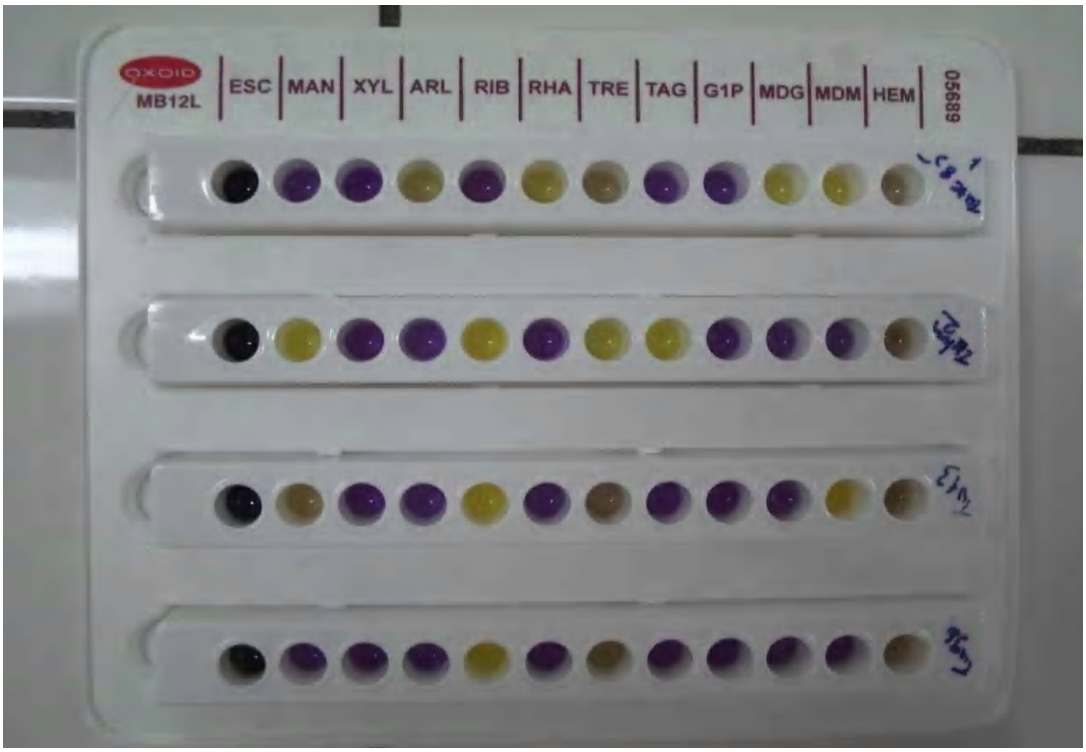
Test çubuğu katı besiyerindeki (kanlı agar) şüpheli *Listeria* spp. kolonisine dokundurulduğunda, 20-60 saniye içinde renk reaksiyonunun oluşmaması oksidaz negatif olarak değerlendirildi.

3.2.2.5. Hareket muayenesi

Temiz bir lam üzerine bir damla FTS (Fizyolojik Tuzlu Su) damlatıldı. İzolattan öze yardımıyla alınan bir koloni FTS içinde homojenize edildi. Üzerine lamel kapatılarak immersiyon objektifinde incelendi. 25ºC'de hareket gözlenip 37ºC'de gözlenmemesi pozitif kabul edildi.

3.2.2.6. Microbact Testi

Katalaz pozitif, Oksidaz negatif ve Gram pozitif olan koloniler Microbact test kitinde (Microbact *Listeria* 12L *Listeria* identification system MB1128 Oxoid) biyokimyasal özellikleri (Esculin, Mannitol, Ksiloz, Arabitol, Ribose, Rhamnose, Trehalose, Tagatose, Glucose-1-Phosphate, Methyl-D-Glucose, Methyl-D-Mannose, Hemolysis) açısından değerlendirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Microbact Test Kiti

3.2.3. PCR Tekniği

PCR işleminde tüm *L. monocytogenes* serotiplerine spesifik *hlyA* gen bölgesine ait 840 bp'lık primerler kullanılmıştır (234). Bu primerlere ait baz dizilimleri aşağıda verilmiştir (235).

primer A [5`-CCT AAG ACG CCA ATC GAA-3`]

primer B [5`-TAG TTC TAC ATC ACC TGA GAC AGA-3`]

3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon için gliserinli TSB içeren boncuklu cryo tüplerinde -20 ^{o}C'de muhafaza edilen izolatlar Brain Heart Infusion Broth'da (Merck, 1.10493) 37^{o}C'de inkübe edilmek suretiyle zenginleştirme işlemine tabi tutuldu. İnkübasyonun ardından genomik DNA ekstraksiyonu, Axygen Biosciences AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit kullanılarak yapıldı. Ticari firmanın direktifleri doğrultusunda:

1- 2ml'lik mikrofug tüpte 1x10^{9} bakteri toplanarak 11.227 rpm'de 30 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildi. Daha sonra süzüntü döküldü ve bakteriyel pelet 150µL Buffer S ile yeniden sulandırıldı.

2- Elde edilen bakteri süspansiyonunun üzerine 20µL lizozim eklendi ve 37°C'de 30 dakika bekletildi.

3- Üzerine 30µL 0,25M ETDA (pH8) eklendi. İyice karıştırıldı. Karışım buz üzerinde 5 dakika bekletildi.

4- 450µL Buffer G-A eklendi ve 15 dakika vortekslendi.

5- Üzerine 400µL Buffer G-B eklendi. Daha sonra önceden soğutulmuş 1ml Buffer D-V'den üzerine ilave edilerek iyice karıştırıldı. 11.227 rpm'de 2 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildi.

6- Ortadaki katmana dokunmadan üst faz atıldı.

7- Önceden soğutulmuş Buffer D-V'den 1ml eklendi. İyice karıştırılıp 2 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildi.

8- Renkli üst katman atıldı, alt katman spin – fitler takılmış 2ml'lik mikrofug tüpe transfer edildi. Sonra 1 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildi.

9- Spin filter uzaklaştırıldı. Filtrata 400µL Buffer B-V eklendi ve iyice karıştırıldı.

10- 2ml'lik mikrofug tüpe miniprep column yerleştirildi ve Buffer B-V eklenmiş filtrat bu tüpe aktarıldı. Daha sonra 1 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildi.

11- Filtrat uzaklaştırıldı, miniprep column yeniden 2 ml'lik mikrofug tüpe konuldu. Üzerine 500µL Buffer W_1 eklendi, 1 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildikten sonra filtrat uzaklaştırıldı.

12- Minprep yeniden mikrofug tüpe koyuldu ve üzerine 700µL Buffer W_2 eklendi. 1 dakika santrifü j(Universal 320R Germany) edildikten sonra filtrat uzaklaştırıldı.

13- 12. basamaktaki işlem tekrar edildi.

14- Filtrat uzaklaştırıldı. Miniprep yeniden mikrofug tüpe koyularak 1 dakika santrifüj (Universal 320R Germany) edildi. Daha sonra miniprep 1,5ml'lik temiz bir mikrofug tüpe transfer edildi. Üzerine DNA'yı ayrıştırmak amacıyla 100-200µL eluent eklendi. Oda ısısında 1 dakika beklettikten sonra 1 (Universal 320R Germany) dakika santrifüj edildi. Miniprep colum atıldı. Mikrofug tüpteki DNA örneği PCR mixi hazırlamak için kullanıldı.

3.2.3.2. PCR Amplifikasyonu

Zhang, (236) tarafından bildirilen PCR mixi modifiye edilerek kullanıldı.

25µL'lik PCR mixi için:

1xBufferA (Vivantis)

1,5mM $MgCl_2$ (Vivantis)

0,1mM dNTPs (Vivantis)

0,2mM primer A (Dr. Zeydanlı)

0,2mM primer B (Dr. Zeydanlı)

5mM DNA kullanıldı

Zeng ve ark. (237) tarafından bildirilen amplifikasyon siklusu uygulandı (Techne TC-512, USA). Siklus parametreleri:

İlk denatürasyon 94°C'de 4 dakika

94°C'de 40 saniye denatürasyon ,
62°C'de 40 saniye primer bağlanması, } 30 siklus
72°C'de 40 saniye, primer uzaması

72°C'de 5 dakika son extension olacak şekilde uygulandı.

3.2.3.3. Elektroforez

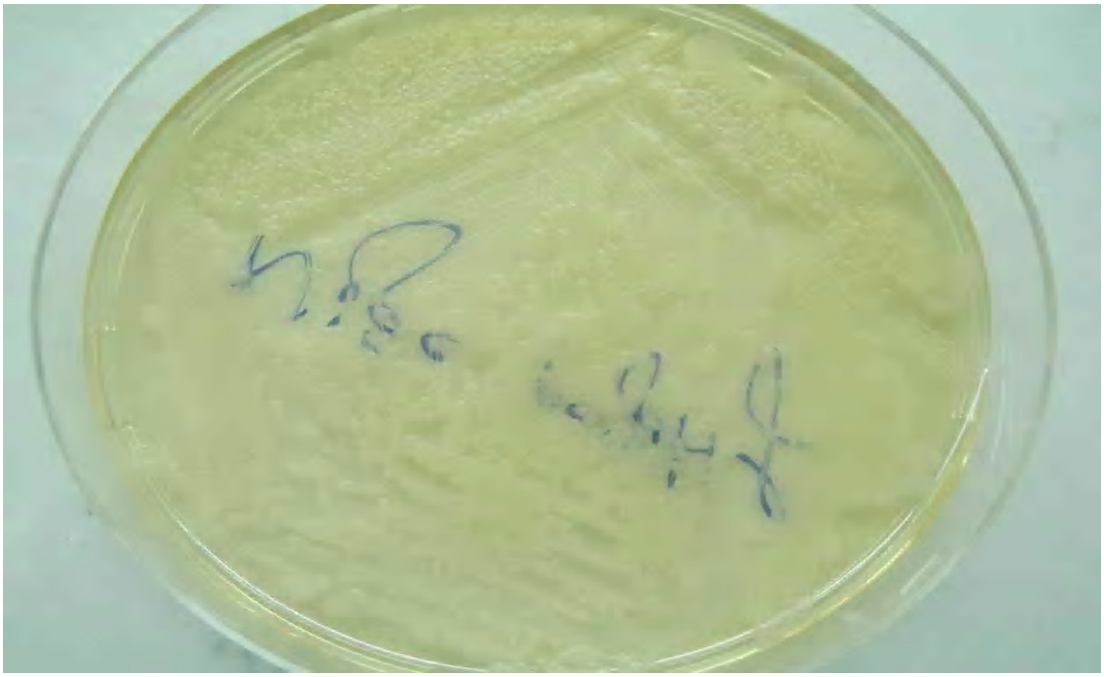
Elde edilen amplikonlar % 1'lik Ethidium Bromide'li agarda 90 voltta 1 saat elektroforez (Thermo EL, MIDICELL, PRIMO) işlemine tabi tutuldu. Jel UV ışığı altında incelendi ve 840 bp'lık bantın görülmesi örneğin *L. monocytogenes* yönünden pozitif olduğunu gösterdi.

3.2.4. Serotiplendirme

Örneklerden izole edilen *L. monocytogenes* suşları, *L. monocytogenes*'in serotiplerine ait ticari spesifik antiserumlar (Denka, Seiken, Tokyo Japan) kullanılarak, serotiplendirildi.

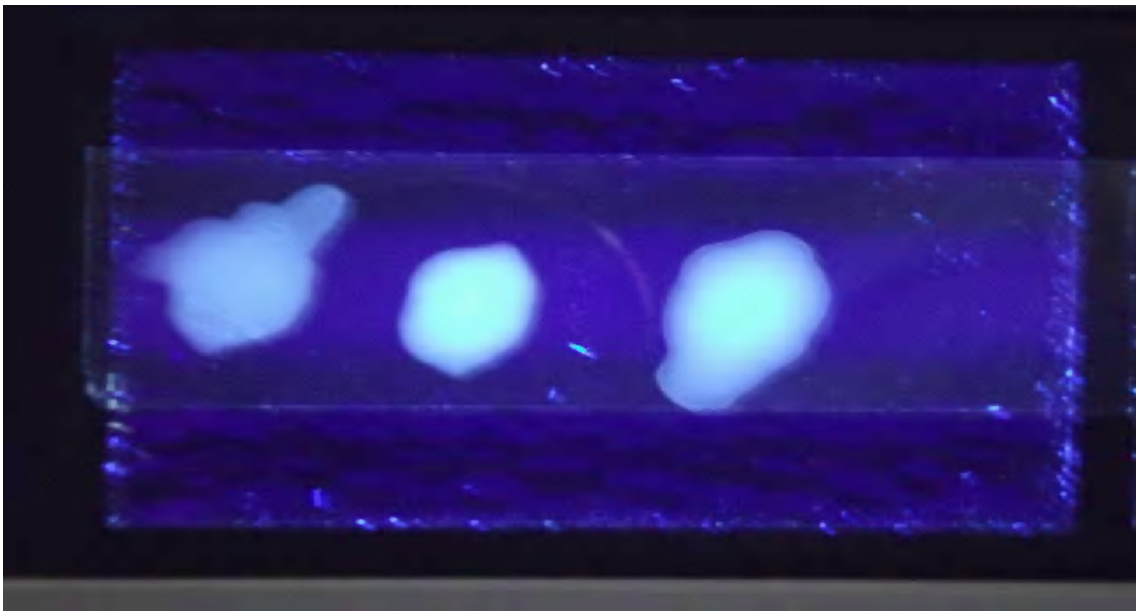
3.2.4.1. O antijeninin tanımlanması

O antijeninin tanımlanması ısı ile inaktive edilmiş bakterilerden yüzey aglitünasyon metodu ile yapılmaktadır. Brain Heart Infusion agarda (Merck 1.13825) kültür edilmiş bakteriler (şekil 3.7.) %0,2'lik sodyum klorid içinde bakteri süspansiyonu yaklaşık 10mg/ml (kob/ml cinsinden olmalı) olacak şekilde süspanse edildi. Süspansiyon 121°C'de 30dk. otoklavlandıktan sonra 3000 rpm'de 20 dk. santrifüj (Universal 320R Germany) edildi. Üstteki sıvı atıldı ve elde edilen pelet az miktarda %0.2'lik sodyum klorid ile yeniden süspanse edildi.



Şekil 3.7. Brain Heart Infusion Agar'da *L. monocytogenes* kolonileri

Temiz bir lamın üzerine birer damla (yaklaşık 30µl) I/II ve V/VI antiserumları ile fizyolojik tuzlu su koyuldu. Antiserumların ve fizyolojik tuzlu suyun üzerine hazırlanan bakteri süspansiyonundan 5-10 µl ilave edildi. 1 dk. beklenerek aglitünasyon gözlendi. Fizyolojik tuzlu su ve bakteri karışımı negatif kontrol olarak kullanıldı (Şekil3.8).



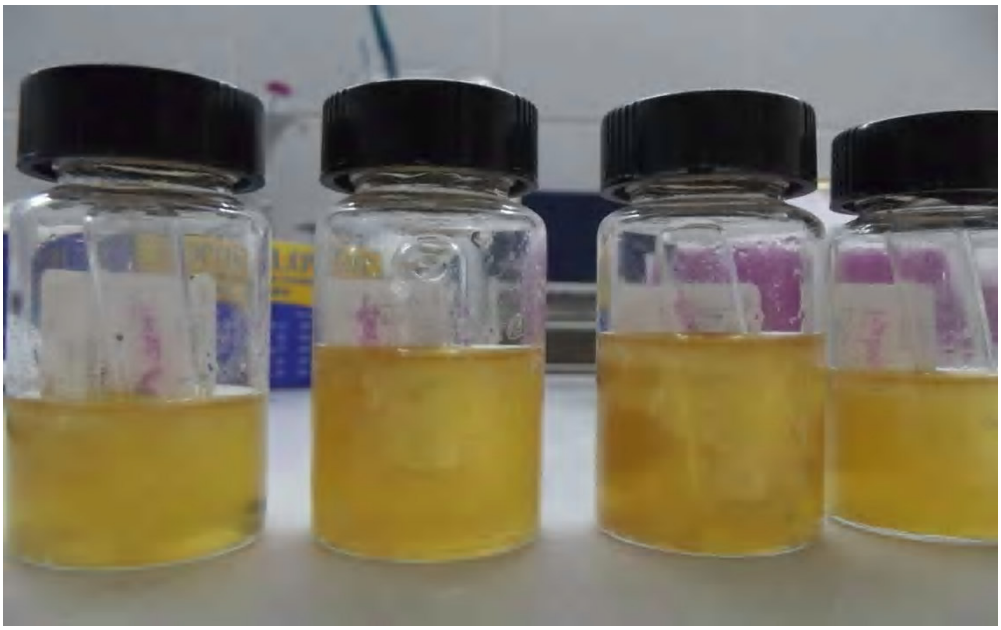
Şekil 3.8. Lam üzerinde aglitünasyon görüntüsü

I/II antiserumunda aglitünasyon oluşturan bakteriler 1/2 ya da 3 serogruplarına aittir. Bu bakterilere lam üzerinde I ve IV antiserumları ayrı ayrı uygulandı. Çalışmamızdaki iki bakteri, I antiserumuna pozitif sonuç verdi ve 1/2 serogrubunda oldukları tespit edildi.

V ve VI antiserumunda aglitünasyon oluşturan *L. monocytogenes* izolatının ise 4 serogrubuna ait olduğu belirlendi. Serotipinin belirlenebilmesi için izolata VI, VII, VIII ve IX antiserumları lam üzerinde ayrı ayrı uygulandı. Çalışmamızdaki diğer bakteri VII ve IX antiserumları ile aglitünasyon oluşturdu.

3.2.4.2. H Antijeninin Tanımlanması

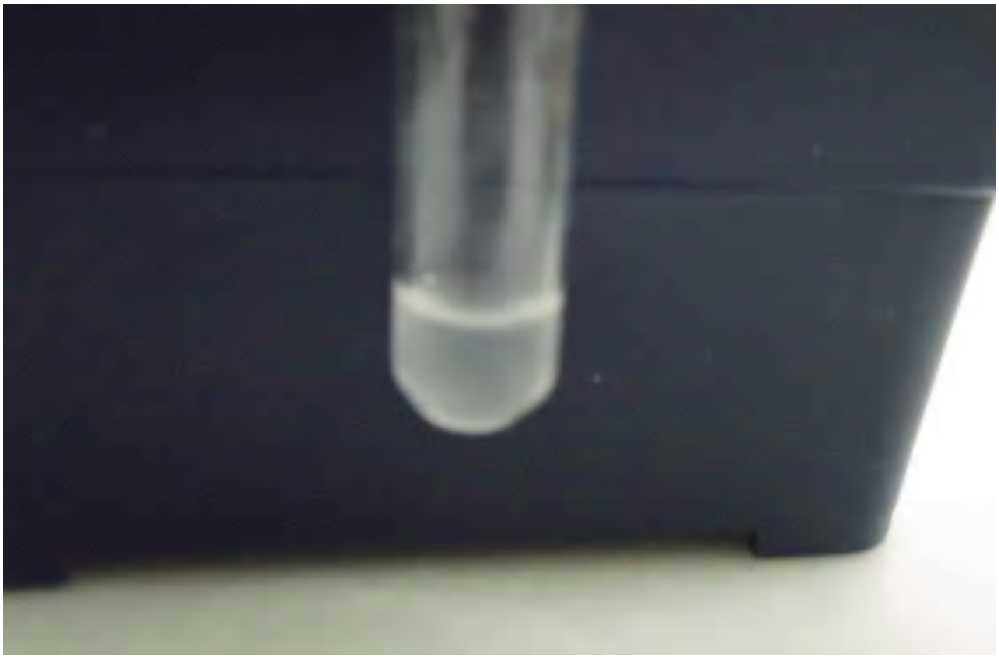
*L. monocytogenes'*in 1-4 flagellası bulunmaktadır. Bu test ile flagellası olan hareketli bakteriler tespit edilmekte ve flagellar antijen tanımlanmaktadır. Hareketin tespiti için ilk önce bakteri % 0.3 agar içeren Brain Heart Infusion Broth'a (Merck, 1.10493) ekilerek 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve hareketli bakteriler çoğaltıldı (şekil 3.9).



Şekil 3.9. Hareketli izolatların yukarı doğru üremesi (Craigie tüpleri ile yapılan işlemin adaptasyonudur)

Yukarı doğru üreme görülen Craigie tüplerinden öze yardımı ile alınan koloniler Brain Heart Infusion agara (Merck 1.13825) ekildi. Yine 30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra agarda üreyen koloniler bir öze yardımı ile sıyrılarak eşit miktarda fizyolojik tuzlu su ve % 1'lik formalin içeren solüsyonun içinde süspanse edildi. Steril cam aglitünasyon tüplerine 0.5ml bakteriyal süspansiyondan konuldu ve üzerlerine H

antiserumlarının her birinden 2'şer damla (HA, HAB, HC, HD) ilave edildi. Antiserum koyulmayan tüpler kontrol grubu olarak kullanıldı. Her bir tüp, homojenizasyon için karıştırıldı ve 52°C'lik su banyosunda 1 saat bekletildi. Süre sonunda aglitünasyon görülen tüpler pozitif kabul edildi (şekil 3.10).



Şekil 3.10. Aglütinasyon tüplerinde H antijeni tespiti

3.2.5. Antibiyotik Dirençlilik Testi

Çalışma sonunda elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının antimikrobiyel dirençlilik profilleri CLSI (108)'de belirtilen broth mikrodilusyon test yöntemiyle belirlendi.

Çalışmada: Tetrasiklin, Siprofloksasin, Gentamisin, Ampisilin, Eritromisin, Trimetoprim, Vankomisin, Kloramfenikol, Nalidiksik asit, Penisilin G ve Sulfonilamid antibiyotikleri kullanıldı.

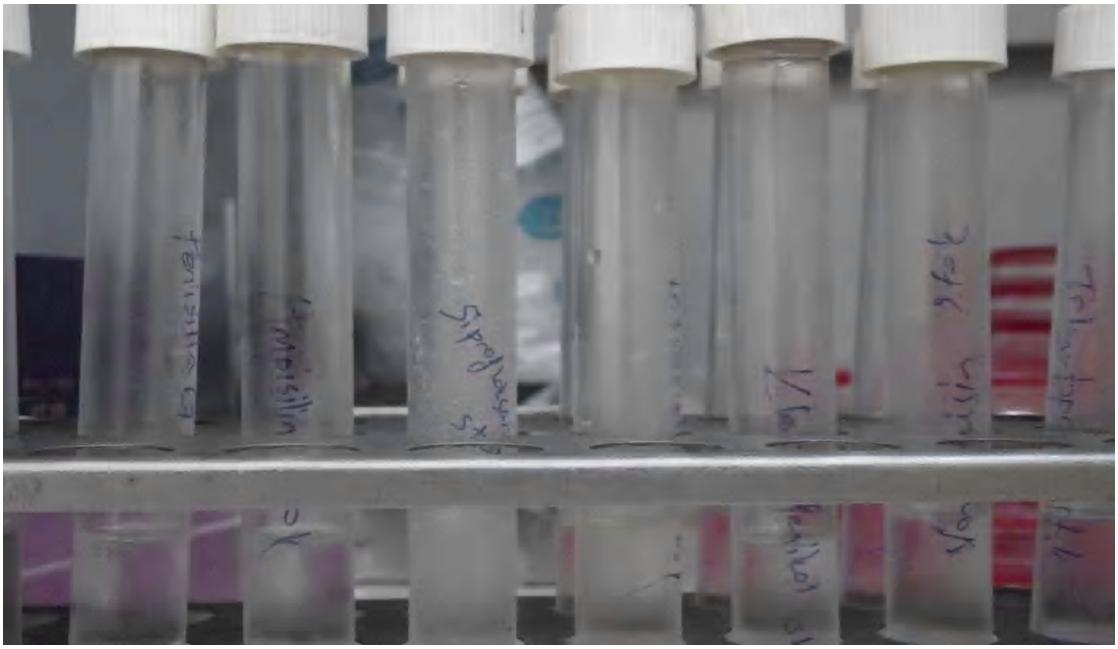
3.2.5.1. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Öncelikle antibiyotiklerin etken madde içeriği ve stok solusyonların hazırlanması CLSI'nın (108) standardında belirttiği formülle hesaplandı.

Etken Madde = Tahlil saflığı x aktif madde x (1-su içeriği)

Ağırlık (mg) = hacim (ml) x konsantrasyon (µg/ml) / Etken Madde (µg/mg)

Hazırlanan stok solüsyonları kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edildi (şekil 3.11)



Şekil 3.11. Antibiyotik stok solüsyonları

Bu çalışmada kullanılan antibiyotiklere ait stok solüsyonlarının hazırlanması için hangi antibiyotikten ne kadar kullanılması gerektiği CLSI (108)'de belirtilen yöntem kullanılarak hesaplanmış ve Tablo 3,1. de belirtilmiştir. Kullanılan her bir antibiyotiğe ilişkin başlangıç konsantrasyonları ve kırılma noktaları, ilgili literatürlere ve CLSI dokümanına göre belirlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Antibiyotiklerin sulandırma şeması ve kırılma noktaları (106,108, 250)

Antibiyotikler	Bir gramda etken madde	Antibiyotiklerin kırılma noktaları (µg/ml)			Stok solüsyonu	Başlangıç konsantrasyonu	Çözücü madde	Açıklamalar
		S	I	R				
Trimetoprim	980 mg	≥2	–	≤4	64 µg/ml	16 µg/ml	Su	Su ısıtıldı, son hacmin %10'u kadar 0,05mol/l laktik veya hidroklorik asit eklendi
Nalidiksikasit	980 mg	–	–	≥32	128 µg/ml	32 µg/ml	Su ve 1mol NaOH	%50 su, %50 NaOH olacak şekilde sulandırıldı
Siprofloksasin	980 mg	≥2	2–4	≤4	16 µg/ml	4 µg/ml	Su	
Kloramfenikol	980 mg	≤8	16	≥32	128 µg/ml	32 µg/ml	%95'lik Etanol	
Eritromisin	850 mg	≤0.5	1–4	≥8	32 µg/ml	8 µg/ml	%95'lik Etanol veya glasiyal asetikasit	Sulandırma su ile yapıldı
Sülfanilamid	990 mg	–	–	≥512	2048 µg/ml	512 µg/ml	Su ve 2,5mol/l NaOH	1/2 hacim sıcak su ve en az miktarda 2,5mol/l NaOH'ta eritildi
Tetrasiklin HCl	878 mg	≤4	8	≥16	64 µg/ml	16 µg/ml	Su	
Penisilin G	935 mg	≤2	–	–	32 µg/ml	8 µg/ml	Su	
Vankomisin HCl	975 mg	≤2	4–8	≥16	64 µg/ml	16 µg/ml	Su	
Ampisilin	853 mg	≤2	–	–	32 µg/ml	8 µg/ml	pH 8,0'lık 0,1mol/l fosfat tamponu	Sulandırıcı olarak pH 6,0'lık 0,1mol/l fosfat tamponu kullanıldı
Gentamisin	832 mg	≤4	8	≥16	64 µg/ml	16 µg/ml	Su	

3.2.5.2. Broth Mikrodilüsyon Testi

3.2.5.2.1. Katyonu Ayarlanmış ve %5 Lize At Kanı İçeren Mueller Hinton Broth Hazırlanması

Bu işlem için %5 oranında lize at kanı hazırlandı ve Katyonu Ayarlanmış Mueller Hinton Broth'a (CAMHB Cation Adjusted Muller Hinton Broth, GLB) içine 500µl ilave edildi. Lize at kanı içeren (%5) CAMHB'den 96 kuyulu steril U plate'in (Eren Kimya) bütün kuyucuklarına 50'şer µl koyuldu.

3.2.5.2.2. Antibiyotiklerin ilave edilmesi

96 kuyulu steril U plate'in (Eren Kimya) 1. ve 8. kuyucuğuna, (CAMHB'un üzerine) her bir antibiyotiğin stok solüsyonundan 50µl koyuldu. İlk kuyucukta pipetaj yapıldıktan sonra buradan 50µl alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı. Aynı işleme 8. kuyucuğa kadar devam edildi. 7. kuyucukta artan 50µl dışarı atıldı. 8. kuyucuk negatif kontrol kabul edildi.

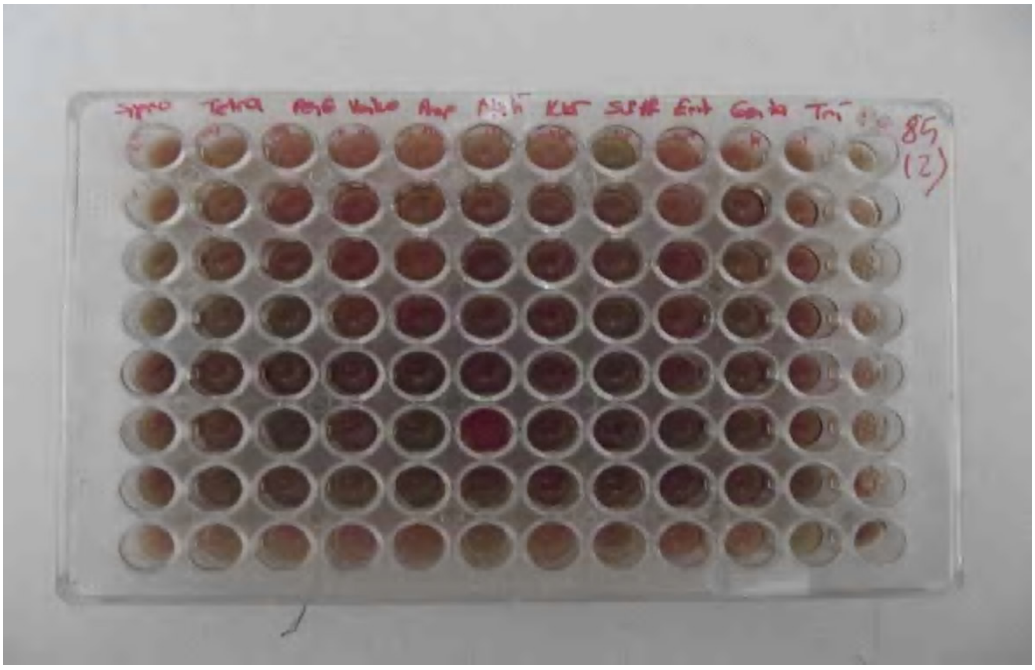
3.2.5.2.3. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

Kanlı agara ekilen *L. monocytogenes* izolatlarından bir koloni alınarak serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi. Bakteri yoğunluğu 0,5 Mc Farland (Biosan Den-1, Latvia) bulanıklığına göre ayarlandı. (şekil 3.12).



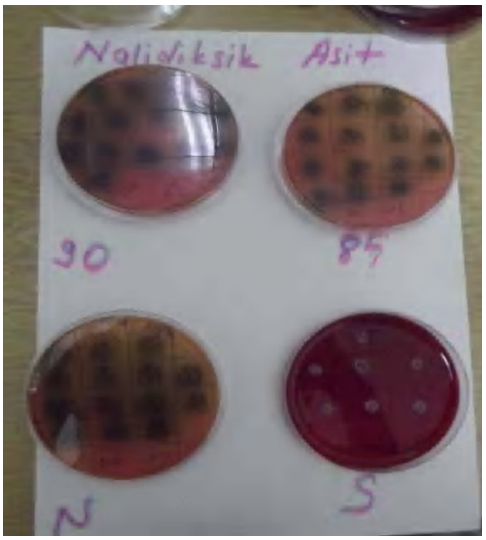
Şekil 3.12. 0.5 Mc Farland bulanıklığı

Mc Farland 0,5 bulanıklığı $1.0x10^8$ kob/ml bakteri sayısına eşit olduğu için bakteriler dilüe edildi. Mc Farland 0,5'e eşit bakteri süspansiyonundan 1ml alınarak 9ml CAMHB ile karıştırıldı ve $1.0x10^7$ kob/ml'lik bakteri süspansiyonu elde edildi. Bu süspansiyondan da 1ml alındı ve 9ml CAMHB ile karıştırıldı ve $1.0x10^6$kob/ml'lik bakteri süspansiyonu elde edildi. 96 kuyucuklu steril U plate'de 50µl antibiyotik + CAMHB bulunmaktaydı. Kuyucukların her birinin üzerine 50µl $1.0x10^6$ kob/ml'lik bakteri süspansiyonundan ilave edildiğinde kuyucuklarda $5.0x10^5$ kob/ml yoğunlukta bakteri içeren süspansiyon elde edildi (108). Pozitif kontrol olarak Niğde Üniversitesi Bor Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nden temin edilen *L. monocytogenes* suşu, negatif kontrol olarak da Erciyes Üniversitesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü'nden temin edilen *S. aureus* suşu kullanıldı. Mikroplateler 35°C'de 16-20 saat inkubasyona bırakıldı (şekil 3.13).



Şekil 3.13. İnkubasyon sonunda 96 kuyucuklu steril U plate'de bakteri üremesi

İnkubasyon sonucu oluşan üremeden emin olunabilmesi için her bir antibiyotik sulandırmasından Oxford Listeria Selectiv Agar'a (Merck 1.07004) ekim yapıldı ve yeniden 35°C'de 16-20 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda besiyerinde görülen tipik *L. monocytogenes* kolonileri pozitif kabul edilerek her bir antibiyotik için MIC değerleri belirlendi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Oxford Listeria Selectiv Agar'da üreme

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Nisan-Haziran 2011 tarihlerini kapsayan süre içerisinde Niğde köy ve pazarlarından toplanan çiğ sütten yapılmış toplam 200 peynir örneğinde *L. monocytogenes* varlığı araştırıldı. İzolatlar *hlyA* gen bölgesi esas alınarak PCR ile doğrulandı.

Çalışmada incelen 200 peynir numunesinden 2'sinin (% 1) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlendi. Çalışma sonucunda 200 peynir numunesinin 17'si (% 8.5) *L. grayi* ve 4'ü (% 2) *L .ivanovii* ile kontamine bulundu. Çalışmada elde edilen klasik kültür ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Şekil 4.1' de özetlenmiştir.

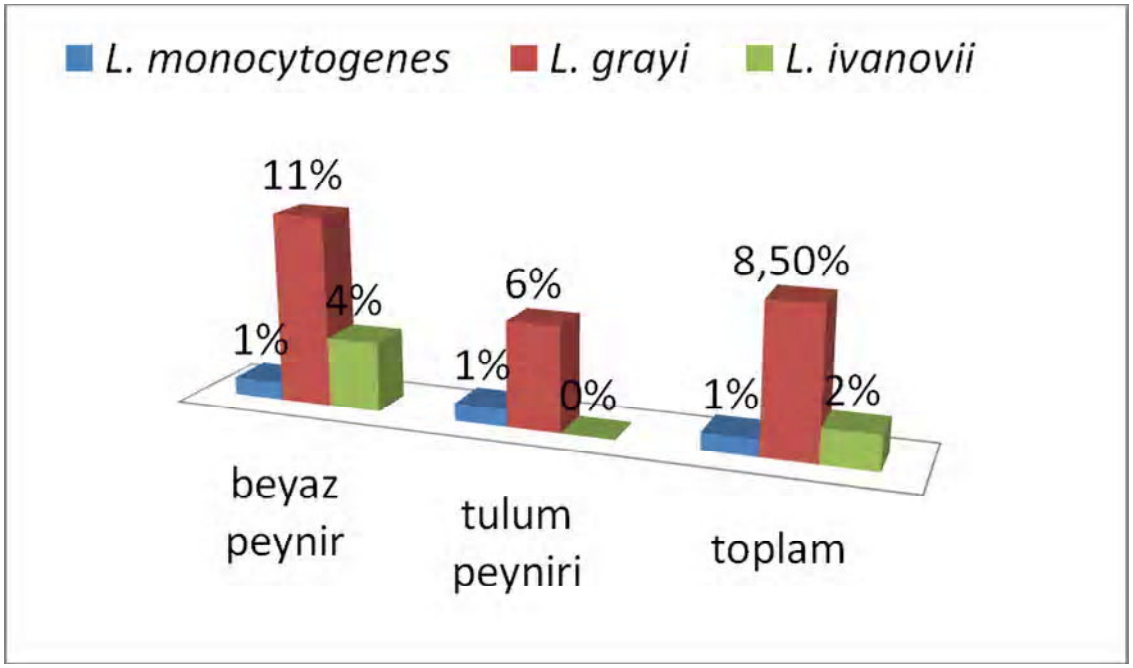
4.1. Klasik Kültür ve Biyokimyasal Test sonuçları

Tablo 4.1. Klasik Kültür ve Biyokimyasal Test sonuçları

	Microbact	**Hemoliz**	**Gram boyama**	**Katalaz**	**Oksidaz**
Tulum 17	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 45	*L. ivanovii*	+	+	+	-
Beyaz P. 79	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 86	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 42	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 16	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 30	*L. ivanovii*	+	+	+	-
Beyaz P. 81	*L. grayi*	-	+	+	-
Tulum 20	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 99	*L. grayi*	+	+	+	-
Tulum 90 (2)	*L. ivanovii +L. monocytogenes*	+	+	+	-
Tulum 13	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 85	*L. monocytogenes*	+	+	+	-
Beyaz P. 100	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 6	*L. grayi*	-	+	+	-
Tulum 14	*L. grayi*	+	+	+	-
Tulum 35	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 10	*L. ivanovii*	-	+	+	-
Beyaz P. 41	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 49	*L. grayi*	-	+	+	-
Beyaz P. 97	*L. grayi*	-	+	+	-
Tulum 96	*L. grayi*	-	+	+	-

Tablo 4.2. Peynir Örneklerinde *Listeria* spp. Dağılımı

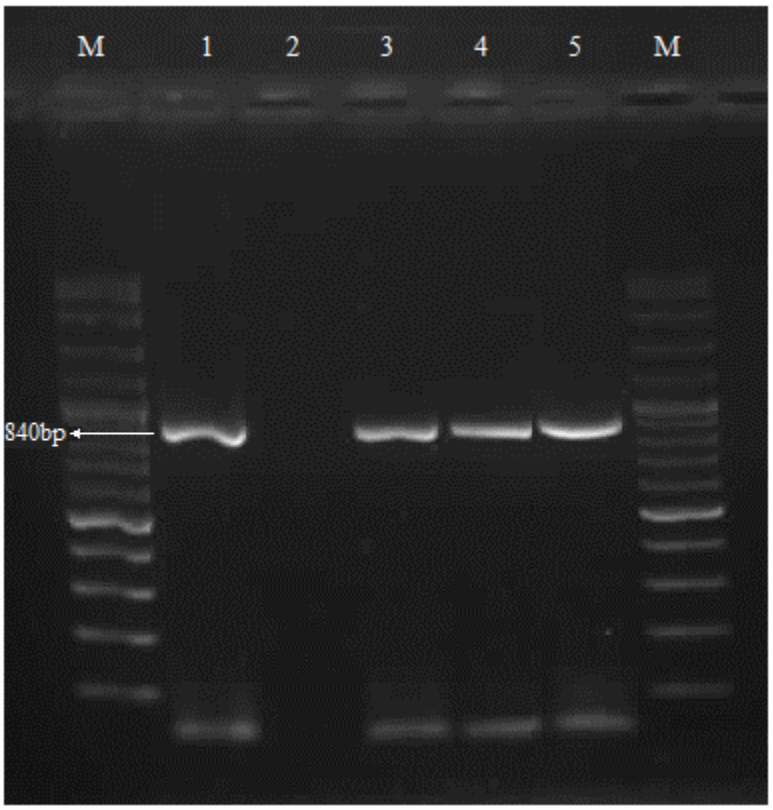
	L. monocytogenes	***L. grayi***	***L. ivanovii***
Beyaz Peynir	1/100 (% 1)	11/100 (% 11)	4/100 (% 4)
Tulum Peyniri	1/100 (% 1)	6/100 (% 6)	-
Toplam	2/200 (% 1)	17/200 (% 8.5)	4/200 (% 2)



Şekil 4.1. Peynir Örneklerinde *Listeria* spp. dağılımı

4.2. PCR sonuçları

Microbact sonuçlarında *Listeria* türlerine ait olduğu kesinleşen 23 izolatın DNA'sı ekstrakte edildi ve *L. monocytogenes*'e spesifik *hlyA* geni arandı. Yirmi üç izolatın 2'si (% 8.69) PCR'da *L. monocytogenes* açısından pozitif sonuç verdi. Buna göre çalışmada kullanılan toplam 200 adet peynir örneğinin 2'si (% 1) (1/100 beyaz peynir, 1/100 tulum peyniri) *L. monocytogenes* olarak tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *L. monocytogenes*'e spesifik *hlyA* geninin 840bp'lık bantın görüntüsü
M: Marker, 1: Pozitif Kontrol-1 (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *hlyA* geni için), 2: Negatif Kontrol (Steril Distile Su), 3:Pozitif Kontrol-2 (Niğde Üniversitesi Bor Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nden temin edilen *L. monocytogenes* saha suşu), 4: *hlyA* geni içeren Beyaz peynir izolatı, 5: *hlyA* geni içeren Tulum peyniri izolatı

4.3. Serotiplendirme Sonuçları

Çalışmada PCR ile *L. monoctogenes* olduğu doğrulanan 2 peynir izolatına yapılan serotiplendirme sonuçlarına göre izolatlardan 1'inin serotip 4a diğerinin ise serotip 1/2a olduğu belirlendi.

Denka Seiken serotip testi sonucunda, tulum peyniri izolatı, I/II ve V/VI antiserumlarından V/VI ile pozitif reaksiyon verdi. Bu durum, 4a, 4b, 4c, 4d ve 4e'den birine ait olduğunu ortaya koydu. Daha sonra VI, VII, VIII ve IX antiserumları uygulandı. Bakteri, VII ve IX ile pozitif reaksiyon verdi. Ayrıca H antijeni için uygulanan antiserumlardan HA, HAB ve HC ile pozitif reaksiyon verirken HD ile negatif reaksiyon verdi. Bu sonuçlar, ticari antiserumun kullanma kılavuzundaki listeye göre değerlendirilerek tulum peyniri izolatının serotip 4a olduğu tespit edildi.

Beyaz peynir izolatı, I/II ve V/VI antiserumlarından I/II ile pozitif reaksiyon verdi. Bu sonuç, 1/2a, 1/2b veya 1/2c serotiplerinden birine dahil olduğunu ortaya koydu. Daha sonra izolata I ve IV antiserumları uygulandı ve izolat I ile pozitif reaksiyon verdi. H antijeni için uygulanan antiserumlardan HA ve HAB ile pozitif reaksiyon verirken HC ve HD ile negatif reaksiyon verdi. Denka Seiken ticari antiserumun kullanma kılavuzundaki listeden takip edilerek beyaz peynirden elde edilen izolatın 1/2a serotipine ait olduğu tespit edildi.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan ve Niğde Üniversitesi Bor Meslek Yüksek Okulu Gıda İşleme Bölümü'nden temin edilen saha suşu I/II ve V/VI antiserumlarından I/II ile pozitif reaksiyon verdi. Bu sonuç 1/2a, 1/2b veya 1/2c serotiplerinden birine dahil olduğunu ortaya koydu. Daha sonra izolata I ve IV antiserumları uygulanarak I ile pozitif reaksiyon verdiği gözlemlendi. H antijeni için uygulanan antiserumlardan HAB ve HD ile pozitif reaksiyon verirken HA ve HC ile negatif reaksiyon verdi. Denka Seiken ticari antiserumun kullanma kılavuzundaki listeden takip edilerek pozitif kontrolün serotip 1/2c olduğu tespit edildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *L. monocytogenes* izolatlarının serotip dağılımı (Denka Seiken ticari antiserumları ile aglütinasyon sonuçları)

	Serotip	**O Antijeni**						**H Antijeni**			
		I/II		V/VI				HA	HAB	AC	HD
		I	IV	VI	VII	VIII	IX				
Tulum peyniri izolatı	4a	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Beyaz peynir izolatı	1/2a	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Pozitif Kontrol	1/2c	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+

4.4. Broth Mikrodilüsyon Testi Sonuçları

Peynirlerden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik profillerini belirlemek için broth mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Çalışma kapsamında beyaz peynirden elde edilen *L. monocytogenes* izolatı ile tulum peynirinden elde edilen izolatın nalidiksik asite dirençli, kullanılan diğer antimikrobiyellere ise duyarlı olduğu tespit edildi. Söz konusu antibiyotiklerin bu izolatlar için belirlenen MIC değerleri ve direnç profilleri tabloda gösterilmektedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Tulum ve beyaz peynirlerden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının kırılma noktaları, MIC değerleri ve antimikrobiyel direnç profilleri

Antibiyotikler	Antibiyotiklerin Kırılma Noktaları (µg/ml)			Tulum peyniri izolatı		Beyaz peynir izolatı		Negatif kontrol *S.aureus* ATCC 25923	
	S	I	R	MIC değeri (µg/ml)	Direnç durumu	MIC değeri (µg/ml)	Direnç durumu	MIC değeri (µg/ml)	Direnç durumu
Siprofloksasin[a]	≤2	2-4	≥4	1µg/ml	S	1µg/ml	S	1µg/ml	S
Tetrasiklin[b]	≤4	8	≥16	2µg/ml	S	1µg/ml	S	<0,25µg/ml	S
Penisilin G[c]	≤2	-	-	0,5µg/ml	S	0,5µg/ml	S	0,25µg/ml	R[d]
Vankomisin[e]	≤2	4- 8	≥16	1µg/ml	S	0,25µg/ml	S	1µg/ml	S
Ampisilin[c]	≤ 2	-	-	0,125µg/ml	S	0,25µg/ml	S	0,25µg/ml	S
Nalidiksik asit[f]	-	-	≥32	>32µg/ml	R	>32µg/ml	R	>32µg/ml	R
Kloramfenikol[b]	≤ 8	16	≥32	4µg/ml	S	4µg/ml	S	16µg/ml	I
Sülfonilamid[f]	-	-	≥512	64µg/ml	S	64µg/ml	S	128µg/ml	S
Trimetoprim[e]	≤2	-	≥4	<0,5µg/ml	S	0,5µg/ml	S	>32µg/ml	R
Eritromisin[e]	≤0.5	1-4	≥8	0,25µg/ml	S	0,125µg/ml	S	0,25µg/ml	S
Gentamisin[g]	≤4	8	≥16	0,5µg/ml	S	1µg/ml	S	2µg/ml	S

[a] Bolivar et al. (250) tarafından bildirilmiştir.
[b] CLSI tarafından streptokoklar haricindeki mikroorganizmalar için belirlenniştir
[c] CLSI tarafından *Listeria* spp. için belirlenmiştir
[d] CLSI tarafından *S. aureus* için belirlenmiştir.
[e] CLSI tarafından *Staphylococcus* spp. için belirlenmiştir
[f] Zhang et al. (206) tarafından bildirilmiştir.
[g] CLSI tarafından belirlenmiştir.
S: Duyarlı (Sensitive)
I: Orta derecede duyarlı (Intermediate)
R: Dirençli (Resistance)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde ve dünyada *L. monocytogenes*'in peynirlerdeki prevelansı ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada 200 beyaz peynir ve tulum peyniri örneğinde *L. monocytogenes* prevelansı % 1 olarak belirlenmiştir. Bu rakam dünyada yapılan bazı çalışmalarda belirlenen prevelans düzeyinden çok düşüktür. Yüksek düzeyde kontaminasyon rapor edilen çalışmalardan bazılarında *L. monocytogenes* prevelansı; Portekiz'de geleneksel yöntemlerle üretilmiş yumuşak peynirlerde % 46 (222), İran'da geleneksel yöntemlerle üretilmiş peynir örneklerinde % 15 olarak bildirilmiştir (209). Bu çalışmalara benzer olarak, Filiousis et al. (136) da 10 yumuşak peynir örneğinin 4'ünden (% 40) Makino et al. (155) ise 19 peynir örneğinin 15'inden (% 78.9) *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Lübnan'da geleneksel olarak üretilen farklı peynir çeşitlerinde *L. monocytogenes* prevelansı % 26.67, % 13.89 ve % 7.23 olarak bulunmuştur (109). Brezilya'da da peynirlerde etkenin prevelansı % 6.7 olarak belirtilirken bu rakamın sadece nem oranı yüksek peynirler için geçerli olduğu vurgulanmıştır (224).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde İtalya'da Gorgonzola peyniri (küflü ve yumuşak bir peynir türü) üzerine yapılan bir çalışmada *L. monocytogenes* kontaminasyonu % 2,1 olarak belirlenmiştir (223). Yine Çetinkaya ve ark. (238) 51 Şavak peyniri örneğinin 1'inden *L. monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Jajali et al. (190) tarafından İran'da yapılan bir çalışmada 23 peynir örneğinden, Atıl ve ark.

(4) tarafından yürütülen bir çalışmada evde üretilmiş 28 peynir örneğinden ve Aydın'da Büyükyörük ve Göksoy (239) tarafından analiz edilen 58 köy peyniri örneğinden hiç *L. monocytogenes* izole edilemediği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada incelenen beyaz peynirlerde *L. monocytogenes* kontaminasyon oranı %1 olarak belirlenirken çiğ sütten yapılmış peynirlerde *L. monocytogenes* varlığını belirlemek amacıyla ülkemizde yapılan diğer bazı çalışmalarda bu çalışma bulguları ile kıyaslandığında yüksek kontaminasyon oranları; Niğde'de % 6 (240) Kayseri'de % 17.2 (8) Bolu'da % 9.2 (225), Afyonkarahisar'da % 6 (228), Trakya, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu'da % 4 (213), Van'da % 3.93 (210) ve Kars'da % 3.75 (227) olarak bildirilmiştir.

Çalışma kapsamında incelen peynirlerde *L. monocytogenes* kontaminasyon oranının diğer birçok çalışma sonuçlarına göre düşük bulunması örnekleme yapılan aylardan kaynaklanabilir. Peynir örnekleri Niğde ili köy ve yaylalarında havyan yetiştiriciliği yapan ve kendi tüketimleri için peynir yapan ailelerden, Nisan- Haziran aylarında toplanmıştır. Örneklerin toplandığı tarih aralığı hayvanların meraya çıktığı ve silaj ile beslenmediği aylardır. Beyaz peynir gibi tarımsal çevrelerde üretilen gıdalara *L. monocytogenes* bulaşmasında, hayvan dışkılarında ve toprakta bulunan etken sayısının etkili olduğu, silajla beslenen ruminantların dışkı ve çevrelerinde *L. monocytogenes* prevelansının belirgin şekilde yüksek çıktığı bildirilmektedir (159,208). Ayrıca çalışmamız için toplanan beyaz peynir örnekleri küçük çiftliklerde yaşayan ailelerin kendi tüketimleri için ürettikleri peynirler olduğu için üretim esnasında hijyen kurallarına uyulduğu düşünülmektedir.

Ülkemizde oldukça yaygın bir şekilde ve sevilerek tüketilen tulum peynirlerindeki *L. monocytogenes* kontaminasyon düzeylerini ayrı olarak ele almak gerekirse, bu çalışma sonucunda elde edilen %1'lik kontaminasyon oranından oldukça yüksek değerler dikkat çekmektedir. Örneğin Güner ve Telli'nin (241) çalışmalarında Urfa tulum peyniri örneklerinde *L. monocytogenes* prevelansı; % 13.3 olarak, Kum ve ark, (8) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise % 22.7 olarak bildirilmiştir. Buna karşın Çetinkaya ve ark. (238) çalışmalarında 52 tulum peyniri örneğinin hiçbirinden *L. monocytogenes* izole edemediklerini belirtmişlerdir.

Tulum peyniri ülkemizin hemen her bölgesinde kuru ya da salamuralı çeşitleriyle çiğ sütten üretildikten sonra oğlak ya da kuzu tulumu, plastik bidon, teneke, fıçı ve çömlek gibi ambalajlar içine hava almayacak şekilde bastırılarak 7°C'den düşük sıcaklılarda 3-9 ay olgunlaştırılan bir peynir türüdür (242). Niğde'de tulum peyniri, oğlak tulumu ya da çömleğe basılarak soğuk hava depolarında, serin kuyularda ve toprak altında olgunlaştırılmaktadır. Çalışmamız için toplanan tulum peyniri örnekleri, 2010 yılında üretilen ve 2011 yılında satışa sunulan yaklaşık 6- 9 ay olgunlaştırılmış peynirlerdir. Çeşitli çalışmalarda olgunlaşma süresi boyunca tulum peynirinin florasına laktik asit bakterilerinin hakim olduğu rapor edilmektedir (243,244,245). Peynirlerde *L. monocytogenes*'in canlı kalabilme süresinin; peynire starter kültür eklenip eklenmediği, peynirin tuz oranı ve peynirdeki başlangıç kontaminasyon düzeyine bağlı olduğu, bakterinin 4°C'de 3- 4 aylık muhafazaya dayanabildiği belirtilmektedir (218,219,220,221). Bu verilere bağlı olarak çalışmamız için toplanan tulum peynirlerinin yeterince olgunlaşmış olduğu ve *L. monocytogenes*'in ortamdaki doğal floraya ait laktik asit bakterileri ve bunların metabolizma ürünleri ve bakteriyosinleri tarafından inhibe edilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada beyaz peynirden elde edilen *L. monocytogenes* izolatının 1/2a serotipinde olduğu belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda: O'Connor et al. (246), bizim çalışmamızla uyumlu olarak, inceledikleri peynir örneklerinden elde ettikleri toplam 4 *L. monocytogenes* izolatının hepsinin serotip 1/2a olduğunu belirtmişlerdir (246). Benzer şekilde Abrahao et al. (224) da peynir örneklerinden elde ettikleri 6 *L. monocytogenes* izolatının serotipini 1/2a olarak bildirmişlerdir.

Korsak et al. (131) çalışmalarında süt ürünlerinden elde ettikleri 13 *L. monocytogenes* izolatını multiplex PCR yöntemi ile serotiplendirdiklerini ve izolatların hepsinin (% 100) bizim çalışmamızla paralel şekilde serogrup I'e ait olduğu dolayısıyla serotiplerinin 1/2a ya da 3a olduğu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Acciari et al. (247) peynir örneklerinden elde ettikleri 47 *L. monocytogenes* izolatının % 76.6'sının 1/2a serotipinde olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, Pintado et al. (222) çiğ sütten yapılmış yumuşak peynirlerden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının 24'ünü serotiplendirdiklerini ve izolatların 20'sinin 4b, 3'ünün 1/2b ve 1'inin 1/2a serotipinde olduğunu rapor etmişlerdir. Aurelia et al. (104) çalışmalarında, 148 *L. monocytogenes* izolatından 36'sının süt ve yumuşak peynirden elde edildiği ve Denka Seiken *Listeria*

Antiserum ile serotiplendirildiği belirtmişler, araştırma sonucunda 36 izolatın % 19,4'ünün 1/2a, % 52,8'inin 1/2b, % 5,5'inin 1/2c, % 2,8'inin 3a, % 19,4'ünün 4b-4e serotipinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ochiai et al. (248) peynirden elde ettikleri 4 *L. monocytogenes* izolatının serotipini 4b, çiğ sütten elde ettikleri 6 izolatın serotipini 1/2a olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir. Dümen ve ark. (212) 700 süt ve süt ürünlerinden elde ettikleri 20 *L. monocytogenes* izolatının hepsinin 4d serotipinde olduğunu belirtmektedirler.

Süt ve süt ürünlerinden ve diğer gıdalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirildiği çalışmalarda serotip 1/2a'nın prevelansının yüksek olduğu bildirilmektedir (104,131,173,224,246,247). Serotip 1/2a'nın gıdalardaki yüksek prevelansı, bakteriyosinlere diğer serotiplerden daha dirençli olması ve serotip 1/2a izolatlarının çevredeki toksik metallere ve bileşiklere karşı direnç göstermelerini sağlayan plazmidleri diğer serotiplerden daha fazla sayıda taşıması ile açıklanmaktadır (23). Dünyada 1990- 1999 yılları arasındaki listeriozis salgınlarında sorumlu serotip genellikle 4b olarak bildirilmiş (149,150,151,156) serotip 1/2a ve 1/2b izolatlarının genellikle gastroenteritisle seyreden vakalardan izole edildiği belirtilmiştir (154,155). Ancak son yıllardaki listeriozis salgınlarında, serotip 4b prevelansının azaldığı buna karşın 1/2a ve 1/2b serotiplerinin daha fazla izole edildiği rapor edilmektedir. Özellikle serotip 1/2a'nın gittikçe artan düzeyde ve daha fazla vakadan sorumlu tutulmasına dikkat çekilmektedir (152,153,184,186,201,249). Son yıllarda bildirilen ve sorumlu serotip olarak 1/2a'nın izole edildiği önemli listeriozis salgınları Tablo 5.1'de gösterilmektedir.

Tablo 5.1. Serotip 1/2a'nın izole edildiği önemli listeriozis salgınları

Ülke	**Yıl**	**Salgına neden olan gıda**	**Etkilenen kişi sayısı**	**Ölüm**	**Serotip**	**Literatür**
ABD	2000	Tüketime Hazır Hindi Eti	54	7	1/2a	184
Kanada	2008	Tüketime Hazır Et	57	23	1/2a	186, 249
İsveç, Almanya, Avusturya, Çek Cumhuriyeti	2009-2010	Çökelek Peyniri	34	8	1/2a	153
ABD	2011	Kavun	147	33	1/2a- 1/2b	201

Zhang et al. (106) tüketime hazır et, çiğ tavuk eti, organik çiğ tavuk eti, yeşil sebze ve organik yeşil sebzeden elde ettikleri toplam 167 *L. monocytogenes* izolatının serotiplerini multiplex PCR yöntemi ile belirlemişlerdir. İzolatların 68'inin 1/2b (ya da 3b), 53'ünün 4b (ya da 4d ya da 4e), 43'ünün 1/2a (ya da 3a), 2'sinin 1/2c (ya da 3c), 1'inin ise 4a (ya da 4c) serogrubunda olduğunu belirtmişlerdir. 1/2c (ya da 3c) ve 4a (ya da 4c) serotipindeki izolatların organik yetiştirilmiş tavuk etinden ve taze sebzeden elde edildiğini rapor etmişlerdir. Zhang et al. (106) tarafından bildirilenin dışında, gıdalardan 4a serotipinde *L. monocytogenes* izolatı bildirilmemektedir. Bizim çalışmamızda elde edilen tulum peyniri izolatının serotipi de 4a olarak belirlenmiştir. *L. monocytogenes* 4a serotipi, genellikle hayvansal çevrelerden izole edilmekte ve patojenitesi şüpheli olarak kabul edilmektedir (32,33). 4a serotipinde, normalde *L. monocytogenes*'de 25 adet olan özel yüzey proteinlerinden (internalin A ve B hariç) 13 tanesi eksiktir (161). Sıklıkla hayvansal çevrelerden izole edilen 4a serotipinin, çalışmamızda tulum peyniri izolatında tespit edilmesinin, çevresel ya da tulum peynirinin basıldığı oğlak tulumu vasıtasıyla gerçekleşen kontaminasyona işaret ettiği düşünülmektedir. Çalışmamızda beyaz peynir ve tulum peynirinden elde edilen izolatlara uygulanan antimikrobiyel dirençlilik testi sonucunda izolatların nalidiksik asite dirençli; siprofloksasin, tetrasiklin, penisilinG, vankomisin, ampisilin, kloramfenikol, sülfonilamid, eritromisin, gentamisin ve trimetoprime duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan her bir antibiyotiğe ait kırılma noktaları ilgili literatür bilgileri ile birlikte Tablo 4.4'de yer almaktadır.

Bu çalışma sonucunda peynirlerden elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının kinolon grubu antibiyotiklerden nalidiksik asite dirençli olduğu bulunmuştur. Bu sonuca paralel olarak Rahimi et al. (209), Zhang et al. (106) ve Yücel ve ark. (189) da çalışmalarında *L. monocytogenes* izolatlarının nalidiksik aside dirençli olduğunu bildirilmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan izolatların nalidiksik asit için MIC değeri >32µg/ml olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde mikrodilüsyon yöntemini kullanan Zhang et al. (106) da çeşitli gıdalardan elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının nalidiksik asit için MIC değerini >32µg/ml olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada örneklerden elde edilen her iki izolatın da siprofloksasin için MIC değeri 1µg/ml olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde Ruiz-Bolivar et al. (250) tarafından yapılan çalışmada siprofloksasin için MIC aralığı 0,12- 2µg/ml, Vela et al. (34)

tarafından yapılan çalışmada 1- 4 µg/ml, Aarestrup et al. (251) tarafından yapılan çalışmada 0,25- 4 µg/ml ve Korsak et al. (131) tarafından yapılan çalışmada ise 1µg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan izolatların siprofloksasine duyarlı olduğu ve belirlenen MIC değerinin yapılan diğer çalışmalarla benzer olduğu görülmektedir. Öte yandan *L. monocytogenes* izolatlarının siprofloksasine dirençli bulunduğu çeşitli çalışmalar da mevcuttur (102,103,106,131,209,246).

Bu çalışmada elde edilen izolatların tetrasikline duyarlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çeşitli araştırmalarda *L. monocytogenes* izolatlarının tetrasiklin direncinin yaygınlaştığı bildirilmektedir (34,102,103,106,136,162,168,209,212,181,246,252). Çalışmamızdaki beyaz peynir izolatının tetrasiklin için MIC değeri 1 µg/ml, tulum peyniri izolatının MIC değeri 2 µg/ml olarak belirlenmiştir. Tetrasiklin için MIC değerinin belirlendiği çalışmalarda söz konusu değer: 0.25- 1 µg/ml (136,253) , 0.1- 8 µg/ml (34,104,250), 0.5- 1 µg/ml (9,105,131), 0.5- 2 µg/ml (251) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, izolatların tetrasiklin için saptanan MIC değerleri bizim çalışmamızla uyumludur. Buna karşın David et al. (168) tarafından yürütülen bir çalışmada bu değer 4- 16 µg/ml olarak bildirilmektedir ki bu değer bizim çalışma sonuçlarımızla kıyaslandığında oldukça yüksektir.

Bu çalışma kapsamında incelenen her iki izolatın da penisilin G'ye duyarlı olduğu tespit edilmiş ve penisilin G için MIC değerleri 0.5 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde pensilin G'nin MIC değeri Wiggins et al. (253) tarafından 0.125- 0.5 µg/ml, Aarestrup et al. (251) tarafından 0.25- 1 µg/ml, Filiousis et al.(136) tarafından 0.12- 2 µg/ml, Navratilova et al. (9) tarafından 0.06- 2 µg/ml olarak bildirilmiştir. Ancak MIC değerinin 4 µg/ml'ye ulaştığı çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda MIC değeri, Zhang et al. (106) tarafından 4 µg/ml, Vela et al. (34) tarafından 0.06- 4 µg/ml, Ruiz- Bolivar et al. (250) tarafından 1- 4 µg/ml olarak rapor edilmiştir. Dünyada ve ülkemizde penisilin G'ye dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çalışmalar mevcuttur (102,109,162,174,198,181,209,246,252).

Bu çalışmada incelenen her iki izolatın da vankomisine duyarlı olduğu tespit edilmiş ve tulum peyniri izolatının vankomisin için MIC değeri 1 µg/ml, beyaz peynir izolatı için bu değer 0.25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde duyarlı izolatlarda vankomisin için MIC değerini; 0.25- 1 µg/ml (9), 1- 2 µg/ml (104), 0.12- 1 µg/ml (34), 0.5 µg/ml (136) , 0.5- 2 µg/ml (131), 1- 2 µg/ml (105) olarak bildiren çalışmalar da mevcuttur.

Bununla birlikte dünyada ve ülkemizde vankomisine dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (102,109,250,252).

Bu çalışmada incelenen her iki izolatın da ampisiline duyarlı olduğu tespit edilmiş ve tulum peyniri izolatının ampisilin için MIC değeri 0.125 µg/ml, beyaz peynir izolatının MIC değeri ise 0.25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu bulgulara paralel olarak yapılan ilgili çalışmalarda duyarlı izolatlarda ampisilin için MIC değeri, Wiggins et al. (253) tarafından 0.125- 1 µg/ml, Navratilova et al. (9) tarafından 0.5- 1 µg/ml, Korsak et al. (131) tarafından 0.125- 1 µg/ml, Marco et al. (105) tarafından 1.12- 1 µg/ml olarak bildirilmiştir. Ampisiline dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çeşitli çalışmalar da mevcuttur (102,109,250,252).

Bu çalışma kapsamında elde edilen izolatların kloramfenikole duyarlı olduğu tespit edilmiş ve her iki izolatın da kloramfenikol için MIC değeri 4 µg/ml, olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde, duyarlı izolatlarda ampisilin için MIC değeri, Wiggins et al. (253), Aurelia et al. (104) ve Ruiz- Bolivar et al. (250) tarafından 4- 8 µg/ml, David and Odeyemi (168) ve Vela et al. (34) tarafından 8- 16 µg/ml, Aarestrup et al. (251) ve Filiousis et al. (136) tarafından 2- 8 µg/ml ve Marco et al. (105) ve Korsak et al. (131) tarafından 4- 16 µg/ml olarak belirlenmiştir. Kloramfenikole dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır (102,109,174,209,181,252).

Bu çalışmada incelenen izolatların süfonilamid için MIC değeri 64 µg/ml olarak belirlenmiş ve Zhang et al. (106) temel alınarak izolatların süfonilamid ve trimetoprime duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Trimetoprim açısından her iki izolat için belirlenen MIC değeri 0.5 µg/ml'dir. Benzer şekilde, duyarlı izolatlarda trimetoprim için MIC değeri, Vela et al. (34) tarafından 0.12- 1 µg/ml, Aarestrup et al. (251) tarafından 1- 2 µg/ml, Korsak et al. (131) tarafından 0.02- 0.25 µg/ml olarak belirlenmiştir. TMP-SMX'e dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çeşitli çalışmalar da mevcuttur (102,103,109,162,189,246).

Bu çalışmada elde edilen izolatların eritromisine duyarlı olduğu tespit edilmiş ve tulum peyniri izolatının eritromisin için MIC değeri 0.25 µg/ml, beyaz peynir izolatının ise bu antibiyotik için MIC değeri 0.125 µg/ml olarak belirlenmiştir. Buna paralel olarak duyarlı izolatlarda eritromisin için MIC değeri, Korsak et al. (131) tarafından 0.02- 0.5 µg/ml, Marco et al. (105) tarafından 0.06- 0.25 µg/ml, Ruiz-Bolivar et al. (250) tarafından 0.25- 1 µg/ml, Aurelia et al. (104) ve Wiggins et al. (253) tarafından 0.125-

0.25 µg/ml, Aarestrup et al. (251) tarafından 0.125- 0.5 µg/ml, Filiousis et al.(136) tarafından 0.12 µg/ml, Vela et al. (34) tarafından 0.12- 4 µg/ml ve Navratilova et al. (9) tarafından 0.25- 0.5 µg/ml olarak belirlenmiştir. Eritromisine dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çeşitli çalışmalar da mevcuttur (102,109,168,209,250,252).

Bu çalışma çerçevesinde incelenen izolatların gentamisine duyarlı olduğu tespit edilmiş ve tulum peyniri izolatının gentamisin için MIC değeri 0.5 µg/ml, beyaz peynir izolatının eritromisin için MIC değeri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, duyarlı izolatlarda gentamisin için MIC değeri, Navratilova et al. (9) tarafından 0.25- 1 µg/ml, Aurelia et al. (104) tarafından 0.125- 0.25 µg/ml, Vela et al. (34) tarafından 0.03- 1 µg/ml, Filiousis et al.(136) tarafından 1 µg/ml, Wiggins et al. (253) tarafından 2- 4 µg/ml, Marco et al. (105) tarafından 0.25- 0.5 µg/ml ve Korsak et al. (131) tarafından 0.025- 2 µg/ml olarak belirlenmiştir. Gentamisine dirençli *L. monocytogenes* izolatlarının bildirildiği çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır (102,109,168,209,246,250, 252).

Bu araştırmada antimikrobiyel duyarlılıkları incelen her iki izolatın da, çalışmada kullanılan antibiyotiklerden sadece nalidiksik asite dirençli olduğu belirlenmiştir. Nalidiksik asit, *L. monocytogenes* izolatlarının doğal direnç gösterdiği antibiyotiklerden biridir. Bakteriler antibiyotiklere karşı mutasyon ya da aktarım yoluyla direnç kazanmaktadırlar (15,117). *L. monocytogenes* antibiyotik direncini mobilize plazmid ve konjugatif transpozon olarak iki farklı aktarım yoluyla kazanmaktadır (118). *L. monocytogenes* izolatları arasında kazanılmış direnç oranının % 2'den az olduğu bildirilmektedir (120,121). Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlilik tespit edilememesinin nedeninin incelenen izolat sayısının düşüklüğü olduğu düşünülmektedir.

Listeria monocytogenes sütte çok az miktarlarda bulunsa dahi peynirin olgunlaşması aşamasında veya uygun olmayan muhafaza ve pazarlama koşullarında üreyerek son üründe sağlık riski oluşturabilecek düzeylere ulaşabilmektedir (254). Bu çalışmada incelenen peynir çeşitlerinde *L. monocytogenes* kontaminasyonu her ne kadar düşük düzeyde bulunmuş olsa da ev tipi peynirlerin çiğ sütten üretilerek satışa sunulması *L. monocytogenes* açısından risk teşkil eden bir durumdur. Bireysel olarak süt ineği yetiştiriciliği yapan köylüler tarafından ev ortamında geleneksel yöntemlerle yapılarak satışa sunulan bu peynirler için, sabit birer pH, tuz, a_w ve kuru madde değerlerinden

bahsetmek mümkün olamamaktadır. Söz konusu peynirler çiğ sütten, herhangi bir starter kültür kullanılmadan, peynir mayası ve kendi mikrobiyel floralarıyla üretildikleri için son derece lezzetli olmakla birlikte üretim depolama ve pazarlama aşamasında etkenin üremesini kontrol altına alabilecek herhangi bir engel bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu aşamalarda etkenin canlı kalabilme ve hatta üreyebilme potansiyeli halk sağlığı açısından önemli bir risk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada beyaz peynirden elde edilen izolatın, son yıllarda Avrupa ve ABD'de yüksek ölüm oranına sahip listeriozis vakalarından izole edilen 1/2a serotipinde olması da söz konusu halk sağlığı riskine işaret etmektedir.

İnsan ve hayvanların gastrointestinal sistemi, *Listeria* türlerinin özellikle *Enterococcus* ve *Streptococcus* türleri başta olmak üzere diğer bütün Gram pozitif bakterilerden konjugatif plazmid ve transpozonlar yardımıyla dirençlilik genlerini kazanmaları için oldukça uygun ortamlardır. Dolayısıyla *L. monocytogenes'*in diğer Gram pozitif bakterilere etkili olan bütün antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu kanısı artık kabul edilmemektedir. Farklı gıdalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının listeriozis tedavisinde uygulanan standart antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu dirençlilik bu kanıyı doğrulamaktadır. Bu bağlamda bu çalışmada elde edilen izolatlar her ne kadar sadece nalidiksik asite karşı dirençli bulunmuş olsa da çeşitli gıdalardan elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarına ilişkin antimikrobiyel dirençlilik çalışmalarının sürdürülmesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Isı işleminin etkin bir şekilde uygulanması, işletme bazında kontrollü koşullar altında üretilip olgunlaştırılması, pastörizasyondan sonraki kontaminasyonların engellenmesi ve gerekli denetim mekanizmalarının etkin bir şekilde uygulanması, peynirlerden kaynaklanan listeriozis olgularının önlenmesinde etkili olacaktır. Her ne kadar söz konusu etken buzdolabı sıcaklıklarında üreme yeteneğini sürdürse de soğuk zincir altında muhafaza edilerek satışa sunulması ve en önemlisi de halk pazarlarında açık olarak satışa sunulan bu peynirlerin denetim altına alınması etkenin halk sağlığı açısından oluşturduğu risklerin önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu peynirlerin yapımında pastörize süt kullanılması, çiğ sütten yapılan peynirlerin ısı işlemi görmeden tüketilmemesi, peynirlerin üretim aşamalarında hijyen kurallarına uyulması bunun yanında oldukça beğenilerek tüketilen bu peynir tiplerinin hijyenik bir şekilde üretilebilmeleri için ilgili otoriteler tarafından gerekli önlemlerin alınması

gerekmektedir. Yine lokal peynir üreticilerinin söz konusu peynirlerin yarattığı sağlık riskleri hakkında sadece *L. monocytogenes* açısından değil, diğer patojenler açısından da bilgilendirilmesi için eğitim programları düzenlenmelidir.

6. KAYNAKLAR

1. Garrec N, Picard-Bonnaud F, Pourcher AM. Occurrence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: Effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. FEMS Immunol Med Mic 2003; 35: 275- 283.
2. Lyautey E, Lapen DR, Wilkes G, et al. Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation RiverWatershed, Ontario, Canada. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 5401–5410.
3. Crepet A, Albert I, Dervin C, Carlin F. Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data, application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 250–258.
4. Atıl E, Ertaş HB, Özbey G. Isolation and molecular characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environmental samples. Vet Med Czech 2011; 56: 386– 394.
5. Akça D ve Şahin M. Kars yöresi sığırlarından alınan süt ve vajinal sıvap örneklerinden *Listeria* türlerinin araştırılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011; 17: 987- 993.
6. Low JC, Donachie W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Vet J, 1997; 153: 9- 29.
7. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Vinas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. Int J Food Microbiol 2008; 123: 121–129.
8. Kum E, Yıldırım Y, Ertaş N. Kayseri'de satışa sunulan peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* varlığının klasik kültür yöntemi ile belirlenmesi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011; 8: 105 -109.

9. Navratilova P, Schlegelova J, Sustackova A. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk, meat and food stuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains. Vet Med Czech 2004; 49: 243–252.
10. Rantsiou K, Alessandria V, Urso R, Dolci P, Cocolin L. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. Int J Food Microbiol 2008; 121: 99–105.
11. Hein I, Klein D, Lehner A, et al. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. Ress Microbiol 2001; 152: 37- 46.
12. Sibergeld KE, Graham J, Price BL. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. Annu Rev Public Health 2008; 29: 151- 169.
13. Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Anim Health Res Rev 2008; 9: 149- 158.
14. Yıldırım Y. Antimikrobiyel duyarlılık testleri; ilgili metodlar, sonuçların yorumlanması ve kanatlılarda bulunan bazı bakterilerdeki dirençlilik. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2010; 7: 117- 129.
15. Biswas S, Raoult D, Rolain JM. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. Int J Antimicrob Agents 2008; 32: 207- 220.
16. Seeliger HPR. Listeriosis- History and actual developments. Infection 1988; 16 : 80- 84.
17. Anonymous. Food and Drug Administration. Risk Assessment of Listeriosis Associated with Ready to Eat Foods: Hazard Identification and Hazard Characterization. Preliminary Report prepared for Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, FAO Headquarters, Rome, Italy, 17-21 July 2000. p.1-2
18. McLauchlin J, Audurier A, Taylor AG. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967- 1984; the use of serotyping and phage typing. J Med Microbiol 1986; 22: 367- 377.
19. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, et al. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect 2007; 40: 4– 13.
20. Williams SK. *Listeria Monocytogenes* and Other *Listeria* Species In Small and Very Small Ready-To-Eat Meat Processing Plants, Master Thesis, Colorado State Univercity, Department of Animal Sciences, Colorado 2010: 121.
21. Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2009; 3: 1- 13.

22. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquest C, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 69- 73.

23. Orsi RH, Bakker CH, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microb 2011; 301: 79- 96.

24. Paracıkoğlu J. Listeria İnfeksiyonları. İçinde: Aydın N, Paracıkoğlu J. (editörler), Veteriner Mikrobiyoloji. 1. basım, İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006: s 57- 72.

25. Todeschini G, Friso S, Lombardi S, et al. A Case of *Listeria murray/grayi* bacteremia in a patient with advanced Hodgkin's Disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 808- 810.

26. Rapose A, Lick SD, Ismail N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. Transpl Infect Dis 2008; 10: 434- 436.

27. Seeliger H, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan T, Norris J. (Eds.), Methods in Bacteriology. Academic Press, London, 1979: p: 31– 49.

28. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus geno-typing assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 7629–7642.

29. Roberts A, Nightingale K, Jeffers G, et al. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. Microbiology 2006; 152: 685– 693.

30. Liu D, Lawrence M, Ainsworth AJ, Austin FW. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. Int J Food Microbiol 2007a; 118: 101– 115.

31. Buncic S, Avery SM, Rocourt J, Dimitrijevic M. Can food-related environmental factor sinduce different behaviour in two key serovars, 4 band 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? Int J Food Microbiol 2001; 65: 201–212.

32. Ward TJ, Gorski L, Borucki MK, Mandrell RE, Hutchins J, Pupedis K. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol 2004; 186: 4994–5002.

33. Liu D, Lawrence M, Wiedmann M, et al. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. J Clin Microbiol 2006a; 44: 4229– 4233.

34. Vela AI, Fermandez-Garayzabal JF, Latre MV, et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. Int J Antimicrob Agents 2001; 17: 215–220.

35. Aurora R, Prakash A, Prakash S. Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and ready-to-eat indigenous milk products. Food Control 2009; 20, 835–839.

36. Cocolin L, Stella S, Nappi R, et al. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. Int J Food Microbiol 2005; 103: 167- 178.

37. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004a; 42: 3819–3822.

38. Palumbo JD, Borucki MK, Mandrell RE, Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and ıdentification of mixed-serotype cultures by Colony Immunoblotting. J Clin Microbiol 2003; 41: 564–571.

39. Nelson KE, Fouts DE, Mongodin EF, et al. 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 Res 2004; 32: 2386–95.

40. Lyytikainen O, Autio T, Maijala R, et al. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infection from butter in Finland. J Infect Dis 2000; 181: 1838– 1841.

41. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi (Birinci Basım), Pozitif Matbaacılık, Ankara, 2007: 145.

42. Seeliger HP, Jones D. Genus Listeria, in Bergey‘s Manual of Systematic Bacteriology. Sneath PH, Mair NS, Sharpe, ME, Hold JG. (Eds). Williams and Willkins, Baltimore 1986, USA.

43. Gasanov U, Hughes D, Hansbro M P. Methods for The Isolation and Identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A Review. FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 851- 875.

44. Wagner M, McLauchlin J. Biology, in Handbook of *Listeria monocytogenes.* Lui D. (Ed). CRC Pressby Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, USA. p.3- 27

45. Pucciarelli MG, Bierne H, García-del Portillo F. The cell wall of *Listeria monocytogenes* and its role in pathogenicity, in *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Goldfine H, Shen H. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. 233 Spring Street, New York 2007, USA. p. 81- 111

46. Mathakiya RA, Roy A, Nayak JB. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates by CAMP test. Vet World 2011; 4: 301- 303.

47. Beverly RL. The Control, Survival, and Growth of *Listeria monocytogenes* on Food Products, A Dissertation, Louisiana State University, The Department of Food Science, Louisiana 2004: 35.

48. Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Vet Microbiol 2006; 114: 1–15.

49. Ryser ET, Marth EM. *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Dekker, New York, 1991.

50. Hain T, Steinweng C, Chakraborty T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. J Biotechnol 2006; 126: 37- 51.

51. Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW, Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. FEMS Microbiol Lett 2005; 243: 373- 378.

52. Renier S, Hebraud M, Desvaux M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic gram-positive foodborne pathogen. Environ Microbiol 2011; 13: 835- 850.

53. Lourenco A, Machado H, Brito L. Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12°c either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. J Food Sci 2011; 76: 143- 148.

54. Faleiro ML, Andrew PW, Power D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. Int J Food Microbiol 2003; 84: 207- 216.

55. Romanova N, Favrin S, Griffiths MW. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 6405–6409.

56. Foong SC, Gonzalez GL, Dickson JS. Reduction and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats after irradiation. J Food Prot 2004; 67: 77– 82.

57. Clardy S, Foley DM, Caporaso F, Calicchia ML, Prakash A. Effect of gamma irradiation on *Listeria monocytogenes* in frozen, artificially contaminated sandwiches. J Food Prot 2002: 65: 1740– 1744.

58. Sommers CH and Boyd G. Elimination of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat turkey and cheese tortilla wraps using ionizing radiation. J Food Prot 2005; 68: 164-167.

59. Zhu MJ, Mendonca A, Ismail HA, Du M, Lee EJ, Ahn DU. Impact of antimicrobial ingredients and irradiation on the survival of *Listeria monocytogenes* and quality of ready-to-eat turkey ham. Poult Sci 2005a; 84: 613- 620.

60. Juneja VK. Predictive model for the combined effect of temperature, sodium lactate, and sodium diacetate on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in beef. J Food Prot 2003; 66: 804– 811.

61. Folsom JP, Siragusa GR, Frank JF. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 2006; 69: 826– 834.

62. Anonymous, Horizontal Method for Detection of *Listeria monocytogenes* International Standardization Organization ISO NORM, 11290-1-/A1. 2004.

63. Hitchins AD and Jinneman K. Bacteriological Analytical Manual Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual, FAO, April, 2011

64. Anonymous Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. MLG 8.07. United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service, USDA/FSIS, Office of Public Health Science. Revision: 07. USA 2009.

65. Anonymous, American Official Analytical Chemist International AOAC, Official Methods of Analysis, Chapter 17, Microbiological Methods. 18th edn. Revision 1, 2006

66. Amagliani G, Giammarini C, Omiccioli E, Brandi G, Mangan M. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. Food Control 2007;18: 1137- 1142.

67. Manzano M, Cocolin L, Ferroni P, Cantoni C, Comi G. A Simple and Fast PCR Protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. J Sci Food Agric 1997; 74, 25-30.

68. Gahan CGM, O'Mahony J, Hill C. Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: Utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating *in vivo* expression. Infect Immun 2001; 69: 3924- 3932.

69. Stack HM, Hill C, Gahan CGM. Stress Responses, in Handbook of *Listeria monocytogenes.* Lui D. (Ed). CRC Pressby Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, USA. p.61- 97

70. Hill C, Cotter PD, Sleator RD, Gahan CG. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. Int Dairy J 2002; 12: 273–283.

71. Hanawa T, Kai M, Kamiya S, Yamamoto T. Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes.* Cell Stress Chaperones 2000; 5: 21- 29.

72. Zhu M, Du M, Cordray J, Ahn DU. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in Ready-to-Eat Meat products. Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety 2005b; 4: 34- 42.

73. Karatzas A, Wouters JA, Gahan CGM, et al. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. Mol Microbiol 2003; 49: 1227- 1238.

74. Wonderling LD, Wilkinson BJ, Bayles DO. The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 1935- 1943.

75. Becker LA, Evans SN, Hutkins RW, Benson AK. Role of σB in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. J Bacteriol 2000; 182: 7083- 7087.

76. Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of *Listeria monocytogenes* σB in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 2692- 2698.

77. Cotter PD, Gahan CGM, Hill C. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1ATPase operon in the acid tolerance response. Int J Food Microbiol 2000; 60: 137- 146.

78. Considine CM, Sleator RD, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C. A role for proline synthesis and transport in Listeria monocytogenes barotolerance. J Appl Microbiol 2011; 110: 1187- 1194.

79. Sleator RD. Francis GA. O'Beirne D, Gahan CGM, Hill C. Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. J Appl Microbiol 2003; 95: 839- 846.

80. Begley M, Hill C, Gahan CGM. Identification and disruption of *btlA*, a locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 2003; 218; 31- 38.

81. Browne N and Dowds BCA. Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. J Appl Microbiol 2001; 91: 1085.

82. O'Driscoll B, Gahan CGM, Hill C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* LO28. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 2679.

83. Lou Y and Yousef AE. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 1252.

84. Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. Science 2001; 294: 849–52.

85. Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunulogy of *Listeria monocytogenes* infections: Novel insights. Immunol Rev 2011; 240: 160- 184.

86. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. Infect Immun 2004b; 72; 1072–1083.

87. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 6152–6157.

88. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes.* J Microbiol Methods 2007b; 71: 133–140.

89. Chen J, Luo X, Jiang L, et al. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. Food Microbiol 2009; 26: 103- 111.

90. Cabanes D, Dussurget O, Dehoux P, Cossart P. Auto, A surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. Mol Microbiol 2004; 51: 1601–1614.

91. Dancz CE, Haraga A, Portnoy DA, Higgins DE. Inducible control of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*: temporal requirement of listeriolysin O during intracellular infection. J Bacteriol 2002; 184: 5935–5945.

92. Chong R, Swiss R, Briones G, et al. Regulatory Mimicry in *Listeria monocytogenes* Actin-Based Motility. Cell Host Microbe 2009; 6: 268–278.

93. Cossart P. Listeriology (1926- 2007): The Rise of a Model Pathogen. Microbes Infect 2007; 9: 1143- 1146.

94. Marquis H, Hager EJ. pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol 2000; 35: 289– 298.

95. Portnoy DA. A 20-Year Perspective on *Listeria monocytogenes* Pathogenesis, in *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Goldfine H, Shen H. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. 233 Spring Street, New York 2007, USA. p. 1- 13

96. Bubert A, Hein I, Rauch M, et al. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4688–4692.

97. Begley M, Sleator RD, Gahan CG, Hill C. Contribution of three bile-associated loci, *bsh*, *pva*, and *btlB*, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 2005; 73: 894–904.

98. Sleator RD, Wemekamp-Kamphuis HH, Gahan CG, Abee T, Hill C. A PrfA regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes.* Mol Microbiol 2005; 55: 1183–95.

99. Cabanes D, Sousa S, Cebria A, et al. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. Embo J 2005; 24: 2827–2838.

100. Li Z, Dai J, Zheng H, Liu B, Caudill M. An integrated view of the roles and mechanisms of heat shock protein gp96-peptide complex in eliciting immune response. Front Biosci 2002; 7: 731–751.

101. Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 584–640.

102. Yan H, Neogi SB, Mo Z, et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. Int J Food Microbiol 2010; 144: 310- 316.

103. Conter M, Paludi D, Zanardi E, et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol 2009; 128: 497- 500.

104. Aurelia P, Ferrinia AM, Mannonia V, et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. Int J Food Microbiol 2003; 83: 325- 330.

105. Marco F, Almela M, Nolla-Salas J, et al. In vitro activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains isolated in Barcelona, Spain. Microbiol Infect Dis 2000; 38: 259–261.

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

107. Grayo S, Join-Lambert O, Desroches M, Le Monnier A. Comparison of the in vitro efficacies of moxifloxacin and amoxicillin against *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother2008; 52: 1697– 1702.

108. Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of In vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents—Third Edition: Approved Guideline M37-A3. CLSI, 2008; Vol.28: No. 8. and Informational Supplement M31- A2, 2004; 24: No. 17.

109. Harakeh S, Saleh I, Zouhairi O, et al. Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes isolated from dairy-based food products. Science of the Total Environment 2009; 407: 4022- 4027.

110. Diren Ş. Antibiyogram yorumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Çocuklarda Akılcı Antibiyotik Kullanımı Sempozyum Dizisi No: 33. s. 19- 24, Aralık 2002, İstanbul.

111. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klinik Dergisi 2001; 14:1 -46.

112. Waxman DJ. Strominger JL. Penisilin- binding proteins and the mechanism of action of β-lactam antibiotics. Annual Review Biochemistry 1983; 52: 825- 869.

113. Troxler R, von Gravenitz A, Funke G, Wiedemann B, Stock I. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi, L. innocua, L. ivanovii, L. monocytogenes*, *L. seeligerii* and *L. welshimerii* strains. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 525– 535.

114. Li Q, Sherwood JS, Logue CM. Antimicrobial resistance of Listeria spp. recovered from processed bison. Lett Appl Microbiol 2007; 44: 86– 91.

115. Lotfollahi L, Nowrouzi J, Irajian G, et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of Listeria monocytogenes in spontaneous abortions in humans. Afr J Microbiol Res 2011; 5: 1990- 1993.

116. Baylan O. Fosfomisin: Dünü, Bugünü ve Geleceği. Mikrobiyol Bul 2010; 44: 311- 321.

117. Tan Y-T, Tillett D J. McKay A I. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. Molecul Med Today 2000; 6: 309- 314

118. Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. A review. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2103– 2108.

119. Poyart-Salmeron C, Trieu-Cuot P, Carlier C, et al. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 463– 466.

120. Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 2788–2790

121. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 2728–2731.

122. Purwati E, Radu S, Hassan Z, Ling OW, Abdul Rahim R. Plasmid-mediated streptomycin resistance of *Listeria monocytogenes*. Malaysian Journal of Medical Sciences 2001; 8: 59- 62.

123. Roberts MC, Facinelli B, Giovanetti E, Varaldo PE. Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 269– 270.

124. Vicente MF, F Baquero, Perez-Diaz JC. Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp. J Antimicrob Chemother 1988; 21: 309- 318.

125. Sağlam FY. Enterokoklarda vanA Tipi Glikpoeptid Direncine Aracılık Eden Genetik Elemanların Moleküler Analizi. Uzmanlık Tezi. T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul 2008: 15-16.

126. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. The Annual Review Biochemistry 2009; 78: 119- 146.

127. Biavasco F, Giovanetti E, Miele A, et al. In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between Enterococci and Listeriae of different species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 50- 59.

128. Charpentier E, Courvalin P. Emergence of the trimethoprim resistance gene dfrD in *Listeria monocytogenes* BM4293. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1134– 1136.

129. Lysnyansky I, Gerchman I, Perk S, Levisohn S. Molecular characterization and typing of enrofloxacin- resitant clinical isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. Aviain Diases 2008; 52: 685- 689.

130. van Hoekl AHAM, Mevius D, Guerra B, et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Frontiers in Microbiology 2011; 2: 1- 27.

131. Korsak D, Borek A, Daniluk S, Grabowska A, Pappelbaum K. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. Int J Food Microbiol 2012; 158: 203– 208

132. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet Ch, Courvalin P. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 704–708.

133. Luangtongkum T, Morishita TY, Martin L, et al. Prevalence of tetracycline-resistant campylobacter in organic broilers during a production cycle. Avian Diseases 2008; 52: 487– 490.

134. Bertrand S, Huys G, Yde M, et al. Detection and characterization of tet(M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. J Med Microbiol 2005; 54: 1151– 1156.

135. Poyart C, Trieu-Cuot P, Carlier C, et al. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 463– 466.

136. Filiousis G, Johansson A, Frey J, Perreten V. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. Food Control 2009; 20: 314– 317.

137. Doucet-Populaire F, Trieu-Cuot P, Dosbaa I, Andremont A, Courvalin P. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 185- 187.

138. Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, Courtieu AL, Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lancet 1990; 335: 1422–1426.

139. Quentin C, Thibaut MC, Horovitz J, Bebear C. Multiresistant strain of *Listeria monocytogenes* in septic abortion. Lancet 1990; 336: 375.

140. Hadorn K, H Hachler A. Schaffner, and F. H. Kayser. Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12: 928– 937.

141. Buchholz U and Mascola L. Transmission, pathogenesis, and epidemiology of *Listeria monocytogenes.* Infect Dis Clin Pract 2001; 10: 34– 41.

142. Tsakris A, Papa A, Douboyas J, Antoniadis A. Neonatal meningitis due to multi-resistant *Listeria monocytogenes*. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 553– 554.

143. Lorber B. Listeriosis, in *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Goldfine H, Shen H. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. 233 Spring Street, New York 2007, USA. p. 1- 13

144. Colodner R, Sakran W, Miron D,et al. *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery. Am J Infect Control 2003; 31: 322–324.

145. Oliver HF, Wiedmann M, Boor KJ. Environmental Reservoir and Transmission into the Mammalian Host, in *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Goldfine H, Shen H. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. 233 Spring Street, New York 2007, USA. p. 111- 139

146. Rovrik LM, Aase B, Alvestad T, Caugant DA. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products J Appl Microbiol 2003; 94: 633– 640.

147. Bortolussi, R. Listeriosis: a primer. JMAC Practise 2008; 179: 795- 797.

148. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, De Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis 2008; 14: 734–740.

149. Anonymous, CDC. Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy - Massachusetts, 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008; 57 : 1097- 1100.

150. Anonymous, CDC. Outbreak of Listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese-North Carolina, October 2000-January 2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2001; 50: 560- 562.

151. McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int J Food Microbiol 2004; 92: 15– 33.

152. Vit M, Olejnik R, Dlhy J, et al. Outbreak of listeriosis in the Czech Republic, late 2006 – preliminary report Euro Surveill 2007; 12: E070208.1.

153. Fretz R, Pichler J, Sagel U, et al. Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009- 2010. Euro Surveillance 2010; 15: 19543.

154. Swaminathan B and Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infect 2007; 9: 1236- 1243.

155. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, et al. An outbreak of food-borne Listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. Int J Food Microbiol 2005;104:189–96.

156. Gaulin C, Ramsay D, Ringuette L, Ismail J. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. Can Commun Dis Rep 2003; 29: 181- 186.

157. Jiang L, Chen J, Xu J, et al. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. Int J Food Microbiol 2008; 121: 53–59.

158. Barbuddhe SB, Malik SVS, Kumar JA, Kalorey DR, Chakraborty T. Epidemiology and risk management of listeriosis in India. Int J Food Microbiol 2012; 15: 154: 113- 118.

159. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, et al. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 4458–4467.

160. Brugere-Picoux J. Ovine listeriosis. Small Ruminant Research 2008; 76: 12– 20.

161. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C. *Listeria* Genomics, in *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Goldfine H, Shen H. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. 233 Spring Street, New York 2007, USA. p. 33- 63

162. Issa ZM, Mustakim M, Mohamed SAS, et al. Antibiogram Profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from foods, 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IACSIT Press, IPCBEE vol 7, p 133- 137, 2011, Singapore.

163. Poros- Gluchowska J, Markiewicz Z. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiol Pol 2003; 52: 113- 129.

164. Carrique-Mas JJ, Hokeberg I, Andersson Y, et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese--an outbreak of listeriosis? Epidemiol Infecti 2003; 130: 79- 86.

165. Dworkin MS, Williamson J, Jones JL, Kaplan JE. Prophylaxis with trimethoprim–sulfamethoxasole for human immunodeficiency virus-infected patients: Impact on risk for infectious diseases. Clin Infect Dis 2001; 33: 393– 398.

166. Akkaya L, Alişarlı M, Kara R, Telli R. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan kremalı pastalarda *Listeria* türlerinin varlığının belirlenmesi. YYÜ Vet Fak Derg 2006; 17: 93-97.

167. Abay S, Aydın F, Sümerkan A. Molecular typing of *Listeria* spp. isolated from different sources. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2012; 59: 183- 190.

168. David OM and Odeyemi AT. Antibiotic resistant pattern of environmental isolates of *Listeria monocytogenes* from Ado-Ekiti, Nigeria. Afr J Biotech 2007; 6: 2135- 2139.

169. Schaffter N, Zumstein J, Parriaux A. Factors influencing the bacteriological water quality in mountainous surface and groundwaters. Acta Hydrochim Hydrobiol 2004; 32: 225–234.

170. Millet L, Saubusse M, Didienne R, Tessier L, Montel MC. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. Int J Food Microbiol 2006; 108: 105-114.

171. Çolak F, Dığrak M, Aksoy Z. Kahramanmaraş'ta tüketime sunulan tavuk etlerinde *Listeria* türlerinin patojenitesi'nin belirlenmesi. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 2008; 11: 8- 12.

172. Miettinen MK, Siitonen A, Heiskanen P, et al. Molecular Epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. J Clin Microbiol 1999; 37: 2358–2360.

173. Nakamura H, Hatanaka M, Ochi K, et al. *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. Int J Food Microbiol 2004; 94: 323–328.

174. Wang F, Chern M, Li C, Yan M, Hsieh Y. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in food products in Taipei, Taiwan. Afr J Microbiol Res 2012; 6: 4702 -4706.

175. Cenet O. Alabalık Fletolarında Farklı Yöntemlerle *Listeria monocytogenes'in* Arastırması. YYÜ Vet Fak Derg 2007; 18: 41- 44.

176. Sancak YC, İşleyici Ö, Sağun E. Van'da tüketime sunulan bazı et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. YYÜ Vet Fak Derg 2007; 18: 93- 99.

177. Özmen G ve Kılıç H. Gemlik garnizonu'nda tüketime sunulan tavuk etlerinden *Listeria* spp. izolasyonu. Sağlık Bilimleri Dergisi 2006; 15: 194- 197.

178. Erol İ, Şireli UT, Gündeş B. Piliç parça et ve iç organlarında *Listeria* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. Ankara Uni Vet Fak Derg 1999; 44: 179- 188.

179. Ayaz ND, Ayaz Y, Kaplan YZ, Doğru AK, Aksoy MH. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in chicken carcasses by IMS-PCR. Ann Microbiol 2009; 59: 741- 744.

180. Şireli UT, Erol İ, Şahin S, Terzi G, Gürbüz OA. Tavuk kıyma köfte ve burgerlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. Turk J Vet Anim Sci 2002, 26: 1271- 1276.

181. Arslan A, Gönülalan Z, Dinçoğlu AH, Kök F. Tavuk karkas kısımları ve karkas yıkama sularında *Listeria* türlerinin incelenmesi. Turk J Vet Anim Sci 1999; 23: 305- 308.

182. Bilir Ormancı FS, Ayaz ND, İşeri O, Sarıgüzel D. Immunomagnetic separation and PCR detection of *Listeria monocytogenes* in turkey meat and antibiotic resistance of the isolates. Br Poult Sci 2008; 49: 560 – 565.

183. Ayaz ND ve Erol İ. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ground turkey by immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. J Rapid Meth Aut Mic 2009; 17: 214–222.

184. Olsen SJ, Patrick M, Hunter SB et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. CID 2005; 40: 962- 967.

185. Gottlieb S, Newbern EC, Griffin PM, et al. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. Clin Infect Dis 2006; 42: 29–36.

186. Birk-Urovitz E. The 2008 Canadian Listeriosis Outbreak: A Result of Knowledge Ignored. MUMJ 2011; 8: 65-67.

187. Smith B, Larsson JT, Lisby M, et al. Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a meals-on-wheels delivery in Denmark 2009. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 50–52.

188. Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. Int J Food Microbiol 1999; 53: 75- 80.

189. Yücel N, Çıtak S, Önder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiol 2005; 22: 241–245.

190. Jajali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. Int J Food Microbiol 2008; 122: 336–340.

191. Güven A, Patır B. Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde *Listeria* türlerinin arastırılması. Tr J Vet Animal Sci 1998; 22: 205- 212.

192. Anonymous, FSIS. 2003. Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products; final rule. Fed Reg 68: 34207–54.

193. Brandt AL, Castillo A, Haris KB, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. Journal of Food Science 2010; 75: 557- 563.

194. Sommers C and Fan X. Gamma irradiation of fine-emulsion sausage containing sodium diacetate. J Food Prot 2003; 66: 819– 824.

195. Berktaş M, Bozkurt EN, Bozkurt H, Alişarlı M, Güdücüoğlu H. Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes*'in izolasyonu. Van Tıp Dergisi 2006; 13: 36- 41.

196. Kaya M ve Gökalp HY. Farklı laktik starter kültürler kullanılarak üretilen sucuklarda *Listeria monocytogenes*'in davranışı. Turk J Vet Anim Sci 2004; 28: 1113- 1120.

197. Erol İ, Çelik TH, Sireli UT, Özdemir H. Bakteriyosin oluşturan starter kültürlerin fermente Türk Sucuklarında *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi. Turk J Vet Animal Sci 1999; 23: 793- 802.

198. Ayaz ND, Erol I. Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey. Journal of Food Protection 2010; 73: 967–972.

199. Berrada H, Soriano JM, Pico Y, Manes J. Quantification of Listeria monocytogenes in salads by real time quantitative PCR. Int J Food Microbiol 2006; 107: 202–206.

200. Schlech III WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, et al. Epidemic Listeriosis - Evidence for Transmission by Food. N Engl J Med 1983; 308: 203- 206.

201. Laksanalamai P, Joseph LA, Silk BJ, et al. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains ınvolved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US. Plos One 2012; 7: 1-11.

202. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 27/12/2007: 13-17.

203. Gombas DE, Chen Y, Clavero RS, Scott VN. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J Food Prot 2003; 66: 559–69.

204. Taban B. *Listeria monocytogenes* in cig kofte without meat: A novel bulgur ball product. J Food Agr Environ 2012; 10: 130- 132.

205. İşleyici O, Sancak YC, Sağun E, Ekici K. Presence of *Listeria* species in cig kofte. I. National Veterinary Food Hygiene Congress, pp. 139-146, 2004, Ankara.

206. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Engl J Med 1985; 312:404–407.

207. Meyer-Broseta S, Diot A, Bastian S, Riviere J, Cerf O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. Int J Food Microbiol 2003; 80: 1 – 15.

208. Taşçı F, Türütoğlu H, Öğütçü H. Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010; 16: 93 -97.

209. Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. Food Control 2010; 21: 1448-1452.

210. Sağun E, Sancak YC, İşleyici Ö, Ekici K. Van ve çevresi süt ve otlu peynirlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine bir araştırma. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25: 15- 19.

211. Uraz G ve Yücel N. *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica* ve benzerlerinin (*Yersinia kristensenii, Yersinia frederiksenii, Yersinia intermedia*) çiğ süt örneklerinden ızolasyonu. Turk J Agric For 1998; 22: 463– 468.

212. Dumen E, Issa G, Ikiz S, et al. Determining existance and antibiotic susceptibility status of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products, serological and moleculer typing of the isolates. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011; 17: 111- 119.

213. Uysal HK ve Anğ Ö. Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Listeria* türleri. Turk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33: 163- 169.

214. Aygün O ve Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control 2006; 17: 676- 679.

215. Ünlü GV, Ünlü M, Bakıcı ZM. Incidence of Listeria spp. from raw milk in Sivas. Turk J Med Sci 1998; 28: 389- 392.

216. Hayaloğlu AA, Güven A, Fox PF. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'. Int Dairy J 2002; 12: 635– 648.

217. Anonymous, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Ek-1 (Süt, Süt ürünleri ve Süt Bazlı Ürünler Bölümündeki; peynir, eritme peynirler ve eritme peynir ürünleri kısmı), Yetki Kanunu: 5996, T.C. Resmi Gazete**,** 29.12.2011, Sayı: 28157.

218. Erkmen O. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish White cheese during the ripening period. J Food Eng 2000; 46: 127- 131.

219. Erkmen O. Survial of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Turkish White cheese. Nahrung 2001; 45: 55 – 58.

220. Yıldırım Y ve Sarımehmetoğlu B. Beyaz Peynir yapımında bazı probiyotik bakterilerin kullanılmasının *Listeria monocytogenes* üzerine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2006; 3: 1- 7.

221. Arıcı M, Demirci M, Güngüz HH. *Listeria monocytogenes*'in inek ve koyun sütünden yapılan beyaz peynirlerin imalat, olgunlaşma ve depolama aşamalarındaki durumu. Turk J Agric For 1999; 23: 1133- 1137.

222. Pintado CMBS, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MASS. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. Food Microbiol 2005; 22: 79–85.

223. Manfreda G, De Cesare A, Stella S, Cozzi M, Cantoni C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. Int J Food Microbiol 2005; 102: 287–293.

224. Abrahao WM, Abrahao PRS, Monteiro CLB, Pontarolo B. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. Braz J Pharm Sci 2008; 44: 289- 296.

225. Arslan S ve Özdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. Food Control 2008; 19: 360– 363.

226. Gönç S ve Kılıç S. Beyaz peynirlerde *Listeria monocytogenes* patojeninin aranması üzerine bir araştırma. Gıda 2002; 27: 425- 429.

227. Gülmez M, Güven A. Beyaz ve çeçil peynirlerinde *Campylobacter, Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2001; 7: 155- 161.

228. Akkaya L, Alişarlı M. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* türlerinin varlığının belirlenmesi. YYÜ Vet Fak Derg 2006; 17: 87- 91.

229. Ceylan ZG ve Demirkaya AK. Erzurum piyasasından temin edilen salamura beyaz peynirlerde *Listeria monocytogenes* varlığı ve bazı mikrobiyolojik özeliklerinin belirlenmesi. Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg 2007; 38: 137- 141.

230. El-Sharef N, Ghenghesh KS, Abognah YS, Gnan SO, Rahouma A. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli- Libya. Food Control 2006; 17: 637–641.

231. Gönülalan S, Gönülalan Z. Kayseri ilinde satışa sunulan dondurmaların *Listeria monocytogenes* varlığı yönünden incelenmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi 2010; 19: 191-195.

232. Keskin Y, Başkaya R, Özyarat O, Kıyan P. Sade dondurmaların mikrobiyolojik incelenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37: 51- 58.

233. Miettinen MK, Bjorkroth KJ, Korkeala HJ. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol 2009; 46: 187–192.

234. Pourjafar M, Badiei K, Oryan A, et al. Clinico-pathological, bacteriological and PCR findings of Ovine Listeriosis: an emerging disease in southern Iran. Global Vet 2010; 5: 226- 232.

235. Border P, Howard J, Plastow G, Siggens K. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 1990; 11: 158-162.

236. Zhang D, Zhang L, Wang D, Suo B, Shi X. A PCR method for the detection of *Listeria monocytogenes* based on a novel target sequence identified by comparative genomic analysis. J Food Safety 2010; 30: 832–847.

237. Zeng H, Zhang X, Sun Z, Fang W. Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-processing environments. J Sci Food Agric 2006; 86: 367– 371.

238. Çetinkaya B, Ertaş HB, Muz A. Süt ürünlerinde *Listeria* türlerinin izolasyonu. Fırat Üniv Sağlık Bil Derg 1999; 13: 21–25

239. Büyükyörük S ve Göksoy EÖ. Aydın ilinde satışa sunulan köy peynirlerinde *Listeria* varlığının araştırılması. Uludag Univ J Fac Vet Med 2011; 30: 9- 12.

240. Bağcı C ve Çınar M. Niğde ve yöresinde tüketime sunulan salamura beyaz peynirlerden *Listeria monocytogenes* izolasyonu ve identifikasyonu. Vet Bil Derg 2005; 21: 69- 74.

241. Güner A ve Telli N. A survey on presence of *L. monocytogenes* in various semi-hard cheeses from different region of Turkey. J Anim Vet Adv 2011; 10: 1890- 1984.

242. Tekinşen OC ve Tekinşen KK. Süt ve Süt Ürünleri: Temel Bilgiler, Teknoloji, Kalite Kontrolü, Selçuk Üniv. Basımev, Konya, 2005: 229- 231.

243. Cakmakci S, Dagdemir E, Hayaloglu AA, Gurses M, Gundogdu E. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. World J Microbiol Biotechnol 2008; 24: 293–299.

244. Öner Z, Sağdıç O, Şimşek B. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. Eur Food Res Technol 2004; 219: 455–459.

245. Karagözlü C, Kılıç S, Akbulut N. Some characteristics of Cimi tulum cheese from producing goat milk. Bulg J Agric Sci 2009; 15: 292-297.

246. O'Connor L, O'Leary M, Leonard N, et al. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. Lett Appl Microbiol 2010; 51: 490– 498.

247. Acciari V, Torresi M, Migliorati G, et al. Characterisation of *Listeria monocytogenes* isolates from soft and semi-soft cheeses sampled in a region of Italy. Vet Ital 2011; 41: 15- 23.

248. Ochiai Y, Batmunkh O, Ogasawara K, Mochizuki M, Hondo R, Ueda F. Genetic variation of *Listeria monocytogenes* isolates from domestic and imported foods in Japan. Int J Food Microbiol 2008; 127: 12–17.

249. Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G,et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. BMC Genomics 2010; 11: 4-15.

250. Ruiz-Bolivar Z, Neuque-Rico MC, Poutou-Pinales RA, Carrascal-Camaco AK, Mattar S. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from different cities in Colombia. Foodborne Pathog Dis 2011; 8: 913- 919.

251. Aarestrup FM, Knöchel S, Hasman H. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from foods. Foodborne Pathog Dis 2007; 4: 216- 221.

252. Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair ISD, McDowell A. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. J Appl Microbiol 2001; 90: 517–522.

253. Wiggins GL, Albritton WL, Feeley JC. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Listeria monocytogenes.* Antimicrob Agents Chemother 1978; 13: 854- 860.

254. Da Silva MCD, Hofer E, Tibana A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janerio, Brazil. J Food Prot 1998; 61: 354- 356.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	FULDEN KARADAL
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri	1977- Ereğli KONYA
Medeni Durumu	Evli
Tel	0388-2310246
e-mail	f_karadal@yahoo.com
Yazışma Adresi	Bankalar cad. No:29 Niğde

EĞİTİM

Derece	**Kurum**	**Mezuniyet Tarihi**
Doktora	Erciyes Ünv. Sağlık Bil. Enst.	2013
Yüksek Lisans	Niğde Ünv. Sosyal Bil. Enst.	2009
Lisans	Selçuk Ünv. Veteriner Fak.	1997

İŞ DENEYİMLERİ

1998- Halen	Niğde Üniversitesi	Öğretim Görevlisi
1997-1998	Bedir Tavukçuluk	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce	ÜDS: 76.25

YAYINLAR

Karadal F, Türk M. İşletmelerde Teknoloji Yönetiminin Geleceği. Niğde Ünv. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 2008. 1(1): 59- 71

Yalçın İ, **Karadal F**. 2011. "Örgütlerde Öfke Yönetimi" . Yönetimde Birey ve Örgüt Odaklı Davranışlar. Editörler: Yeniçeri Ö, Demirel Y. Ekin Yayınları, 2011-Bursa

Nurhan Ertas, Zafer Gonulalan, Yeliz Yildirim, **Fulden Karadal** (2011). A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. Food Control, 22(12): 1956-1959.

Karadal F, Yıldırım Y. Balın Kalite Nitelikleri Beslenme ve Sağlık Açısından Önemi. Poster Bildirisi. I. Uluslararası Bal ve Arı Ürünleri Kongresi, 2012, Kayseri.

Karadal F, Yıldırım Y (2012). Balın Kalite Nitelikleri Beslenme ve Sağlık Açısından Önemi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 9(3): 197- 209.