

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜKETİME HAZIR GIDALARIN *LISTERIA* SPP. VARLIĞI BAKIMINDAN  
TARANMASI**

**Gürcü Aybige ÇAKMAK**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2017**

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Gürcü Aybige ÇAKMAK tarafından hazırlanan “Tüketime Hazır Gıdaların *Listeria spp.* Varlığı Bakımından Taranması” adlı tez çalışması 27/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA  
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Eş Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Başar UYMAZ TEZEL  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu

**Jüri Üyeleri** :

**Başkan** : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** : Prof. Dr. R. Ertan ANLI  
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA  
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Yeşim SOYER  
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Başar UYMAZ TEZEL  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

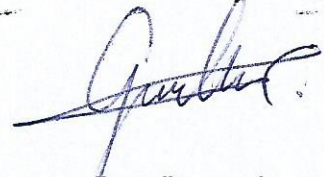
**Prof. Dr. Atilla YETİŞEMİYEN**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27/07/2017



GÜRCÜ AYBİGE ÇAKMAK

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜKETİME HAZIR GIDALARIN *LISTERIA* SPP. VARLIĞI BAKIMINDAN TARANMASI

Gürcü Aybige ÇAKMAK

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA  
Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Başar UYMAZ TEZEL

Bu çalışmada Ankara'daki farklı işletmelerden temin edilen toplam 134 adet tüketime hazır gıdanın *Listeria* varlığı bakımından taranması amaçlanmıştır. Çalışmada ISO 11290-1 protokolü takip edilmiştir. Gram (+), Katalaz (+), Oksidaz (-) ve hareketlilik (+) sonuç veren 35 izolatin, tür düzeyinde biyokimyasal olarak tanımlamasında API® *Listeria* test kiti kullanılmıştır. İzolatların moleküler tanımlanmasında ise 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. 16S rRNA dizi analizine göre; 35 izolattan 18'i *Listeria monocytogenes*, 14'ü *Listeria innocua*, 2'si *Listeria welshimeri* ve 1'i ise *Listeria grayi* olarak tanımlanmıştır. 18 *L. monocytogenes* suşunda patojeniteden sorumlu *hlyA* virülans gen varlığı araştırılmış ve 15 suşun bu gen bölgesini içerdiği saptanmıştır. 3 *L. monocytogenes* suşunun ise *hlyA* gen bölgesini içermediği belirlenmiş ve bu suşlar atipik *L. monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Çalışmamızda *L. monocytogenes* varlığı bakımından en riskli gıdalar; Arnavut ciğeri (% 34,78), Köfte ekmeği (% 29,42) ve tavuk döner (% 25) olarak belirlenmiştir.

**Temmuz 2017, 84 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Listeria*, tüketime hazır gıdalar, izolasyon, biyokimyasal tanımlama, moleküler tanımlama

## ABSTRACT

Master Thesis

### AN INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF *LISTERIA* SPP. IN READY TO EAT FOOD

Gürcü Aybige ÇAKMAK

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Pınar ŞANLIBABA  
Co-adviser: Asst. Prof. Dr. Başar UYMAZ TEZEL

In this study, it was aimed to screen a total of 134 ready-to-eat foods from different markets in Ankara for *Listeria* spp. presence. ISO 11290-1 protocol was followed in the study. API®*Listeria* test kit was used to species-level identification of 35 isolates showed Gram (+), catalase (+), oxidase (-) and mobility (+). For molecular identification of isolates, 16S rRNA sequence analysis was performed. According to 16S rRNA sequence analysis; 35 isolates were identified as *Listeria monocytogenes*, 14 as *Listeria innocua*, 2 as *Listeria welshimeri* and 1 as *Listeria grayi*. The presence of *hlyA* virulence gene responsible for pathogenicity was investigated in the 18 *L. monocytogenes* strains and it was determined that 15 strains contained this gene region. 3 *L. monocytogenes* strains did not contain the *hlyA* gene region and these strains were named as atypical *L. monocytogenes*. In our study, the most risky foods in terms of presence of *L. monocytogenes* were; Fried liver (34.78% ), meatball bread (29.42% ) and chicken doner (25% ).

**July 2017, 84 pages**

**Key Words:** *Listeria*, read-to-eat food, isolation, biochemical characterization, molecular characterization

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin gerek ders döneminde gerekse tez döneminde her türlü destek ve yardımlarını benden esirgemeyen hem akademik hem de diğer konulardaki yönlendirmeleriyle yüksek lisans hayatımı tamamlamamı sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Yüksek lisans tezimin Eş Danışmanlığını üstlenerek, çalışmalarımın başladığı andan itibaren bilgi birikimini benimle paylaşan Sayın Yrd. Doç. Dr. Başar UYMAZ TEZEL'e (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu Gıda Teknolojisi Programı),

Tez çalışmamın moleküler kısmını yürütebilmem için laboratuvarının kapılarını koşulsuz bana aralayan ve her türlü çalışma imkânı tanıyan, aynı zamanda da ilgi ve alakasıyla desteğini eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Hem lisans eğitimim hem de yüksek lisans eğitimim süresince her türlü desteğini yanımda hissettiğim, analizlerim sırasında da her türlü bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve çalışmalarım için gerekli olan referans suşlarımın temininde de yardımcı olan Sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı),

Tez çalışmamın moleküler kısımlarının yürütülmesi sırasında yardıma ihtiyaç duyduğumda bilgi ve tecrübelerini seferber eden, laboratuvarını kullanmama imkân tanıyan ve çalışmalarım için gerekli olan referans suşlarımın bir kısmının temininde de yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Yine çalışmamın moleküler analizler aşamasında uygulamalar konusunda beni bilgilendiren ve yönlendiren Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Prokaryot Genetiği Laboratuvarındaki Arş. Gör. Dr. Neslihan TAŞKALE KARATUĞ, Fatma Neslihan YÜKSEL, Caner ÖZDEMİR, Zeynep ERAN ve Sinem UĞUR'a,

Geçen iki yıllık süre zarfında aynı laboratuvarı paylaştığım, her türlü yardım ve desteklerini benimle paylaşan çalışma arkadaşları Esra ŞENTÜRK, Raşit KESKİN, Gülmire YUSUFU ve Gizem GÖKER'e,

En zor zamanlarımda bile beni teşvik eden, dünümden bugünüme kadar her an maddi manevi desteklerini yanımda hissettiğim ve canımdan çok sevdiğim Annem Mernuş ÇAKMAK'a, Babam Alaaddin ÇAKMAK'a ve Kardeşim Mehmet Mert ÇAKMAK'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu yüksek lisans çalışması '*Listeria* Türleri ile Fajlarının Farklı Materyallerden İzolasyonu ve Genotipik Tanımlanması ve *Listeria monocytogenes*'in Gıda Sistemlerinde Faj Uygulaması ile Biyokontrolü' başlıklı ve 15B0443010 nolu Bağımsız Projesi kapsamında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Gürcü Aybige ÇAKMAK

Ankara, Temmuz 2017

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|  |     |
|--|-----|
| ETİK.....  | i   |
| ÖZET.....  | ii  |
| ABSTRACT.....  | iii |
| TEŞEKKÜR .....   | iv  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                             | ix  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....  | xi  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....  | xii |
| 1. GİRİŞ .....   | 1   |
| 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....                                   | 3   |
| 2.1 <i>Listeria</i> spp.'nin Genel Özellikleri .....             | 3   |
| 2.2 <i>Listeria</i> spp.'nin Sınıflandırılması .....             | 4   |
| 2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                        | 7   |
| 2.3 <i>Listeria</i> spp.'nin Virülans Özelliği .....             | 9   |
| 2.3.1 <i>Listeria</i> spp. tarafından üretilen proteinler .....  | 9   |
| 2.3.2 <i>Listeria</i> spp.'de patojeniteden sorumlu genler ..... | 9   |
| 2.3.3 <i>Listeria</i> spp.'nin antibiyotik dirençliliği .....    | 11  |
| 2.3.4 <i>Listeria</i> spp.'nin biyofilm üretimi .....            | 12  |
| 2.4 <i>Listeria</i> spp. Kaynaklı Enfeksiyon; Listeriosis .....  | 13  |
| 2.4.1 Etki mekanizması .....                                     | 14  |
| 2.4.2 Risk grupları .....  | 14  |
| 2.4.3 Listeriyosis salgınları ve kaynakları .....                | 15  |
| 2.5 <i>Listeria</i> spp. İçin Yasal Düzenlemeler .....           | 16  |
| 2.6 <i>Listeria</i> spp.'nin Tanımlanması .....                  | 16  |
| 2.6.1 Kültürel yöntemlerle tanımlama .....                       | 17  |
| 2.6.2 Moleküler yöntemlerle tanımlama .....                      | 18  |
| 2.6.3 Tanımlamada Biyosensörlerin kullanımı .....                | 20  |
| 2.7 Tüketime Hazır Gıdalarda <i>Listeria</i> spp. varlığı .....  | 21  |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                       | 25  |
| 3.1 Materyal .....   | 25  |



|   |    |
|---|----|
| 3.1.1 Tüketime hazır gıda örnekleri .....   | 25 |
| 3.1.2 Referans bakteriler .....   | 25 |
| 3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar .....   | 25 |
| 3.1.4 Stok kültürlerin hazırlanması .....   | 26 |
| 3.2 Yöntem .....  | 26 |
| 3.2.1 Tüketime hazır gıda örneklerinin analize hazırlanması ve muhtemel<br><i>Listeria spp.</i> 'nin izolasyonu .....             | 26 |
| 3.2.2 Morfolojik ve biyokimyasal analizler .....  | 29 |
| 3.2.2.1 Gram boyama .....   | 29 |
| 3.2.2.2 Katalaz testi .....   | 29 |
| 3.2.2.3 Oksidaz testi .....   | 29 |
| 3.2.2.4 Hareketlilik testi .....  | 29 |
| 3.2.2.5 <i>Listeria</i> izolatlarının stok kültürlerinin hazırlanması .....   | 30 |
| 3.2.2.6 API® <i>Listeria</i> testi .....  | 30 |
| 3.2.3 <i>Listeria spp.</i> suşlarının 16S rRNA dizi analizi ile moleküler düzeyde<br>tanımlamaları .....                          | 32 |
| 3.2.3.1 Genomik DNA izolasyonu .....  | 32 |
| 3.2.3.2 Toplam genomik DNA örneklerinin jel elektroforez yöntemiyle<br>görüntülenmesi .....                                       | 33 |
| 3.2.3.3 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile<br>çoğaltılması .....                                       | 34 |
| 3.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>hlyA</i> gen bölgesi varlığının<br>araştırılması .....                          | 35 |
| 3.2.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> suşlarında <i>hlyA</i> gen bölgesinin polimeraz<br>zincir reaksiyonu ile çoğaltılması ..... | 35 |
| 3.2.5 16S rRNA ve <i>hlyA</i> gen bölgelerinin büyüklüklerinin belirlenmesi .....   | 36 |
| 3.2.6 PZR ürünlerinin dizilenmesi ve değerlendirilmesi .....  | 36 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....   | 37 |
| 4.1 Tüketime Hazır Gıdalardan <i>Listeria spp.</i> 'nin İzolasyonu .....  | 37 |
| 4.2 <i>Listeria</i> İzolatlarının Tanımlanması .....  | 45 |
| 4.2.1 Morfolojik ve kültürel testler .....  | 45 |
| 4.2.2 İzolatların biyokimyasal tanımlama .....  | 48 |
| 4.2.3 <i>Listeria spp.</i> suşlarının 16S rRNA dizi analizi ile moleküler düzeyde<br>tanımlanması .....                           | 54 |
| 4.2.4 <i>Listeria spp.</i> suşlarında <i>hlyA</i> gen bölgesi varlığının araştırılması .....                                      | 64 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. SONUÇ</b> .....   | <b>67</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b> .....  | <b>69</b> |
| <b>EK 1 Kültürel Çalışmalar İçin Kullanılan Malzemeler</b> .....  | <b>80</b> |
| <b>EK 2 Moleküler Çalışmalar İçin Kullanılan Malzemeler</b> ..... | <b>81</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....   | <b>83</b> |



## SİMGELER DİZİNİ

|         |                           |
|---------|---------------------------|
| pH      | Asitlik Deęeri            |
| $\beta$ | Beta                      |
| dk      | Dakika                    |
| h       | Saat                      |
| s       | Saniye                    |
| g       | Gram                      |
| kDa     | Kilodalton                |
| kGy     | Kilogray                  |
| kob     | Koloni Oluşturan Birim    |
| log     | Logaritma                 |
| $\mu$ g | Mikrogram                 |
| $\mu$ L | Mikrolitre                |
| mM      | Milimolar                 |
| mL      | Mililitre                 |
| L       | Litre                     |
| mm      | Milimetre                 |
| ref     | Rölatif Santrifüj Kuvveti |
| V       | Volt                      |
| °C      | Santigrat Derece          |
| cm      | santimetre                |
| nm      | Nanometre                 |

### Kısaltmalar

|       |   |
|-------|---|
| AB    | Avrupa Birliği (European Union)   |
| API   | Application Programming Interface   |
| ATCC  | Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)             |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool   |
| BLEB  | Buffered Listeria Enrichment Broth  |
| CDC   | Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (Centers For Disease Control And Prevention) |
| DNA   | Deoksiribonükleik Asit  |
| dNTP  | Deoksinükleotidtrifostat Karışımı   |
| EC    | Avrupa Komisyonu (European Commission)  |
| EDTA  | Etilendiamin tetraasetik asit   |

|           |  |
|-----------|--|
| EMS       | En Muhtemel Sayı   |
| FDA       | Gıda ve İlaç İdaresi (US Food And Drug Administration)   |
| GHP       | İyi Hijyen Uygulamaları (Good Hygiene Practices)   |
| GMP       | İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practices)   |
| GRAS      | Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen (Generally Regarded As Safe)                                   |
| Hsp       | Isıl Şok Proteini (Heat Shock Protein)   |
| ISO       | Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization For Standardization)        |
| İnl       | İnülin   |
| LAB       | Laktik Asit Bakterisi  |
| LAMP      | İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma Yöntemi (Loop-Mediated Isothermal Amplification)                  |
| LIPI      | <i>Listeria</i> Patojenite Adası ( <i>Listeria</i> Pathogenicity Island)                           |
| LLO       | Listeriolisin O  |
| MOX Agar  | Modifiye Oxford Agar   |
| mPZR      | Çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Multiple Pcr)   |
| NCBI      | Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center For Biotechnology Information)                        |
| NGS       | Gelecek Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)  |
| PC-PLC    | Fosfatidilkolin Spesifik Fosfolipaz C  |
| PI-PLC    | Fosfatidilinositol Spesifik Fosfolipaz C   |
| Prf       | Pozitif Kontrol Faktörü (Positive Regulatory Factor)   |
| PZR       | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)  |
| qPZR      | Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Pcr)   |
| rRNA DNA  | Ribozomal Deoksiribonükleik Asit   |
| RFLP      | Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği (Restriction Fragment Length Polymorphism)             |
| RNA       | Ribonükleik Asit   |
| RNaz      | Ribonükleaz  |
| rRNA DNA  | Ribozomal Ribonükleik Asit   |
| USDA-FSIS | ABD Tarım Bakanlığı United States Department Of Agriculture-The Food Safety And Inspection Service |
| UVM       | University Of Vermont Medium   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 3.1 ISO 11290-1 nolu yöntem akış şeması.....  | 27 |
| Şekil 3.2 ALOA agar üzerinde muhtemel <i>Listeria</i> izolatlarının koloni morfolojisi .....          | 28 |
| Şekil 3.3 PALCAM agar üzerinde muhtemel <i>Listeria</i> izolatlarının koloni morfolojisi .....        | 28 |
| Şekil 3.4 SIM besiyerinde hareketli <i>Listeria</i> izolatlarının şemsiye görüntüsü oluşturması ..... | 30 |
| Şekil 3.5 API® <i>Listeria</i> kiti kullanım protokolü.....   | 31 |
| Şekil 4.1 <i>Listeria</i> spp. izolatlarının API® <i>Listeria</i> test sonuçları .....                | 48 |
| Şekil 4.2 <i>Listeria</i> spp. suşlarının PZR ile çoğaltılan 16S rRNA fragmentleri .....              | 55 |
| Şekil 4.3 <i>Listeria</i> spp. suşlarında PZR ile çoğaltılan <i>hlyA</i> fragmentleri .....           | 65 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 2.1 <i>Listeria</i> spp.'ye ait tür ve alt türler.....  | 5  |
| Çizelge 2.2 <i>Listeria</i> spp.'nin ortak atalar bakımından sınıflandırılması.....   | 6  |
| Çizelge 2.3 <i>Listeria</i> türlerinin <i>L. monocytogenes</i> ile yakınlığına göre gruplanması .....   | 7  |
| Çizelge 2.4 Evrimsel süreçte <i>L. monocytogenes</i> serotiplerinin sınıflandırılması .....   | 8  |
| Çizelge 2.5 <i>L. monocytogenes</i> için patojeniteden sorumlu gen bölgeleri ve primer dizilimleri .....  | 11 |
| Çizelge 2.6 <i>Listeria</i> spp. spesifik gen bölgeleri .....   | 19 |
| Çizelge 3.1 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım.....  | 35 |
| Çizelge 4.1 Tez çalışmasında kullanılan tüketime hazır gıda örnekleri.....  | 38 |
| Çizelge 4.2 Tüketime hazır gıdalardan izole edilen <i>Listeria</i> izolatları .....   | 39 |
| Çizelge 4.3 Muhtemel <i>Listeria</i> izolatlarının gıda bazında dağılımı .....  | 44 |
| Çizelge 4.4 <i>Listeria</i> izolatlarının morfolojik ve kültürel test sonuçları .....   | 46 |
| Çizelge 4.5 Morfolojik ve kültürel testler sonucunda gıda bazında <i>Listeria</i> izolat sayısı .....   | 47 |
| Çizelge 4.6 <i>Listeria</i> izolatlarının biyokimyasal tanısı .....   | 49 |
| Çizelge 4.7 <i>Listeria</i> izolatlarının API® <i>Listeria</i> test kiti ile tür düzeyinde tanımlanması .....   | 51 |
| Çizelge 4.8 API® <i>Listeria</i> test kiti ile tür düzeyinde tanımlaması yapılan <i>Listeria</i> izolatlarının gıda örnekleri bazında dağılımı .....                    | 54 |
| Çizelge 4.9 <i>Listeria</i> spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tür düzeyinde tanısı.....   | 56 |
| Çizelge 4.10 16S rRNA dizi analiz yöntemiyle tanımlanan türlerin gıda örneği bazında dağılımı.....  | 58 |
| Çizelge 4.11 <i>Listeria</i> suşlarının tanımlanması aşamasında kullanılan API® <i>Listeria</i> test kiti ile 16S rRNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması..... | 62 |

## 1. GİRİŞ

*Listeriaceae* familyası içinde yer alan *Listeria*'nın günümüzde tanımlanmış on yedi farklı türü bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın bilinenleri *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ve *L. grayi*'dir. *L. monocytogenes*, hem insanlar hem de hayvanlar için patojen özellik gösterirken, *L. ivanovii* ise çoğunlukla hayvan patojeni olarak değerlendirilmektedir. Doğada yaygın olarak bulunan *Listeria* cinsi bakterilerin, zorlayıcı ortam koşullarında hayatta kalabilmesi en önemli özelliklerindedir. Özellikle buzdolabı koşullarında da yaşayabilen mikroorganizmalar olmasından dolayı halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadırlar.

Patojen mikroorganizma olarak tanımlanan *L. monocytogenes*, listeriosis adı verilen enfeksiyona sebep olmaktadır. Listeriosis, sağlıklı insanlarda kusma, halsizlik, ishal gibi semptomlarla atlatılabilmektedir. Ancak çeşitli sebeplerle bağışıklığı zayıflamış hastalar (kanser, AIDS, böbrek hastalıkları vb.), bebekler ve hamileler, risk grubunu oluşturmaktadır. Bu gruplarda gözlemlenen zehirlenme vakalarında ölüm oranının % 30'lara vardığı bilinmektedir.

*L. monocytogenes* enfeksiyonlarının tamamı gıda kaynaklıdır. Tüketime hazır gıdalar, listeriosis için oldukça riskli gıdalardır. Herkes tarafından kolay erişilebilir olması ve hazırlama sürelerinin kısa olması gibi sebepler, tüketime hazır gıdaları tercih edilebilir kılmaktadır. Ancak, uygun koşullarda işlem görmemiş veya doğru koşullarda depolanmamış tüketime hazır gıdalar halk sağlığı için tehlike arz etmektedir.

Tüketici sağlığı açısından riskli olan bu patojenin varlığının ve sayısının belirlenmesi ve tanımlanması oldukça önemlidir. Gıdalarda *Listeria* spp. varlığının belirlenmesi için oluşturulmuş çeşitli standart yöntemler mevcuttur. Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration / FDA), ABD Tarım Bakanlığı (US Department of Agriculture-Food and Safety / USDA-FSIS) ve Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization / ISO) gibi çeşitli denetleme ve düzenleme kurumları

tarafından hazırlanan bu protokoller, bakterinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak tanımlanmasını öngörmektedir. Kültürel gelişim yöntemlerine dayanan bu analizlerin sonuçlanması, inkübasyon süreleri dikkate alındığı zaman 7-10 gün sürebilmektedir. Patojenin sağlık riski göz önüne alındığında ise, bu süre oldukça uzundur. Bu amaçla daha pratik ve daha hızlı sonuçlandırılabilen moleküler tabanlı analizlere olan ilgi artmıştır. *Listeria* spp.'ye özgü spesifik genler kullanılarak, bu patojenin saptanması hem hızlı hem de güvenilir sonuç vermesi bakımından önem taşımaktadır.

*Listeria* spp.'nin özellikle de *L. monocytogenes*'in gıdalarda bulunmasıyla ortaya çıkan büyük çaplı salgınlar neticesinde, bu patojenin gıdalardan inhibisyonunu sağlamak amacıyla çeşitli yöntemler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla bakteriyosin ve/veya türe özgü bakteriyofajların kullanımını yanı sıra esansiyel yağların kullanımı, ışınlama teknikleri, modifiye ortamda ambalajlama gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

Bu çalışmada çiğ ve işlem görmüş tüketime hazır gıdalar Ankara'nın çeşitli marketlerinden, gıda işletmelerinden, yemekhanelerinden ve semt pazarlarından temin edilmiş ve *Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılmıştır. Örneklerin analizleri için ISO 11290-1 protokolü takip edilmiştir. Elde edilen izolatlara katalaz, oksidaz ve hareketlilik testleri uygulanmıştır. Muhtemel *Listeria* spp. izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasının yapılabilmesi için öncelikle API®*Listeria* test kiti uygulanmıştır. İzolatların daha sonra moleküler seviyede tanımlanması yapılarak, *hlyA* gen varlığı bakımından taraması yapılmıştır.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 *Listeria spp.*'nin Genel Özellikleri

*Listeria* cinsi; 0,5 µm çapında ve 1-2 µm uzunluğunda, köşeleri yuvarlak çubuk şekilli, genellikle tek veya zincir morfolojisinde bulunan, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, aerob veya fakültatif anaerob bir gruptur. Optimal gelişme ortamı sağlandığı zaman bölünme süresi 1-2 h arasında değişim gösterir. Laboratuvar ortamında 24-48 h'lik inkübasyon sonunda 0,5-1,5 mm çapında koloniler oluşturmaktadır. Gelişen koloniler yapışkan görünümlü olsa da, kolay dağılabilir bir yapı göstermektedir. Yaşlı kültürlerde ise koloni rengi gittikçe opaklaşmakta ve koloni çapı 3-5 mm'ye kadar ulaşabilmektedir (Roche vd. 2008). *Listeria spp.*, 4 ila 6 adet peritrik flagellaya sahip olduğu için 20-25 °C'de hareketli mikroorganizmalardır. Ancak 35-37 °C'de hareketsizdirler. Bu durum, flagellaların yapısında bulunan *flaA* geni tarafından kodlanan FlaA proteininin transkripsiyonun 30 °C'de durmasından kaynaklanmaktadır. Bakteriler bu sıcaklığın üzerinde hareketsizdirler (Giaouris vd. 2015). Gr (+) özellik gösterirler ancak bazı yaşlı kültürlerinde Gram boyama sonucunda farklı bir yapı gözlemlenebilir. *Listeria spp.* cinsi -1,5 –45 °C arasında canlılığını sürdürebilmekte olup, optimum gelişme sıcaklığı 30-37 °C arasındadır. Ancak (-18) °C ve (-40) °C'de de *Listeria* türlerinin gelişebileceği ifade edilmektedir (Alsheikh vd. 2014). 65 °C ve üzeri ısı işlem uygulamalarında *Listeria spp.* canlılığını koruyamamaktadır. % 10'a kadar olan tuz konsantrasyonunu tolere edebilmektedirler. Optimum pH değerleri hafif bazik olsa da 3-12 pH aralığında gelişim gösterebilmektedirler. *Listeria* cinsi içinde patojen olarak bilinen *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri*, β-hemolitik aktivite gösterirken diğer türler β-hemolitik aktivite göstermemektedir (Chasseignaux vd. 2002, Rocourt ve Buchrieser 2007, Gorski 2008, Roche vd. 2008, Wagner ve McLaughlin 2008, Liu 2008, Setiani vd. 2015). *Listeria*'nın optimal gelişim için ihtiyaç duyduğu besin maddeleri ise; sistin, sistein, lösin, izolösin, arjinin, metiyonin, valin, glutamin, tiyotik asit, biyotin(B7), riboflavin(B2), tiyamin(B1) ve alfa-lipoik asittir. Bakteriyel gelişim, demir(III) ve fenilalanin tarafından düzenlenmekte olup, temel karbon ve nitrojen kaynağı olarak glikoz ve glutamin kullanılmaktadır (Rocourt ve Buchrieser 2007).

Doğada, toprakta ve sularda saprofit olarak canlılığını sürdürebilen *Listeria* spp. gıdalardan, gıda üretim tesislerinden ve üretim atıklarından da sıklıkla izole edilebilmektedir (Wagner ve McLauchlin 2008, Hadjilouka vd. 2016).

## 2.2 *Listeria* spp.'nin Sınıflandırılması

*Listeria* cinsi başlangıçta *Corynebacteriaceae* ailesinin *Kurthia* cinsi içinde değerlendirilirken, 1970'lerden sonra ise 16S rRNA dizi analizi çalışmaları sonuçlarına göre *Lactobacillus-Bacillus* dallanmasında ayrı bir takson olarak değerlendirilmiştir. Ancak, 2001 yılından itibaren *Bacillales* takımı içerisinde yeni oluşturulan *Listeriaceae* ailesine dahil edilmiştir (<http://www.textbookofbacteriology.net> 2017a). Önceki filogenetik çalışmalarda *Lactobacillaceae*'ya daha yakın olarak belirtilmiş olsa da son çalışmalarla *Staphylococcus* ve *Bacillus*'a daha yakın olduğu belirlenmiştir. Taksonomik olarak en yakın olduğu cins *Brochotrix*'tir. % 37 civarında G+C oranı ile çeşitli fenotipik ve genotipik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda ise *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* gibi Gr (+) bakterilerle benzerlik göstermektedir (Rocourt ve Buchrieser 2007, Liu vd. 2008, Roche vd. 2008, Wagner ve McLauchlin 2008, Wellinghausen 2015). *Listeria*'nın günümüzde kabul edilen taksonomik sınıflaması; *Bacteria* (Domain), *Eubacteria* (Alem), *Firmicutes* (Şube), *Bacilli* (Takım), *Bacillales* (Sınıf), *Listeriaceae* (Aile), *Listeria* (Cins) şeklindedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> 2017b).

Günümüzde, *Listeria* cinsi içinde tanımlanmış 17 farklı bakteri türü bulunmaktadır. *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. marthii*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* ve *L. booriae* (Çizelge 2.1). Başlangıçta ayrı türler olarak değerlendirilen *L. grayi* ve *L. murrayi*, 1992 yılında Rocourt tarafından yapılan çalışma sonuçlarına göre *L. grayi* olarak tek bir tür altında birleştirilmiştir. *Listeria* cinsi içinde tanımlanan *L. denitrificans* ise, 1987 yılında *Jonesia denitrificans* olarak yeni bir cins içene dahil edilmiştir (Rocourt ve Buchrieser 2007).

Çizelge 2.1 *Listeria* spp.'ye ait tür ve alt türler (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> 2017b)

| <b>Tür</b>   | <b>Kaynak</b>                                 |
|--|---|
| <i>Listeria monocytogenes</i>                              | (Murray vd. 1926)<br>Pirie 1940               |
| <i>Listeria innocua</i>                                    | Seeliger 1981                                 |
| <i>Listeria seeligeri</i>                                  | Rocourt ve Grimont 1983                       |
| <i>Listeria welshimeri</i>                                 | Rocourt ve Grimont 1983                       |
| <i>Listeria ivanovii</i>                                   | Seeliger vd. 1984                             |
| <i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>            | Boerlin vd. 1992                              |
| <i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>        | Boerlin vd. 1992                              |
| <i>Listeria grayi</i>                                      | (Larsen ve Seeliger 1966)<br>Rocourt vd. 1992 |
| <i>Listeria marthii</i>                                    | Graves vd. 2010                               |
| <i>Listeria rocourtiae</i>                                 | Leclercq vd. 2010                             |
| <i>Listeria fleischmannii</i>                              | Bertsch vd. 2013                              |
| <i>Listeria fleischmannii</i> subsp. <i>fleischmannii</i>  | Bertsch vd. 2013                              |
| <i>Listeria fleischmannii</i> subsp. <i>coloradonensis</i> | Den Bakker vd. 2013                           |
| <i>Listeria weihenstephanensis</i>                         | Lang Halter vd. 2013                          |
| <i>Listeria aquatica</i>                                   | Den Bakker vd. 2014                           |
| <i>Listeria cornellensis</i>                               | Den Bakker vd. 2014                           |
| <i>Listeria floridensis</i>                                | Den Bakker vd. 2014                           |
| <i>Listeria grandensis</i>                                 | Den Bakker vd. 2014                           |
| <i>Listeria riparia</i>                                    | Den Bakker vd. 2014                           |
| <i>Listeria booriae</i>                                    | Weller vd. 2015                               |
| <i>Listeria newyorkensis</i>                               | Weller vd. 2015                               |

1985'ten önce tanımlanmış olan *Listeria* türleri (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ve *L. grayi*) arasında gıdalarda en yaygın bulunanlar, *L. innocua* ve *L. monocytogenes*'tir (Barre vd. 2016). Bununla birlikte

*L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* fakültatif hücre içi patojenler olarak tanımlanırken, diğer suşların patojenite göstermediği bildirilmektedir (Korsak ve Szuplewska 2016).

Filogenetik açıdan değerlendirildiğinde patojen *Listeria* suşları ile patojen olmayan suşları arasında farklı yakınlıklar olduğunu bildiren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Tan vd. 2015, Korsak ve Szuplewska 2016, Morlay vd. 2017). Bu bağlamda sahip oldukları ortak atalar bakımından *Listeria* spp. çizelge 2.2’de gösterildiği gibi dört farklı grup altında değerlendirilmektedir.

Çizelge 2.2 *Listeria* spp.’nin ortak atalar bakımından sınıflandırılması

| Oluşturulan Sınıflar | <i>Listeria</i> spp. Türleri  |
|----------------------|---|
| I                    | <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. marthii</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i> ,<br><i>L. seeligeri</i> , <i>L. ivanovii</i>                                    |
| II                   | <i>L. fleischmannii</i> , <i>L. aquatica</i> , <i>L. floridensis</i>  |
| III                  | <i>L. rocourtiae</i> , <i>L. weihenstephanensis</i> , <i>L. cornellensis</i> ,<br><i>L. grandensis</i> , <i>L. riparia</i> , <i>L. booriae</i> , <i>L. newyorkensis</i> |
| IV                   | <i>L. grayi</i>   |

Bir başka araştırma grubu tarafından yapılan çalışma bulgularına göre ise *Listeria* spp., *Listeria sensu strictu* ve *Listeria sensu lato* olarak iki gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.3). Araştırmacılar *Listeria sensu strictu* içinde yer alan türlerin ortak atadan türediğini, patojen özellikteki atanın virülans genlerini kaybetmesi ve/veya bu genlerin işlevsizleşmesi sonucu türlerin oluştuğunu ve çekirdek genomda bulunan yaklaşık 2000 genin oldukça stabil olduğunu bildirmişlerdir (Chiara vd. 2015).

Çizelge 2.3 *Listeria* türlerinin *L. monocytogenes* ile yakınlığına göre gruplanması

|                                      |   |  |
|--------------------------------------|---|--|
| <b><i>Listeria sensu strictu</i></b> | <i>L. monocytogenes</i> ,<br><i>L. seeligeri</i> ,<br><i>L. ivanovii</i> ,  | <i>L. welshimeri</i> ,<br><i>L. innocua</i> ,<br><i>L. marthii</i>   |
| <b><i>Listeria sensu lato</i></b>    | <i>L. grayi</i> ,<br><i>L. fleischmannii</i> ,<br><i>L. floridensis</i> ,<br><i>L. aquatica</i> ,<br><i>L. newyorkensis</i> ,<br><i>L. cornellensis</i> , | <i>L. rocourtiae</i> ,<br><i>L. weihenstephanensis</i> ,<br><i>L. grandensis</i> ,<br><i>L. riparia</i><br><i>L. booriae</i> |

*Listeria* spp.'nin patojeniteden sorumlu genlerin bulunduğu bölge *Listeria* Patojenite Adası (*Listeria* pathogenicity island / LIPI) olarak adlandırılmaktadır (Schmid vd. 2004). *Listeria sensu lato* grubunda yer alan türlerin hiçbirinde LIPI1 (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) ve LIPI2 (*inlA*, *inlB*) bölgelerinin bulunmadığı, bu sebeple bu gruptaki türlerin patojen özellik göstermediği bildirilmektedir (Orsi ve Wiedmann 2016).

DNA zincirindeki farklı dizilimler, mutasyon gibi genetik değişimler sonucu sonradan oluşan farklılıklar ve antijen çeşitliliği gibi sebeplerden dolayı türler de kendi aralarında gruplanarak serotipleri oluşturabilmektedir (Çakır ve Çakmakçı 2005). *Listeria* türleri somatik (O) ve flagellar (H) antijenleri gibi çoklu yüzey işaretçileri taşımaktadır. Bu farklılıklar sebebiyle türler içinde serotip / serovar olarak gruplandırılmaları yapılmaktadır. *Listeria* spp., somatik antijenlerine göre 15 alt gruba ayrılırken (I-XV) flagellar antijenlerine göre dört alt gruba (A-D) ayrılmıştır (Gorski 2008). *Listeria* spp., H ve O antijenlerine göre ise 16 serotipe sahiptir (Liu 2008, Şanlıbaba ve Uymaz 2015).

### 2.2.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria* spp. içinde üzerine en fazla araştırma yapılan tür *L. monocytogenes*'tir. 1926 yılında Murray, Webb ve Swann tarafından hasta tavşanlardan izole edilip, taksonomik sınıflandırmada diğer cinslerle benzer özellik göstermediği ve mononükleer lökositoya sebep olduğu için *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. 1927 yılında Pirie

tarafından yine hayvanlardan izole edilmiş ve ünlü cerrah Dr. Lister'e ithafen *Listerella hepatolytica* olarak adlandırılmıştır. Murray ve Pirie'nin birbirlerinden bağımsız olarak Lister Enstitüsü'ne gönderdikleri örneklerin, benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiş ve bakteri araştırmacılar tarafından *Listerella monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. 1939 yılında ise Pirie tarafından taksonomik adlandırmaya uygun olarak *Listeria monocytogenes* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Rocourt ve Buchrieser 2007, Bigot ve Charbit 2008).

*L. monocytogenes*, Gr (+) patojen bir bakteridir (Jaradat vd. 2002). *L. monocytogenes*'in insanlar için patojen olduğu 1929 yılında belirtilmişken, 1981 yılında çıkan lahana salatası kaynaklı salgın ile de gıda kaynaklı bir patojen olduğu kabul edilmiştir (Cenet 2007, Allen vd. 2016).

Moleküler tiplleme sayesinde *L. monocytogenes* farklı patojenik özelliklerine göre evrimsel soylara ayrılmıştır (Meloni vd. 2009). *L. monocytogenes*'in I, II, III ve IV olmak üzere en az dört evrimsel soya sahip olduğu düşünülmektedir. Soylar içinde sınıflandırılan serotipler çizelge 2.4'te belirtilmiştir. Bunlardan Soy I ve Soy II içerisinde yer alan serotipler, insanlarda klinik vakalara neden olmaktadır. Genel olarak; Soy I; epidemik salgınlara yol açan suşlarla, Soy II; gıda kaynaklı suşlarla, Soy III ve IV ise hayvanlarda bulunan suşlarla ilişkilendirilmiştir (Orsi vd. 2011, Rawool vd. 2016).

Çizelge 2.4 Evrimsel süreçte *L. monocytogenes* serotiplerinin sınıflandırılması

|                |                          |
|----------------|--------------------------|
| <b>Soy I</b>   | 1/2b, 3b, 3c, 4b, 4d, 4e |
| <b>Soy II</b>  | 1/2a, 1/2c, 3a, 3c       |
| <b>Soy III</b> | 4a, 4c                   |
| <b>Soy IV</b>  | 4a, 4c                   |

### 2.3 *Listeria spp.*'nin Virülans Özelliği

Çeşitli antibiyotiklere karşı direnç genleri, proteinler ve biyofilm üretebilme yeteneği *Listeria spp.*'de bulunan virülans özelliklerinden sorumludur.

#### 2.3.1 *Listeria spp.* tarafından üretilen proteinler

*L. monocytogenes* yüksek sıcaklık, asitlik ve osmotik stres gibi zorlu yaşam koşullarında diğer patojen bakterilere göre daha fazla hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir. Bu koşullarda canlılığını sürdürebilmesi ifade ettiği proteinlerle doğrudan ilişkilidir (<http://www.fao.org> 2007a). *Listeria*'nın ısı işlemlere dayanıklılığında; *groESL*, *dnaK*, *clpB*, *htrA* gibi gen bölgelerinden ifade edilen ve sıcaklık değişiminde üretilen ısı şok proteinleri (Heat Shock Proteins/Hsp) etkili olmaktadır. Ayrıca *gadDIT1*, *arcC*, *argR*, *atpD* gibi gen bölgelerinin ise asite karşı direnç bakımından önemli rol oynadığı bilinmektedir (Stack vd. 2008). Bakterilerin aside duyarlılığı, mikroorganizma inaktivasyonu için bir ön koşul olup, gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından önemlidir. Ancak pH düzeyinin düşmesi, *Listeria*'nın hemolitik aktivite göstermesi için gerekli olan bir koşul olduğu ifade edilmektedir. Kuruma veya ortamdaki tuz ve şeker gibi osmotik olarak aktif olan bileşiklerin konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak düşük su aktivitesine sahip gıdalarda; *opuC*, *relA*, *ctc*, *proB*, *btIA*, *htrA*, *kdpE*, *lisRK* gen bölgelerince ifade edilen proteinler *Listeria spp.*'nin osmotik stres şartlarında da hayatta kalabilmesini sağlamaktadır (Stack vd. 2008).

#### 2.3.2 *Listeria spp.*'de patojeniteden sorumlu genler

*L. monocytogenes*'in patojenite özelliği, LIP11 adı verilen, *prs* ve *orfX* arasında *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* ve *plcB* bölgelerini barındıran 9 kb'lık gen bölgesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu bölge *L. seeligeri*'de de bulunduğu ancak, bu bakteride patojenik özellik görülmediği bildirilmektedir (Schmid vd. 2004).

Benzer şekilde internalin, hemolisin, fosfatidilinositol spesifik fosfolipaz C ve fosfatidilkolin spesifik fosfolipaz C ve aktin polimerizasyon aktivitesinden sorumlu *inlA-inlB*, *hlyA*, *plcA* ve *actA* genleri ile *iap*, *lmaA*, *prfA*, *pepC*, *fbp*, *plcB* gibi gen bölgeleri *L. monocytogenes*'in patojenitesinden sorumlu genler olup aynı zamanda tanımlamada da kullanılan hedef bölgelerdir (Jaradat vd. 2002). *L. monocytogenes*'e ait spesifik ve virülans özelliğinden sorumlu gen bölgeleri ile nükleotit dizilimlerinden bazıları çizelge 2.5'de verilmiştir. Bunların içinde *L. monocytogenes* tanımlamasında en yaygın olarak kullanılan bölge *hlyA*'dır (Law vd. 2015). *hlyA* geni, listeriolisin O (LLO) adı verilen proteinin sentezinden sorumludur (Law vd. 2015). *inlA* geni tarafından kodlanan internalin A (InlA) proteini, 80 kDa'luk bir yüzey proteini olup, *Listeria* spp. içinde sadece patojen suşlarda bulunmaktadır. PrfA proteini, diğer proteinlerin transkripsiyonundan sorumludur ve *prfA* bölgesi tarafından kontrol edilir. *plcA* ve *plcB* bölgelerinden PI-PLC ve PC-PLC enzimleri kodlanır ve LLO ile bakterinin savunma mekanizmasında rol oynar. *mpl* kodladığı protein sayesinde PlcB öncülünün oluşmasını destekler. *actA* tarafından kodlanan ActA ise yüzey proteini ve virülans özelliğindedir (Bifulco vd. 2013). Jaradat vd. (2002), hasta insanlardan ve gıda örneklerinden elde edilen toplam 30 adet *L. monocytogenes* izolatu ile yaptıkları çalışmada, suşların virülans özelliklerini belirlemek amacı ile *inlA*, *inlB*, *actA*, *hlyA*, *plcA*, *plcB* ve *actA* gen bölgelerini incelemiştir. Çalışmada *actA* bölgesi bazı suşlarda farklı büyüklüklerde belirlenirken; *actA* bölgesi dışındaki diğer bölgelerin benzer büyüklükte olduğu tespit edilmiştir. Bu durum *actA* geninin polimorfizm özelliği taşımasıyla açıklanmıştır. Araştırma bulguları farklı kaynaklardan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının genetik özelliklerinin birbirine çok yakın olduğuna işaret etmektedir.



Çizelge 2.5 *L. monocytogenes* için patojeniteden sorumlu gen bölgeleri ve primer dizilimleri

| Gen bölgesi | Primer Dizilimi 5'-3'(F/R)              | Büyükük (bp) |
|-------------|---|--------------|
| Rrn         | CAG CAG CCG CGG TAA TAC                 | 938          |
|             | CTC CAT AAA GGT GAC CCT                 |              |
| plcB        | GGG AAA TTT GAC ACA GCG TT              | 261          |
|             | ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT              |              |
| inlB        | TGATGTTGATGGAACGGTAAT                   | 272          |
|             | CTCGTGGAAGTTTGTAGATGC                   |              |
| isp         | TGCAGCGAATGCTCTTAGTG                    | 713          |
|             | AGCCAAGCACGGCTACTTTA                    |              |
| Prs         | GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G           | 370          |
|             | CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G           |              |
| inlA        | ACG AGT AAC GGG ACA AAT GC              | 800          |
|             | CCC GAC AGT GGT GCT AGA TT              |              |
| inlC        | AAT TCC CAC AGG ACA CAA CC              | 517          |
|             | CGG GAA TGC AAT TTT TCA CTA             |              |
| inlJ        | TGT AAC CCC GCT TAC ACA GTT             | 238          |
|             | AGC GGC TTG GCA GTC TAA TA              |              |
| plcA        | CTG CTT GAG CGT TCA TGT CTC ATC CCC C   | 1484         |
|             | CAT GGG TTT CAC TCT CCT TCT AC          |              |
| prfA        | CTG TTG GAG CTC TTC TTG GTG AAG CAA TCG | 1060         |
|             | AGC AAC CTC GGT ACC ATA TAC TAA CTC     |              |
| actA        | CGC CGC GGA AAT TAA AAA AAG A           | 839          |
|             | ACG AAG GAA CCG GGC TGC TAG             |              |
| hlyA        | GCA GTT GCA AGC GCT TGG AGT GAA         | 456          |
|             | GCA ACG TAT CCT CCA GAG TGA TCG         |              |
| Iap         | ACA AGC TGC ACC TGT TGC AG              | 131          |
|             | TGA CAG CGT GTG TAG TAG CA              |              |

### 2.3.3 *Listeria* spp.'nin antibiyotik dirençliliği

*Listeria* spp.'nin çevresel koşullara karşı dayanıklı olmasını etkileyen bir diğer özelliği ise ortamda bulunan antibiyotiklere karşı direnç göstermesidir. Tetrasiklin, aminoglikozidaz, oksalin hariç penisilinler, makrolit, kloramfenikol, rifampisin gibi bileşiklere karşı duyarlılık gösterebilmelerin yanı sıra; sefalosporinler, aztreonam, pipemidik asit gibi bileşiklere karşı dirençlidirler. Ayrıca *L. monocytogenes*'in streptomisin, penisilin G ve trimetoprim karşı dirençli olduğu; amoksisilin, eritromisin,

gentamisin, kanamisin ve vankomisine karşı duyarlı olduğu da bilinmektedir (Wagner ve McLaughlin 2008).

Prieto vd. (2016) yaptıkları çalışmalarda, 1992-2012 yılları arasında gıda ve insanlardan izole ettikleri *L. monocytogenes* suşlarının; ampisilin, kloramfenikol, trimetoprim-sülfametoksazol, eritromisin, gentamisin, penisilin G, tetrasiklin ve rifampisine karşı minimum duyarlılık değerini incelenmişler ve her iki kaynaktan izole edilen tüm suşların denenen tüm antibiyotiklere duyarlılık gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca çalışmanın devam ettiği yirmi yıllık süre içinde *L. monocytogenes*'in antibiyotik dirençlilik profilinin değişmediği belirtilmiştir.

#### **2.3.4 *Listeria* spp.'nin biyofilm üretimi**

Gıda üretim tesisleri başta olmak üzere birçok yüzeyden izole edilebilen *Listeria* spp.'nin bu tarz abiyotik ortamlarda hayatta kalabilmesinin sebebi, biyofilm üretebilme yeteneğiyle ilişkilendirilmiştir (Harvey vd. 2007). Biyofilm; bir veya daha fazla bakteri türünün, bir arada bulunarak çevre ortamına salgıladığı ekzopolisakkarit yapı içerisinde çok hücreli yapı özelliği kazanmak amacıyla oluşturduğu topluluklardır (Akçelik ve Akçelik 2017). Biyofilmler, gıda sanayisinde özellikle taze ürünlerin üretim hatlarında (Botticella vd. 2013) ve süt üretim tesislerinde (Akan ve Kınık 2014) büyük sorun oluşturmaktadır.

Biyofilm üretiminde çeşitli genetik faktörler görev aldığı için, çevresel stres faktörlerinin varlığı (tuz, pH, nem vb.) formasyonu etkilemektedir. Ayrıca bakterinin flagellaya sahip olması da biyofilm üretebilme yeteneğini desteklemektedir. Dolayısıyla *prfA* biyofilm üretimi için önemli bir faktördür (Botticella vd. 2013). *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşturma mekanizması, hücreler arası ActA-ActA etkileşimi sonucu hücrelerin kümelenmesi ile açıklanmaktadır (Giaouris vd. 2015).

*Listeria* spp.'nin yüzeylere yapışıp aylarca canlı kalabilmesi, bakterinin çapraz kontaminasyon ile kontamine olmamış gıdalara taşınmasına neden olmaktadır. Bu

sebeple meydana gelen kontaminasyon gıda endüstrisi ve tüketiciler için endişe vericidir. Biyofilm oluşturma özelliği sayesinde, yoğun ortamda gelişen mikroorganizmaların planktonik organizmalara göre ortam şartları ve/veya dezenfektanlara karşı daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bu durum sistem ve ekipmanların sterilizasyon işlemini de zorlaştırmaktadır (Overney vd. 2017).

#### **2.4 *Listeria* spp. Kaynaklı Enfeksiyon; Listeriosis**

Listeriosis, hayvan ve insanlarda meydana gelen, sıklıkla da hamilelik döneminde uterus, merkezi sinir sistemi veya kan dolaşım sistemini etkileyen bir hastalıktır. İnsanda görülen listeriosis vakalarına sebep olan tür *L. monocytogenes* olarak bilinse de *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* kaynaklı vakalar da nadiren rapor edilmektedir. Ruminantlarda (inek, koyun vd.) gözlenen vakalarda başlıca sorumlunun *L. monocytogenes* olmasının yanında, enfeksiyonların yaklaşık % 10'unun *L. ivanovii*'den kaynaklandığı (Wagner ve McLauchlin 2008); diğer türlerin ise patojen özellikte olmayan saprofitler olduğu bildirilmektedir (Liu vd. 2008).

Listeriosis vakalarından sorumlu olan *L. monocytogenes* serotipleri; 4b, 1/2a, 1/2b ve 1/2c olarak tespit edilmişse de büyük çaplı salgınlara sebep olan serotipin 4b olduğu bilinmektedir (Wagner ve McLauchlin 2008).

İnsanlarda görülen listeriosis vakalarının neredeyse tamamı gıda kaynaklı olup (Stack vd. 2008); etmenin vücuda alınmasıyla hastalarda yüksek ateş, mide krampları, kusma, halsizlik ve ishal gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır (Yavuz ve Korukluoğlu 2010). Bazı listeriosis vakaları grip benzeri, ağır olmayan semptomlarla atlatılabilirken; bazı vakalarda ise septisemi, düşük yapma, perinatal enfeksiyonlar, gastroenterite, ensefalit, menenjit, beyin absesi ve serebrit ile ilişkilendirilmiş ağır bir tablo ortaya koymaktadır (Bifulco vd. 2013, Tan vd. 2015, Barre vd. 2016). Mortalite oranı yaklaşık % 30 olan listeriosis vakaları, en ölümcül gıda zehirlenme vakaları olarak nitelendirilmektedir (Wagner ve McLauchlin 2008).

#### 2.4.1 Etki mekanizması

*L. monocytogenes*, hücre dışında ve hücre içinde canlılığını sürdürebilen, birçok omurgalı ve omurgasız hayvanı enfekte edebilen bir mikroorganizmadır. *L. monocytogenes*'te bulunan virülans genlerin hepsi kısmen veya tamamen pozitif kontrol faktörü A (positive regulatory factor A/Prf A) tarafından düzenlenmektedir. *L. monocytogenes*'in virülans özelliği büyük ölçüde konakçı hücre zarını delerek hücre sitoplazmasının dağılmasına neden olan LLO toksinini üretmesiyle ilgilidir (Radtke vd. 2011). Bakterinin fosfolipaz A (PlcA) ile konak hücrenin sitoplazmasına giriş sağlanırken, Hly ve fosfolipaz B (PlcB) ile de hücreler arasında yayılması sağlamaktadır (Hof 2003, Chatterjee 2006, Law vd. 2015).

#### 2.4.2 Risk grupları

*L. monocytogenes*; gebelik, kanser, yetersiz beslenme, AIDS hastalığı gibi sebeplerle bağışıklığı baskılanmış bireylerde listeriosise sebep olan fırsatçı bir patojen olarak tanımlanmaktadır (<http://www.fao.org> 2007a, Kuhn vd. 2008).

Listeriosis için gerekli en düşük etki dozu bakterinin türüne ve serotipine, kontaminasyon kaynağı olan gıdanın içeriğine ve/veya konağın vücut dirençliliğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Roccatto vd. 2017). Listeriosis için en düşük etki dozu kişilere göre değişiklik gösterse de genellikle her 1 gram gıdada 100 koloni oluşturan birim (100 kob/g) tolere edilebilir olarak kabul edilmektedir. Ancak yüksek risk grubu olarak değerlendirilen lösemi hastalarında, AIDS hastalarında, böbrek nakli olan veya aşırı alkol tüketenler bireylerde en düşük etki dozunun daha da düştüğü rapor edilmektedir (Hof 2003). Gebelik süresince değişen hormonal denge sebebiyle hamile kadınların da listeriosise karşı daha savunmasız kaldığı bildirilmektedir (Xu vd. 2017).

### 2.4.3 Listeriyosis salgınları ve kaynakları

Listeriosis, 1930'lardan itibaren insan sağlığını tehdit eden bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Ancak 1980'lerde Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülen çeşitli salgınlar listeriosisi yeniden gündeme getirmiştir (<http://www.fao.org> 2007a). Bilinen ilk büyük listeriosis salgını, 1981 yılında Kanada'da lahana salatasından ortaya çıkmış; daha sonra da süt ve süt ürünleri gibi farklı pek çok gıda kaynaklı *L. monocytogenes* salgınları rapor edilmiştir. Bu durum *Listeria* spp. ile ilgili araştırmaların da artmasına neden olmuştur (Gorski 2008).

Gıdada başlangıç *L. monocytogenes* yükü oldukça düşük olsa bile, ürünün mikroorganizmanın gelişimini destekler nitelikte bir kompozisyona sahip olması ve etmenin buzdolabı sıcaklığında da çoğalmaya devam etmesi, listeriosis bakımından büyük risk etmenleridir (<http://www.fao.org> 2007a). Sosis, çiğ et, sandviç, marul, mantar, çiğ süt ve çiğ süt kullanılarak üretilen ürünler, yumuşak peynirler, deniz ürünleri ve ısıtılmış işlem uygulandıktan sonra düşük sıcaklıkta uzun süre depolanan yiyecekler *Listeria* spp. kontaminasyonuna açık ürünler olarak nitelendirilmektedir (Hof 2003, <https://www.fda.gov> 2013). Listeriosis vakalarının büyük bir kısmının kontamine olmuş süt ve süt ürünleri, kırmızı et ve kanatlı eti, deniz ürünleri, meyve ve sebze gibi ısıtılmış işlem görmüş veya çiğ tüketime hazır gıdalardan kaynaklandığını rapor edilmiştir (Rocourt ve Buchrieser 2007, Crandall vd. 2015). Ülkemizde ise *Listeria* varlığı bakımından riskli gıdalar arasında ızgara tavuk, kokoreç, midye dolma ve ısıtılmış işlem görmüş balık ürünleri yer almaktadır (Yavuz ve Korukluoğlu 2010).

Hastalık koruma ve kontrol merkezi (CDC), listeriosis salgınlarını yıllar bazında incelemiş ve bir rapor hazırlamıştır. Bu kapsamda listeriosis salgınlarının; 2017 yılında çoğunlukla yumuşak peynirden, 2016 yılında donmuş sebze, paketlenmiş salata ve çiğ süttten, 2015 yılında yumuşak peynir ve dondurmadan, 2014 yılında elma şekeri, fasulye filizi, peynir ve süt ürünlerinden, 2013 yılında peynir, 2012 yılında peynirli salata ve 2011 yılında ise kavundan kaynaklandığını rapor etmiştir (<https://www.cdc.gov> 2017c).

Ülkemizde listeriosis vakalarına rastlanma sıklığı düşük olmakla birlikte, var olan enfeksiyonların gıda kaynaklı olup olmadığı bilgisi, yeterli dokümantasyon sağlanamadığı için tespit edilememektedir. Bu duruma en tipi örnek ise Vardar vd. (2011) tarafından bildirilmiştir. Yüksek ateş, bulantı ve halsizlik şikâyetiyle hastaneye yatırılan 78 yaşındaki hastanın beyin omurilik sıvısı kültüründe *L. monocytogenes*'e rastlanmış, ampisilin/gentamisin antibiyotik uygulaması ile hastanın tedavisi gerçekleştirilmiş ancak enfeksiyon kaynağı araştırılmadığı için gıda kaynaklı bir vaka olup olmadığı saptanamamıştır.

## **2.5 *Listeria* spp. İçin Yasal Düzenlemeler**

Avrupa Komisyonu (EC) tarafından çiğ veya tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* varlığına yönelik yasal düzenlemeler yapılmıştır. Bu standartlara göre çeşitli tıbbi amaçlı veya bebek beslenmesi için hazırlanmış tüketime hazır gıdalarda 25 g numune içinde *L. monocytogenes* bulunmamalıdır. Bu gıdaların dışında, *L. monocytogenes* gelişimini destekleyecek kompozisyona sahip diğer tüketime hazır gıdalarda ise üretici kontrolünden hemen sonraki süreçte 25 g numunede *L. monocytogenes* bulunmamalı, perakende sürecinde ise belirlenmiş raf ömrü süresince 100 kob/g'ı geçmemelidir. Benzer şekilde *L. monocytogenes* gelişimini desteklemeyen kompozisyona sahip olan tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* miktarı raf ömrü süresince 100 kob/g'ın altında olması kabul edilebilir niteliktedir (Anonymous 2007b).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre ise 25 g gıdada *L. monocytogenes* varlığına izin verilmemektedir (<http://www.resmigazete.gov.tr> 2011).

## **2.6 *Listeria* spp.'nin Tanımlanması**

Günümüzde birçok ürün sadece üretildiği bölge veya ülkede tüketilmemekte, bir kısmı veya tamamı, küresel gıda ihtiyaçları doğrultusunda farklı bölgelere veya ülkelere de ihraç edilmektedir. Bu sebeple risk oluşturan kontamine gıdaların hızlı ve güvenilir olarak belirlenmesi, gıda güvenliğinin ve halk sağlığının korunabilmesi adına oldukça

önemlidir (Felix vd. 2014). Bu bağlamda gıdalarda patojen veya patojen olmayan *Listeria* spp. cinsi bakterilerin belirlenmesi ve tür ve/veya serotip düzeyinde tanımlanması da önem taşımaktadır (Huang vd. 2007). Gıdalarda patojen olmayan *Listeria* spp.'nin varlığı potansiyel *L. monocytogenes* kontaminasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmekte (Barre vd. 2016); Avrupa Birliği (AB) düzenleme komisyonu tarafından belirtildiği üzere de bu sayının 25 g gıdada 100 kob/g mikroorganizmadan fazla bulunmaması gerekmektedir (Barre vd. 2016).

Gıdalarda *Listeria* spp. varlığının belirlenmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemleri çok genel bir şekilde bakterinin kültürel gelişim ve biyokimyasal özellikleri esas alınan geleneksel yöntemler ile nükleik asit dizilimi esas alınan moleküler yöntemler olarak tanımlamak mümkündür.

### **2.6.1 Kültürel yöntemlerle tanımlama**

Kültürel yöntemlerin temelinde bakterinin gram boyanma özellikleri, katalaz ve oksidaz reaksiyonları ile hareketlilik yeteneği gibi spesifik olmayan özelliklerin yanında; şeker fermantasyonları, enzimatik reaksiyonları ve hemolitik aktivite gibi biyokimyasal özelliklerine göre tanımlama yer almaktadır. Öncelikle sıvı besiyerinde ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan olası *Listeria* spp., ardından seçici agar besiyerlerinden izole edilmekte; izole edilen olası *Listeria* spp. suşlarının karbonhidrat kullanımı, hemolitik aktivite yeteneği gibi özellikleri temel alınarak tür düzeyinde tanımlaması yapılmaktadır. Başlangıç aşamasında düşük sıcaklıkta ön geliştirme yapılan kültürel tanımlama yöntemleri de tercih edilebilmektedir. Bu yöntemlere göre *Listeria* spp. ilk zenginleştirme aşamasında canlılığını koruyabilirken, düşük sıcaklıkta yaşayamayan yabancı mikroflora bu sayede elimine edilebilmektedir (Huang vd. 2007, Gorski 2008).

FDA, USDA, ISO ve IDF gibi çeşitli denetleme ve düzenleme kurumları, *Listeria* spp. izolasyonu için Fraser Broth, University of Vermont Medium (UVM) *Listeria* Enrichment Broth ve Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) gibi selektif besiyerlerini önermektedir. Bu yöntemlerde genel uygulama; ön zenginleştirme ve

selektif zenginleştirme işleminin ardından çeşitli biyokimyasal analizler ve serolojik testlerle (Gram boyama, katalaz testi, CAMP testi, şeker testleri, oksidaz testi gibi) tanımlamanın gerçekleştirilmesidir (Law vd. 2015, Setiani vd. 2015). Tipik morfoloji gösteren kolonilerin tür düzeyinde tanımlanması amacıyla da biyokimyasal aktivite sonuçlarını esas alan BioMérieux API®, Microgen *Listeria* ID, Microbact™ *Listeria* 12L gibi hazır preparatlar kullanılmaktadır. İmmünolojik özellikleri esas alan Oxoid *Listeria* Rapid ticari test kitleri de hızlı tanımlama için kullanılmaktadır.

## 2.6.2 Moleküler yöntemlerle tanımlama

1980'li yıllarda bakterilerin filogenetik ilişkilerini incelemek için ribozomal 5S, 16S ve 23S bölgeleri ve bu bölgeler arasındaki alanlar incelenmeye başlanmıştır. Günümüzde en çok kullanılan bölge 16S rRNA bölgesidir; 16S rDNA olarak da tanımlanabilmektedir. 16S rRNA bölgesi tüm bakterilerde evrenseldir ve bu bölgenin araştırılmasıyla cins, tür hatta alttür düzeyinde tanımlama yapabilmek mümkündür. (Clarridge 2004).

İş yükünü ve analiz süresini azalttığı için temeli, spesifik DNA veya RNA dizilerinin tespit edilmesi prensibi olan moleküler tanımlama yöntemlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Çakır ve Çakmakçı 2005, Law vd. 2015). Moleküler tanımlama yöntemlerinde spesifik olmayan gen bölgeleri (genomik dizilim, rastgele primer bölgeleri, tekrarlanan elementler, restriksiyon enzim bölgeleri) kullanılabildiği gibi ribozomal RNA (rRNA DNA veya rRNA DNA) gibi tür ve/veya cinse özgü bölgeler kullanılarak daha hassas tanımlamalar yapılabilmektedir. Gelişen dizileme teknikleri ve yapılan çok sayıda çalışma sayesinde türlere spesifik gen bölgeleri belirlenmiştir. *Listeria* spp. türleri için rRNA DNA dışında *groESL*, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *prs*, *iap*, *flaA*, ve *fbp* gen bölgelerini hedef alan tanımlama da yapılabilmektedir. Ayrıca spesifik bölgeler kullanılarak tür düzeyinde de hızlı tanımlama yapmak mümkündür. *L. monocytogenes* için *hly*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *mpl*, *prfA*, *inlA*, *inlB*, *clpE*, *lmaA/dth18*, *lmo0733*, *lmo2234*, *pepC* bölgeleri; *L. ivanovii* için *liv22-228* bölgesi, *L. seeligeri* için *lse24-315* bölgesi; *L. innocua* için *lin0464* ve *lin2483* bölgeleri; *L. welshimeri* için



*lwe7-571* bölgesi ve *L. grayi* için *lgr20-246* bölgesi spesifik bölgelerdir (Liu vd. 2008). Huang vd. (2007) tarafından bildirilen *Listeria* spp. türlerine ait bazı spesifik gen bölgelerin dizimleri çizelge 2.6’da verilmiştir.

Çizelge 2.6 *Listeria* spp. spesifik gen bölgeleri

| <i>Listeria</i> spp.    | Hedef Bölge            | Primer dizisi F/R            | Büyükük (bp) |
|-------------------------|------------------------|------------------------------|--------------|
| <i>Listeria</i> spp.    | 16S                    | TTAGTGGCGGACGGGTGA           | 700          |
|                         |                        | GGTATCTAATCCTGTTTGCTC        |              |
| <i>L. welshimeri</i>    | <i>scrA</i>            | TCCCACCATTGGTGCTACTCA        | 608          |
|                         |                        | TTGGCGTACCAAAGAAATACG        |              |
| <i>L. monocytogenes</i> | <i>lmo0733</i>         | CGCAAGAAGAAATTGCCATC         | 453          |
|                         |                        | TCCGCGTTAGAAAAATTCCA         |              |
| <i>L. seeligeri</i>     | internalin geni        | CGCGACGGCTAAAGTACTAA         | 375          |
|                         |                        | ATTGCTCGCTTTGAAGTCGT         |              |
| <i>L. ivanovii</i>      | N-acetylmuramidaz geni | (N)15aCGAATTCCTTATTCACTTGAGC | 493          |
|                         |                        | (N)15GGTGCTGCGAACTTAACTCA    |              |
| <i>L. innocua</i>       | <i>lin0464</i>         | CGCATTATCGCCAAAACCTC         | 749          |
|                         |                        | TCGTGACATAGACGCGATTG         |              |
| <i>L. grayi</i>         | Oksidoredüktaz geni    | CTGCACGATCAAGGTCAATC         | 420          |
|                         |                        | CGTATTGCGCACCAGTGATA         |              |

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), çoklu PZR (mPZR), eş zamanlı PZR(qPZR), Nested PZR, Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği (RFLP), nükleik asit dizilimi temelli amplifikasyonlar (NASBA), Döngüsel izotermal amplifikasyonlar (LAMP) ve mikro dizileme olan gelecek nesil dizileme (Next Generation Sequencing/NGS) mikroorganizmaların tanımlamasında kullanılan yeni moleküler metotlardandır (Çakır ve Çakmakçı 2005, Law vd. 2015).

Tao vd. (2017), 200 adet dondurulmuş et ve deniz ürünüde *Listeria* spp.’nin varlığının belirlenmesi için multipleks PZR yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, kısa zamanda 28 üründe *Listeria* spp. varlığını tespit etmişler ve tür dağılımının *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. grayi* olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *LMOF2365\_2721*, *AX25\_00730*, *lin1814*, *int*,

ve *lwe1673* genlerinin sırasıyla *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* için spesifik olduğu da belirlenmiştir.

Bang vd. (2013) tarafından geliştirilen DNA mikro dizileme yöntemi ile gıdalarda hızlı ve anlık patojen tespitinin geçerliliği test edilmiştir. *L. monocytogenes* ATCC 19111 suşuna ait DNA, izole edildikten sonra çeşitli sınırlayıcı enzimler ile farklı boylarda kesilmiş, agaroz jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmış ve rastgele olarak seçilen altmış bölge, amin ile kaplanmış camlara yerleştirilmiştir. Bu yöntemde *L. monocytogenes* suşlarının hibridizasyon oranı % 98-100 olarak değerlendirilmişken, diğer *Listeria* spp.'nin ve diğer gıda kaynaklı patojenlerin hibridizasyon oranı sırasıyla % 7-85 ve % 0-32 olarak ölçülmüştür. Araştırmacılar, bu yöntemin *L. monocytogenes* analizlerinde kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Cenet (2007), balık filetolarında yaptığı analizlerde kültür yöntemlerle pozitif sonuç bulamamış ancak, antikor antijen ilişkisine dayanan EIA (ELISA) yöntemiyle örneklerinin % 9,1'inde *L. monocytogenes* tespit etmiştir.

Hızlı ve basit şekilde bakterilerin tanımlanması için kullanılan bir diğer yöntem ise yüksek çözünürlüklü eritme analizleri (High Resolution Melting Analysis/HRMA) ile DNA diziliminin belirlenmesidir. Ohshima vd. (2014) bu yeni yöntemi *rarA* ve *ldh* genlerini temel alarak *Listeria* spp. tanımlanmasında kullanmışlardır. Aynı zamanda yeni yöntemin doğruluğu aynı örnekler için yapılan 16S rRNA dizileme sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Yeni yöntemin % 92,6 oranında doğru sonuç verdiği belirtilmiştir.

### **2.6.3 Tanımlamada Biyosensörlerin kullanımı**

Tanımlamada kültürel, moleküler ve immünolojik yöntemlerin yanı sıra biyosensörlerin kullanımı son yıllarda ivme kazanan çalışmalar arasındadır (Wang vd. 2017).

Bifulco vd. (2013) tarafından tasarlanan *hlyA* gen bölgesini tanımlamaya yönelik elektrokimyasal gen biyosensörü ile gıdalardaki *L. monocytogenes* varlığı 60 dk. gibi kısa bir süre içerisinde belirlenebileceği bildirilmiştir.

Phraephaisarn vd. (2017), tasarladıkları yeni biyomarker olan BE-LisAll ile bütün *Listeria* cinsi bakterilerin tanımlanabileceğini bildirmişlerdir. Tasarlanan kit ile toplam 34 *Listeria* cinsi bakteriyi, 2700 farklı bakteri arasından tanılayabilmişlerdir.

Morlay vd. (2017), *Listeria* spp.'a özgü olarak tasarlanmış antikorlar yardımıyla mikroorganizmanın anlık olarak tespit edilmesinin mümkün olup olmadığını belirlemek istemişlerdir. Tasarladıkları Ab6 ve Ab4 immünoglobulinlerin *L. monocytogenes* için, Ab2 antikorunun ise diğer *Listeria* türleri için tanımlayıcı olduğu, bu yöntemin ise rutin ve hızlı kontroller için kullanılabilir olduğunu vurgulamışlardır.

## **2.7 Tüketime Hazır Gıdalarda *Listeria* spp. varlığı**

Tüketime hazır gıda; işlenmiş ve tüketim öncesinde yeniden ısıtma işlemine ihtiyaç duyulmadan tüketilebilen ürünleri kapsamaktadır (Liu 2008). Yüksek işlem sıcaklığında *Listeria* spp. inhibisyonu sağlanabilmekteyken, tüketime hazır gıdalarda bu mikroorganizmaya rastlanma sebebi; i) kontamine olmuş hammaddenin kullanımı, ii) yetersiz ısıtma işlemi uygulanması, iii) üretim hattındaki ekipmanların yüzeyinden çapraz kontaminasyonun gerçekleşmesi veya iv) üretim tamamlandıktan sonraki aşamalarda (olgunlaştırma, paketleme, depolama, taşıma vb.) kontaminasyonun gerçekleşmesidir. Ekipmanların yeterince temizlenmemesi, gıda kalıntılarının kalması ya da bakterinin biyofilm oluşturarak yüzeye sıkıca tutunmasıyla, ürün temiz olsa bile kontaminasyon gerçekleşebilmektedir. (Moretro ve Langsrud 2004, Henriques vd. 2014).

Gülmez vd. (2005), Kars'taki lokantalardan temin ettikleri 40 adet salatanın 7'sinde (5 tane *L. monocytogenes* ve 2 tane *L. ivanovii*) ve 40 adet ızgara köftenin bir tanesinde

(*L. monocytogenes*) *Listeria* spp.'a rastlamış ve araştırılan örneklerin halk sağlığı açısından risk teşkil ettiği bildirmişlerdir.

Jallewar vd. (2007), Hindistan'daki yerel marketlerden topladıkları Tatlısu balığına *Listeria* spp. varlığını araştırmışlardır. USDA tarafından önerilen protokolü takip eden araştırmacılar, izolatların 26 tanesini *L. monocytogenes*, 8 tanesini *L. seeligeri*, 3 tanesini *L. grayi* ve 2 tanesini *L. welshimeri* olarak tanımlamıştır. İzole edilen *Listeria* suşlarında *plcA*, *actA*, *iap* ve *hlyA* genleri tespit edilmeye çalışılmış ve gen bölgelerinin hepsi ve/veya birkaç tanesi *L. monocytogenes*'te tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar *hlyA* ve *iap* gen bölgeleri *L. seeligeri*'de de saptamışlardır.

Meloni vd. (2009), İtalya'da satışa sunulan tüketime hazır gıdalarda *Listeria* spp. varlığını incelenmiştir. Analizi yapılan 200 gıda örneğinden, 44 tanesinde *Listeria* spp. tespit edilirken, bunlardan 19 tanesinin de *L. monocytogenes* olduğu bildirilmiştir.

Maklon vd. (2010), Japonya'da üretilen tüketime hazır light turşularda *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. 108 örnek ISO 11290-1 standardına göre *Listeria* spp. taramasına tabi tutulmuştur. Toplam 12 örnek *L. monocytogenes* pozitif olarak değerlendirilmiştir. *L. monocytogenes* suşları ayrıca serotip düzeyinde tanımlanmıştır. 7 örnek 4b, 2 örnek 1/2a olarak tanımlanmışken; 1/2a, 3b ve 4c serotipleri de birer örnekten izole edilmiştir. Ayrıca *L. monocytogenes* olarak tanımlanmış izolatların virülans gen bölgelerinin tespiti için *actA*, *hly*, *iap*, *inlA*, *inlC*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *prfA*, *clpC* ve *opuCA* bölgeleri araştırılmış ve tüm suşlarda bu bölgelerin varlığı tespit edilmiştir.

Kum vd. (2011), Kayseri ilinde satışa sunulan peynir örneklerinde *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlar ve toplam 50 örneğin 7 tanesinde (% 14) *L. monocytogenes* pozitif sonuç saptamışlardır. Araştırmacılar çiğ süttten üretilen peynirlerin ısı işlem görmüş süttten yapılan peynirlere kıyasla daha yüksek oranda *L. monocytogenes* içerdiğini de vurgulamışlardır.

Henriques vd. (2014), tüketime hazır et ürünleri işleyen on farklı tesisin üretim aşamasını, üretim sonrası ve paketleme sistemlerini, iyi hijyen uygulamaları (GHP) ve iyi üretim uygulamaları (GMP) bakımından denetlemiştir. Dört işletmenin üretim sonrasında ki ürünlerinin analizi sonucunda *L. monocytogenes*'e rastlanmıştır. İşletmelerin üretim hatları incelendiğinde ise, altı tanesinin taşıma bandı, tezgâh ve doğrama tahtalarından alınan numunelerden *L. monocytogenes* pozitif sonuç alınmıştır. Araştırmacılar bu patojenin yetersiz hijyen ve üretim uygulamalarıyla, işletmelerde kolaylıkla gelişebilme ortamı bulabileceği vurgulamışlardır.

Nayak vd. (2015), 200 farklı hayvansal kökenli gıda örneğinde *Listeria* spp. varlığı taraması yapmışlar ve toplam 18 tanesinde pozitif sonuç bulmuşlardır. 18 adet *Listeria* spp.'nin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde; 6'sının *L. seeligeri*, 5'inin *L. innocua*, 4'ünün *L. welshimeri* ve 3'ünün ise *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir. *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 3 izolat için *actA*, *hlyA* ve *iap* gen bölgeleri araştırılmış ve her üç örnekte de *actA* ve *hlyA* bölgeleri saptanırken, *iap* bölgesi sadece iki örnekte tespit edilebilmiştir.

Kramarenko vd. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda, vakum ve modifiye atmosferde paketlenmiş tüketime hazır et ve balık ürünlerinde *L. monocytogenes* varlığı araştırılmıştır. Raf ömrü sonunda toplam 370 örnekten 42 tanesinden pozitif sonuç elde edilmiş, bunlardan 41 tanesinde mikroorganizma sayısı 10-100 kob/g olarak değerlendirilirken, sadece 1 tanesinde AB düzenlemesine aykırı olarak 100 kob/g'dan fazla olduğu tespit edilmiştir.

Coroneo vd. (2016), İtalya'da yaygın olarak tüketilen ve hazırlandıktan sonra herhangi bir işlem uygulanmadan satışa sunulduğu için tüketime hazır gıda olarak değerlendirilen "Ricotta" salatalarındaki *L. monocytogenes* varlığını ve bu bakterinin virülans özelliklerini incelemiştir. Toplanan 87 örnekten 15 tanesinde *L. monocytogenes* pozitif sonuç elde edilmiştir. Virülans özellikleri bakımından *prfA*, *rrn*, *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA*, ve *plcB* gen bölgelerinin varlığı incelenmiş, sadece bir örnekte tüm genlerin bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca izole edilen suşların 1/2a ve 1/2b serotiplerinde olduğu belirlenmiştir.

Du vd. (2017), Çin’de pazarlardan topladıkları dondurulmuş mantı, tatlandırılmış çiğ et, kızarmış et, haşlanmış et ve soslanmış salata örneklerini kapsayan toplam 900 örnekte *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlardır. *L. monocytogenes* bakımından en çok kontamine olmuş gıda örneğinin haşlanmış et ürünleri olduğunu bildiren araştırmacılar, örneklerin 21 tanesinde *L. monocytogenes* varlığı bakımından pozitif sonuç elde etmişlerdir. Multilocus Sequence Typing (MLST) analiziyle tiplendirdikleri *L. monocytogenes* suşlarında 12 ST alt grubu tespit etmişlerdir. *L. monocytogenes* suşlarında ayrıca *actA*, *hlyA*, *iap*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *plcB* ve *prfA* gen bölgeleri varlığı araştırılmıştır. Tüm izolatlarda *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *hlyA* ve *plcB* geni bulunurken, *inlB*, *actA*, *plcA* ve *iap* bölgelerinin örneklerin % 71,4-90,5’inde bulunduğu bildirilmiştir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Tüketime hazır gıda örnekleri**

Çiğ ve işlem görmüş tüketime hazır gıdalar Ankara'nın çeşitli marketlerinden, gıda işletmelerinden, yemekhanelerinden ve semt pazarlarından temin edilmiştir. Aseptik koşullara dikkat edilerek tek kullanımlık steril örnekleme kaplarına alınan gıda örnekleri, soğuk zincir korunarak Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılmış ve herhangi bir depolama işlemi uygulanmaksızın aynı gün içinde izolasyon çalışmalarına başlanmıştır.

##### **3.1.2 Referans bakteriler**

Tez çalışmasında referans bakteri olarak kullanılan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşu Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'dan (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşu ise Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'ten (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) temin edilmiştir.

##### **3.1.3 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasallar**

Tez çalışması kapsamında izolasyon ve biyokimyasal analizler için kullanılan besiyerleri, katkıları ve kimyasallar EK 1'de verilirken; moleküler çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar ise EK 2'de verilmiştir.

### 3.1.4 Stok kültürlerin hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan referans bakteriler ile tüketime hazır gıdalardan izole edilen *Listeria* izolatlarının, % 40 steril gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) broth ve Tryptone Soya Yeast Extract (TSYE) broth ortamlarında stok kültürleri hazırlanmıştır. Stok kültürler – 20 °C’de muhafaza edilmiştir. Tez çalışması süresince kültürler TSYE broth ve/veya BHI broth ortamlarında, 35 °C’de 18 h geliştirildikten sonra çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

## 3.2 Yöntem

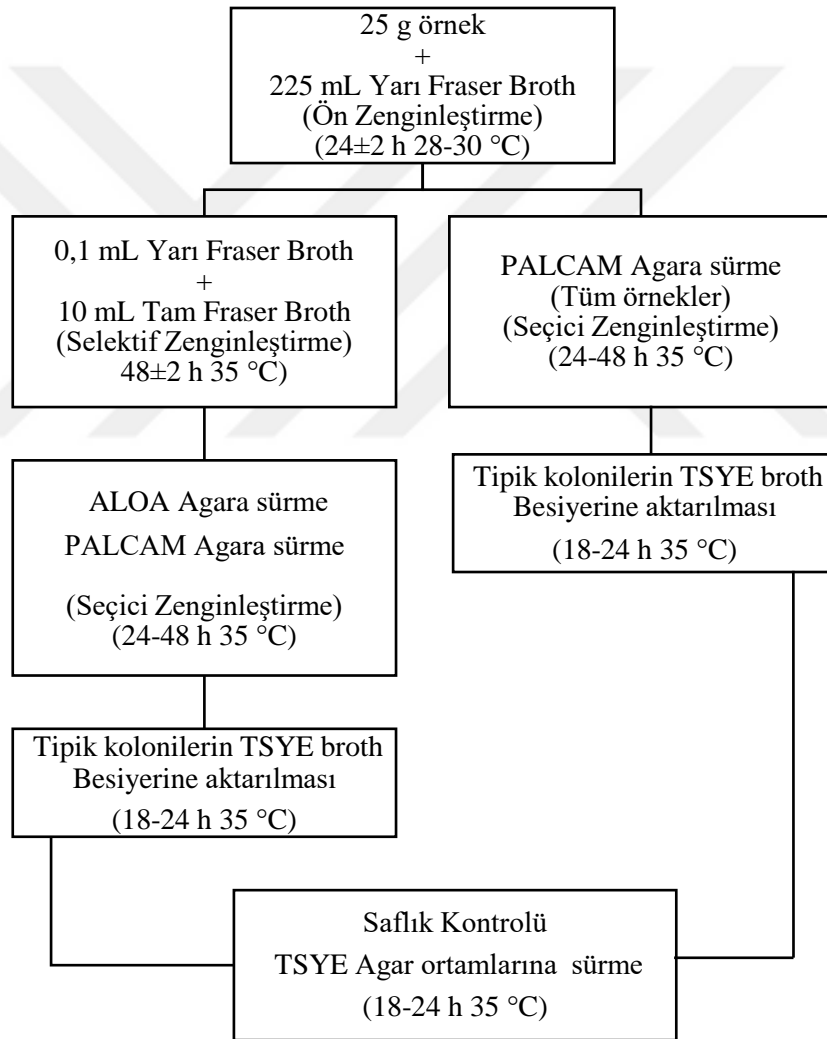
### 3.2.1 Tüketime hazır gıda örneklerinin analize hazırlanması ve muhtemel *Listeria* spp.’nin izolasyonu

Tez çalışması kapsamında tüketime hazır gıda örnekleri aseptik koşullara dikkat edilerek laboratuvar ortamına getirilmiş ve depolama işlemi uygulanmaksızın analize tabi tutulmuştur. *Listeria* spp.’nin izolasyonu için, 2004 yılında revize edilen ISO 11290-1 nolu yöntem takip edilmiştir. Söz konusu yöntemde göre sırasıyla ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme işlemleri uygulanmış, sonra selektif katı besiyerine ekim ve tipik koloni gelişimi değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).

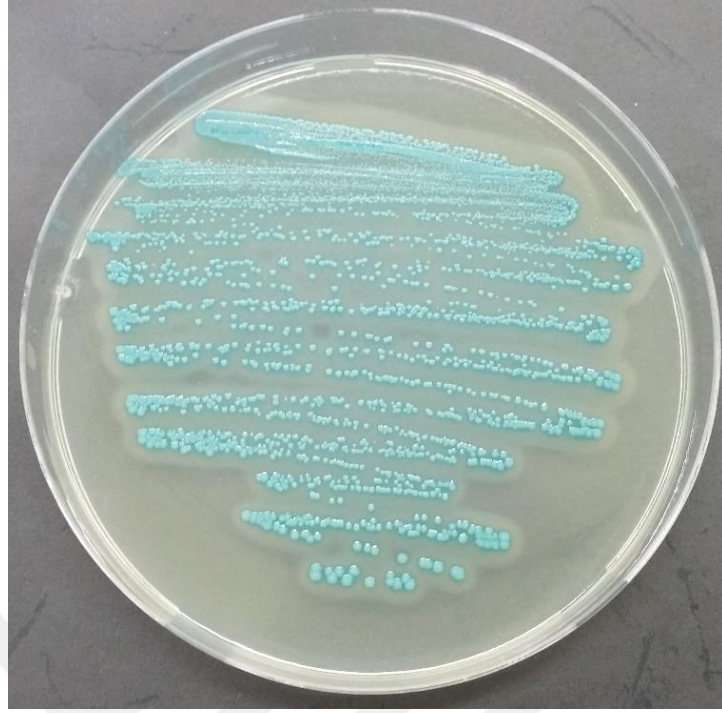
Tüketime hazır gıda örnekleri, steril kaplarda net ağırlıkları 25 g olacak şekilde tartılmış; üzerine 225 mL steril yarı kuvvette Fraser Broth ilave edilerek stomacher (AES–EasyMIX) yardımıyla tam homojenizasyonu sağlanmıştır. Bu ortamlar, 28-30 °C’de 24±2 h inkübe edilerek seçici olmayan ön zenginleştirme gerçekleştirilmiştir. Selektif zenginleştirme için, yarı kuvvette besiyeri kültüründen 0,1 mL alınarak 10 mL tam kuvvette Fraser Broth besiyerine inoküle edilmiş ve 35 °C’de 48±2 h tekrar inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda tam kuvvette Fraser Broth ortamlarından, ALOA agar ortamlarına sürme ekim yapılarak 35 °C’de 24 – 48 h inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amaçlı olarak renk değişimi dikkate alınmaksızın ön zenginleştirme kültür ortamı olan yarı kuvvette Fraser broth besiyerinden PALCAM



agara da paralelli bir şekilde sürme işlemi uygulanmış ve 35 °C’de 24-48 h inkübasyona bırakılmıştır. ALOA agar besiyerinde mavi-yeşil renkli ve etrafında opak zon oluşturan koloniler (Şekil 3.2) ile PALCAM agar besiyerinde siyah-gri renkli ortası çökük koloniler (Şekil 3.3) olası *Listeria* izolatu olarak değerlendirilmiştir. Her iki agar ortamından tipik morfolojiye sahip tek koloni seçilerek steril koşullarda TSYE broth besiyerine aktarılmış ve 35 °C’de 18-24 h inkübasyona bırakılmıştır. Gram boyama testi ile ön değerlendirmeleri yapılan izolatların TSYE agar ortamında saflık kontrolleri yapılmıştır.



Şekil 3.1 ISO 11290-1 nolu yöntem akış şeması



Şekil 3.2 ALOA agar üzerinde muhtemel *Listeria* izolatlarının koloni morfolojisi



Şekil 3.3 PALCAM agar üzerinde muhtemel *Listeria* izolatlarının koloni morfolojisi

## 3.2.2 Morfolojik ve biyokimyasal analizler

### 3.2.2.1 Gram boyama

Gram boyama, Temiz (2000) tarafından önerilen yöntemle göre uygulanmıştır. Uçları yuvarlak, çubuk veya kokobasil morfolojisine sahip Gr (+) izolatlar, muhtemel *Listeria* izolatları olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.2 Katalaz testi

TSYE agar besiyerinde 35 °C'de 18-24 h inkübe edilerek gelişimi sağlanan kolonilerden, lam üzerine tek bir koloni aktarılmıştır. Koloninin üzerine kaplayacak şekilde birkaç damla % 3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) çözeltisi damlatılarak, gaz çıkışı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Kabarcıkların görülmesi halinde test pozitif olarak değerlendirilmiştir (Temiz 2000). *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşu, katalaz testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

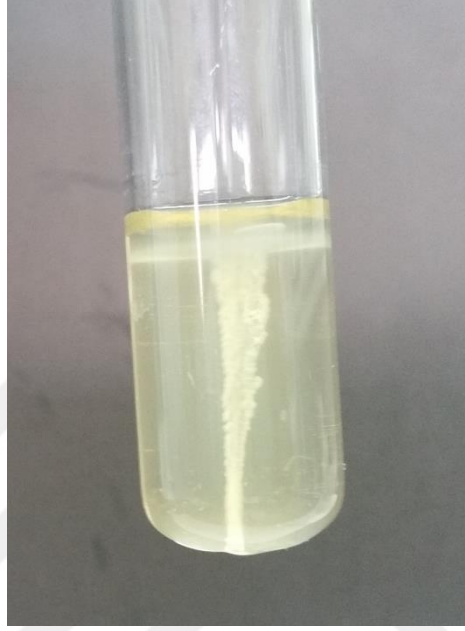
### 3.2.2.3 Oksidaz testi

TSYE agar besiyerinde 35 °C'de 18 h geliştirilen kolonilerden steril öze yardımıyla bir koloni seçilmiş ve oksidaz kitindeki (Bactident® Oxidase) test çubuklarının üzerine inoküle edilmiştir. 20-60 s içerisinde test çubuklarında renk değişiminin gözlenmemesi negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşu, referans bakteri olarak kullanılmıştır.

### 3.2.2.4 Hareketlilik testi

TSYE agar ortamlarında 35 °C'de 18 h geliştirilen kolonilerden bir tanesi alınmış, yarı katı SIM besiyerine iğne öze yardımıyla dik olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır.

28 °C'de 48 h'lik bir inkübasyon süresinin sonunda, besiyeri yüzeyine yakın bir bölgede şemsiye şeklindeki görüntü oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4). Çalışmada referans bakteri olarak *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 kullanılmıştır.



Şekil 3.4 SIM besiyerinde hareketli *Listeria* izolatlarının şemsiye görüntüsü oluşturması

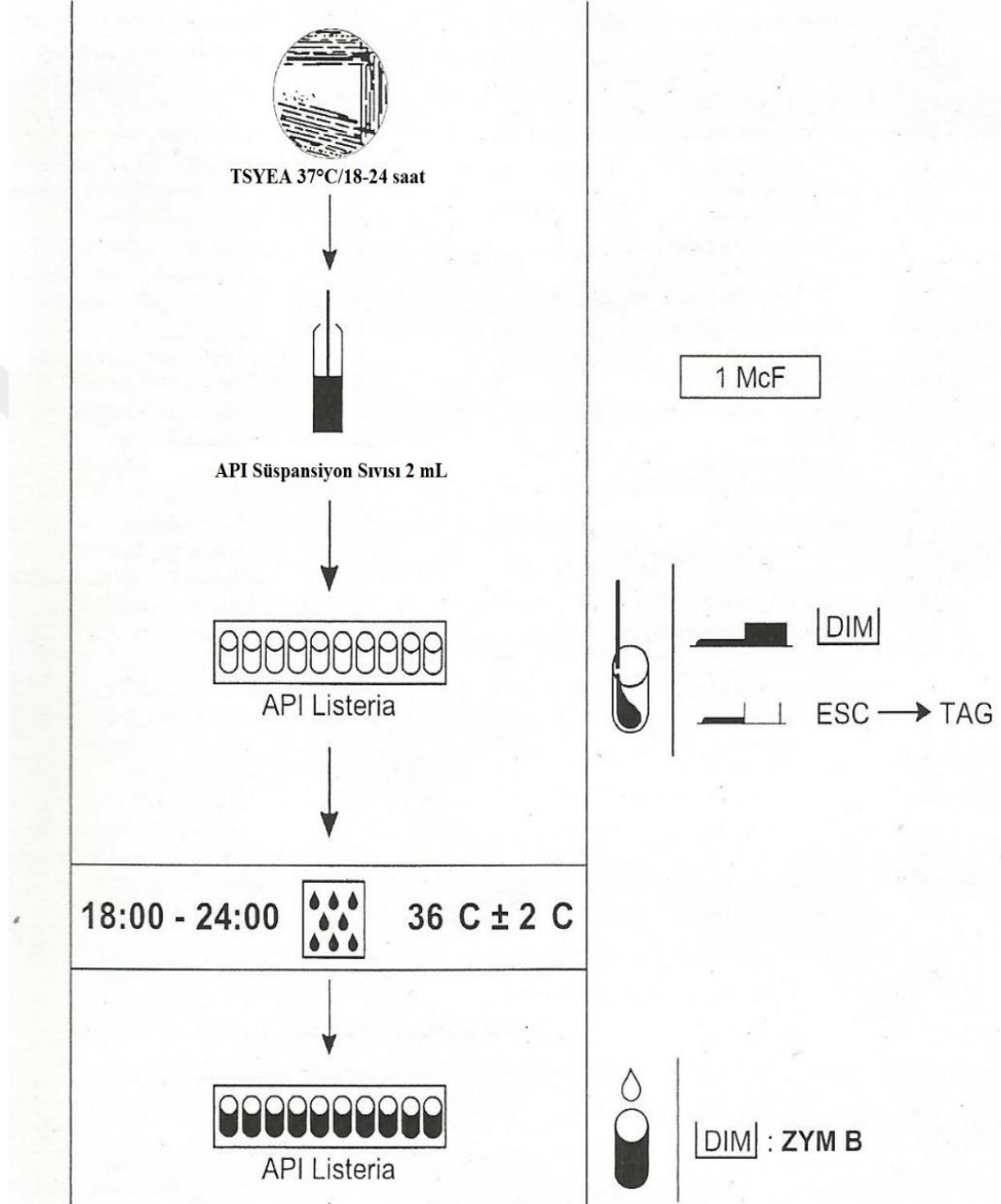
### **3.2.2.5 *Listeria* izolatlarının stok kültürlerinin hazırlanması**

Tez çalışması kapsamında Gr (+), katalaz (+), oksidaz (-) ve hareketlilik (+) olan izolatlar, muhtemel *Listeria* spp. olarak değerlendirilmiş ve Bölüm 3.1.4'te anlatıldığı üzere stok kültürleri hazırlanmıştır.

### **3.2.2.6 API®*Listeria* testi**

Gr (+), katalaz (+), oksidaz (-) ve hareketli olarak belirlenen izolatların, API®*Listeria* (bioMérieux, Inc., France) biyokimyasal test kitleri ile tür düzeyinde tanımlaması yapılmıştır (Şekil 3.5). API sistemindeki biyokimyasal testler, inkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda gözlemlenen renk değişimlerine göre pozitif (+), negatif (-) veya

şüpheli (?) olarak kaydedilmiştir. Apiweb Identification Software Database (V8.1) kullanılarak, izolatların tür düzeyinde tanımlanması yapılmıştır (Biomerieux 2004).



Şekil 3.5 API® *Listeria* kiti kullanım protokolü (Biomerieux 2004)

### 3.2.3 *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi ile moleküler düzeyde tanımlamaları

Tüketime hazır gıdalardan izole edilen olası *Listeria* spp. izolatların moleküler düzeyde tanımlanması, 16S rRNA dizi analizine göre yapılmıştır. Moleküler tanımlama; genomik DNA izolasyonu, spesifik ileri ve geri primerler kullanılarak 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması, baz dizilerinin belirlenmesi ve elde edilen bulguların NCBI veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz sıraları ile karşılaştırılması esasına dayanmaktadır.

#### 3.2.3.1 Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için, ticari olarak temin edilen GeneJET Genomik DNA Purifikasyon Kiti kullanılmıştır. Test kiti; lizis solüsyonu, proteinaz K, RNaz A, yıkama çözeltisi I, II ve Elüsyon solüsyonu içermektedir. Bu amaçla TSYE broth ortamında 37 °C’de 18 h geliştirilen bakteri kültürleri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış, 5000 rcf’de 10 dk. santrifüj edilerek üst sıvı ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan pellet 180 µL gram pozitif bakteriler için hazırlanmış olan Liziz Tampon içinde çözülerek 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda 200 µL Lizis solüsyonu ve 20 µL proteinaz K eklenen ortamların vorteks yardımıyla karışması sağlanmıştır. Hücrelerin tamamen parçalanmasını sağlamak amacıyla elde edilen çözelti 56 °C’ye ayarlı sıcak su banyosunda ara sıra karıştırmak suretiyle yaklaşık 30 dk inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda 20 µL RNaz A çözeltisinden ilave edilerek tekrar karıştırılmış ve oda sıcaklığı koşullarında 10 dk bekletilmiştir. Çözeltiye % 50’lik etanolden 400 µL aktararak ortamın tamamen karışması sağlanmıştır. Elde edilen lizat, kit içerisinde bulunan kolonlara aktararak 6000 rcf’de 1 dk süreyle santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken kısım dökülmüştür. Kolona sırasıyla 500 µL yıkama çözeltisi I ve II aktarılmış; 8000 rcf’de 3 dk ve en yüksek hızda 1 dk süreyle uygulanan santrifüj işlemleri ile de çözeltilerin kolondan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son aşamada kolon steril ependorf tüplerine yerleştirilmiş, üzerlerine elüsyon solüsyonundan 100 µL aktararak oda sıcaklığı koşullarında 2 dk bekletilmiştir. 8000 rcf’de 1 dk santrifüj

işlemi ile genomik DNA'nın steril ependorf tüplerinde toplanması sağlanmıştır. İzole edilen DNA, daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **Liziz Tampon**

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tris-Hidroklorür | 0,32 g |
| EDTA             | 0,08 g |
| Triton X 100     | 1,2 mL |
| Destile su       | 100 mL |

(pH: 8,0; kullanımdan hemen önce 20 mg/mL lizozim eklenmiştir)

### **Lizozim**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Lizozim           | 1 g   |
| Steril destile su | 10 mL |

Steril destile su ve lizozim tamamen karıştırılmış ve 45µm'lik steril membran filtre ile filtrasyon işlemi uygulanmıştır.

### **3.2.3.2 Toplam genomik DNA örneklerinin jel elektroforez yöntemiyle görüntülenmesi**

Genomik DNA örneklerinin elektroforezi % 1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır. Jelin hazırlanması amacıyla 1 g agaroz, 100 mL 1X Tris-Asetat elektroforez tamponu (TEB) içine aktarılmış; mikrodalga fırın yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanmıştır. 45-50 °C'ye kadar soğuması beklenen ortam daha sonra elektroforez plakasına dökülmüş ve akışkan haldeki jel içine tarak yerleştirilmiştir. Ortamın tamamen polimerize olması için 30-45 dk beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tankına yerleştirilerek jelin üzerini tamamen kapatacak hacimde TBE tampon ile tank doldurulmuş ve jelin zedelenmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdaki alınmıştır. Agaroz jel üzerindeki ilk kuyucuğa mikropipet yardımıyla 2µL 1kb DNA ladder marker yüklenmiş, devamındaki kuyucuklara ise 10µL DNA örneği ile 2µL 6X DNA yükleme boyası karışımı dağıtılmıştır. Elektroforez, 80 V elektrik akımında 45-60 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Marker boyanın jel sistemini terk etmesinden sonra elektrik akımı kesilmiş ve ortamdaki alınan jeller, 0,2 µg/mL etidyum bromür içeren TBE tampon içinde 60 dk bekletilerek

DNA bantlarının boyanması sağlanmıştır (Macrina vd. 1982). 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında translüminatör kullanılarak incelenen jeller Kodak Gel Logic 200 Imaging System kullanılarak fotoğraflanmıştır. İzole edilen DNA'nın yoğunluğu ve saflığı ayrıca NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) kullanılarak da belirlenmiştir.

#### **DNA Ladder Marker**

|                       |      |
|-----------------------|------|
| DNA ladder            | 1 µL |
| 6X DNA yükleme boyası | 1 µL |
| Deiyonize su          | 4 µL |

#### **Tris-Asetat Tamponu (1X) (TEB)**

|               |           |
|---------------|-----------|
| Tris          | 4,84 g    |
| Sodyum Asetat | 4,08 g    |
| EDTA          | 0,37 g    |
| Destile Su    | 1000 mL   |
| pH            | 8,0 ±0,02 |

#### **3.2.3.3 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması**

*Listeria* suşlarında 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir amplifikasyonu (PZR) için Techne TC-512 Thermal Cycler (England) cihazı kullanılmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılmasında 16S ileri (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT -3') ve 16S geri (3'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -5') evrensel primerleri kullanılmıştır (Beasley ve Saris 2004). Bu amaçla aşağıda detayları açıklanan deney protokolü takip edilmiştir. Toplam 50 µL hacimde hazırlanan PZR karışımı, 0,2 mL'lik PZR tüplerine aktarılmıştır (Çizelge 3. 1). PZR tüpleri cihaza yerleştirilerek, bir çevrimi 95 °C'de 2 dk (denatürasyon), 95 °C'de 45 s (çift zincirin açılması), 55 °C'de 45 s (primerlerin bağlanması), 72 °C'de 2 dk (zincir uzaması) ve 72 °C'de 7 dk (son uzaması) ile



tanımlanan, toplam 35 çevrimlik PZR protokolü uygulanmıştır (Blaiotta vd. 2002). Elde edilen PZR ürünlerinin saflaştırılmasında GeneJET PZR Purifikasyon Kiti kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan karışım

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Moleküler destile su             | 34,75 µL |
| PZR tamponu                      | 5µL      |
| dNTP (2 mM)                      | 1 µL     |
| 16S ileri primer                 | 1µL      |
| 16S geri primer                  | 1 µL     |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)        | 4 µL     |
| Taq DNA polimeraz enzimi (5U/mL) | 0,25 µL  |
| Genomik DNA                      | 3 µL     |
| <b>TOPLAM</b>                    | 50 µL    |

### 3.2.4 *Listeria monocytogenes* suşlarında *hlyA* gen bölgesi varlığının araştırılması

16S rRNA dizi analizleri sonucunda *L. monocytogenes* olarak tanımlanan suşlarda, patojeniteden sorumlu *hlyA* gen bölgesi varlığı araştırılmıştır.

#### 3.2.4.1 *Listeria monocytogenes* suşlarında *hlyA* gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması

*L. monocytogenes* suşlarında 456 bç büyüklüğündeki *hlyA* gen bölgesinin çoğaltılması için, 5'- GCA GTT GCA AGC GCT TGG AGT GAA-3' ileri ve 5'- GCA ACG TAT CCT CCA GAG TGA TCG -3' geri primeri kullanılmıştır (Paziak-Domanska vd. 1999). Blaiotta vd. (2002) tarafından önerilen PZR koşulları modifiye edilerek, aşağıda detayları açıklanan deney protokolü takip edilmiştir. Toplam 50 µL hacimde hazırlanan PZR karışımı, 0,2 mL'lik PZR tüplerine aktarılmıştır (Çizelge 3.1). Bu bağlamda 95 °C'de 2 dk (denatürasyon), 95 °C'de 45 s (çift zincirin açılması), 64 °C'de 45 s (primer

bağlanması), 72 °C'de 2 dk (zincir uzaması) ve 72 °C'de 7 dk (son uzama) olmak üzere toplam 35 çevrimlik PZR protokolü uygulanmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin saflaştırılması için GeneJET PZR Purifikasyon Kiti kullanılmıştır.

### **3.2.5 16S rRNA ve *hlyA* gen bölgelerinin büyüklüklerinin belirlenmesi**

Pürifiye edilmiş 16S rRNA bölgesine ait PZR fragmentlerinden 5 µL alınarak 2 µL 6X DNA yükleme boyası ile karıştırılmıştır. Örnekler % 1 oranında agaroz içeren jellerde 80V elektrik akımında 45 – 60 dk süreyle koşturulmuştur. Fragmentlerin büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla 1 kb DNA marker kullanılmıştır. Elektroforez işlemi ve jel görüntülerinin alınması işlemi Bölüm 3.2.3.2' de belirtildiği gibi uygulanmıştır. Aynı işlem *hlyA* gen bölgesi içinde tekrarlanmıştır.

### **3.2.6 PZR ürünlerinin dizilenmesi ve değerlendirilmesi**

16S rRNA ve *hlyA* gen bölgelerine ait PZR ürünlerinin iki yönlü DNA dizi analizi hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir (MedSanTek/İstanbul). Dizi analiz sonuçları BLAST (Basic Local Alingment Search Tool/ 'http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/web') programı kullanılarak NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında *Listeria* spp. için bulunan diziler ile benzerliği karşılaştırılarak yapılmıştır. Aranılan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği benzerlik yüzdesi ile belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Tüketime Hazır Gıdalardan *Listeria spp.*'nin İzolasyonu

Tez çalışması kapsamında Ankara'da 20 Ocak 2016 – 20 Aralık 2016 tarihleri arasında ve farklı satış yerlerinden temin edilen, çeşitli çiğ ve işlem görmüş tüketime hazır gıda örnekleri kullanılmıştır. *Listeria spp.* varlığı bakımından toplam 134 örneğin taraması, ISO 11290-1 protokolü doğrultusunda yapılmıştır (Bkz. Şekil 3.1).

*L. monocytogenes*'in belirlenmesi için geçerli olan referans metotlar; ISO, IDF, FDA ve USDA tarafından önerilmektedir. Bu metotlar arasındaki en önemli farkı ise, farklı selektif zenginleştirme sıvı besiyerleri ve farklı ön zenginleştirme işlemlerini içermesidir. ISO tarafından önerilen yöntem, hem iki aşamalı zenginleştirme basamağı içermesi ve hem de daha fazla sayıda pozitif sonuç alınması bakımından, diğer yöntemlere kıyasla daha fazla oranda tercih edilmektedir (Koçan 2007, Tuğrulelçi 2011, Sant'Ana vd. 2012, Jamali vd. 2013, Kotzekidou 2013, Momtaz ve Yadollahi 2013, Yıldırım 2013, Abdellrazeq vd. 2014, Modzelewska-Kapitula ve Maj-Sobatka 2014, Garedew vd. 2015, Stephan vd. 2015, Barre vd. 2016, Coroneo vd. 2016, D'Ostuni vd. 2016, Mohamed vd. 2016). Tez çalışması kapsamında da, ISO tarafından önerilen ISO 11290-1 protokolü takip edilmiştir.

Çizelge 4.1'de tez çalışması kapsamında *Listeria spp.* varlığı bakımından taraması yapılan 23 farklı tüketime hazır gıda örneği yer almaktadır.

Çizelge 4.1 Tez çalışmasında kullanılan tüketime hazır gıda örnekleri

| No | Gıda             | Adet |
|----|------------------|------|
| 1  | Acılı ezme       | 6    |
| 2  | Arnavur ciğeri   | 23   |
| 3  | Çiğ köfte        | 3    |
| 4  | Et döner         | 1    |
| 5  | Et Sote          | 1    |
| 6  | Haydari          | 1    |
| 7  | Hazır köfte      | 2    |
| 8  | İtalyan salatası | 3    |
| 9  | Kokoreç          | 10   |
| 10 | Köfte ekmek      | 17   |
| 11 | Lahana dolması   | 2    |
| 12 | Mercimek köftesi | 4    |

| No | Gıda            | Adet |
|----|-----------------|------|
| 13 | Mevsim Salata   | 1    |
| 14 | Midye dolma     | 5    |
| 15 | Piliç burger    | 2    |
| 16 | Rus salatası    | 25   |
| 17 | Salam           | 3    |
| 18 | Şinitzel        | 2    |
| 19 | Sosisli Sandviç | 1    |
| 20 | Şakşuka         | 4    |
| 21 | Tantuni         | 2    |
| 22 | Tavuk döner     | 15   |
| 23 | Tavuklu salata  | 1    |

ISO 11290-1 protokolü gereğince kullanılan PALCAM agar besiyerinde siyah-gri renkli ortası çökük koloniler (Bkz. Şekil 3.1) ile ALOA agar besiyerinde mavi-yeşil renkli ve etrafında opak zon oluşturan koloniler (Bkz. Şekil 3.2) olası *Listeria* spp. izolatı olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Tüketime hazır gıdalardan izole edilen *Listeria* izolatları

| No | Bakteri Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|----|--------------|------------------|-------------------|--|
| 1  | L1           | 20.01.2016       | Tavuk Döner       | -  |
| 2  | L2           | 20.01.2016       | Midye Dolma       | -  |
| 3  | L3           | 21.01.2016       | Kokoreç           | -  |
| 4  | L4           | 21.01.2016       | Kokoreç           | -  |
| 5  | L5           | 28.01.2016       | Mevsim Salata     | -  |
| 6  | L6           | 28.01.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 7  | L7           | 28.01.2016       | Et Döner          | -  |
| 8  | L8           | 28.01.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 9  | L9           | 28.01.2016       | Tavuk Döner       | -  |
| 10 | L10          | 28.01.2016       | Et Sote           | +  |
| 11 | L11          | 02.02.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 12 | L12          | 02.02.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 13 | L13          | 02.02.2016       | Lahana Sarması    | -  |
| 14 | L14          | 02.02.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 15 | L15          | 02.02.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 16 | L16          | 18.02.2016       | Kokoreç           | -  |
| 17 | L17          | 18.02.2016       | Kokoreç           | -  |
| 18 | L18          | 18.02.2016       | Kokoreç           | -  |
| 19 | L19          | 18.02.2016       | Kokoreç           | +  |
| 20 | L20          | 26.02.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 21 | L21          | 27.02.2016       | Midye Dolma       | -  |
| 22 | L22          | 26.02.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 23 | L23          | 26.02.2016       | Tavuk Döner       | -  |
| 24 | L24          | 07.03.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 25 | L25          | 07.03.2016       | Acılı Ezme        | -  |
| 26 | L26          | 07.03.2016       | Haydari           | -  |
| 27 | L27          | 07.03.2016       | İtalyan Salatası  | -  |
| 28 | L28          | 28.03.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 29 | L29          | 28.03.2016       | Köfte Ekmek       | +  |

Çizelge 4.2 Tüketime hazır gıdalardan izole edilen *Listeria* izolatları (devam)

| No | Örnek Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|----|------------|------------------|-------------------|--|
| 30 | L30        | 28.03.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 31 | L31        | 28.03.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 32 | L32        | 01.04.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 33 | L33        | 01.04.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 34 | L34        | 01.04.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 35 | L35        | 01.04.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 36 | L36        | 01.04.2016       | Rus Salatası      | +  |
| 37 | L37        | 11.04.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 38 | L38        | 11.04.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 39 | L39        | 11.04.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 40 | L40        | 11.04.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 41 | L41        | 11.04.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 42 | L42        | 28.04.2016       | Tantuni           | -  |
| 43 | L43        | 28.04.2016       | Tantuni           | -  |
| 44 | L44        | 28.04.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 45 | L45        | 28.04.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 46 | L46        | 25.05.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 47 | L47        | 25.05.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 48 | L48        | 25.05.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 49 | L49        | 25.05.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 50 | L50        | 25.05.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 51 | L51        | 01.06.2016       | Köfte Ekmek       | +  |
| 52 | L52        | 01.06.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 53 | L53        | 01.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 54 | L54        | 01.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 55 | L55        | 01.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 56 | L56        | 14.06.2016       | Rus Salatası      | +  |
| 57 | L57        | 14.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 58 | L58        | 14.06.2016       | Şakşuka           | -  |

Çizelge 4.2 Tüketime hazır gıdalardan izole edilen *Listeria* izolatları (devam)

| No | Örnek Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|----|------------|------------------|-------------------|--|
| 59 | L59        | 14.06.2016       | Tavuk Salatası    | -  |
| 60 | L60        | 14.06.2016       | Sosisli Sandviç   | -  |
| 61 | L61        | 16.06.2016       | Şakşuka           | -  |
| 62 | L62        | 16.06.2016       | Şakşuka           | -  |
| 63 | L63        | 16.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 64 | L64        | 16.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 65 | L65        | 16.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 66 | L66        | 16.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 67 | L67        | 16.06.2016       | Şakşuka           | -  |
| 68 | L68        | 21.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 69 | L69        | 21.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 70 | L70        | 21.06.2016       | Çiğ Köfte         | -  |
| 71 | L71        | 21.06.2016       | Lahana Dolması    | -  |
| 72 | L72        | 21.06.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 73 | L73        | 23.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 74 | L74        | 23.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 75 | L75        | 23.06.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 76 | L76        | 23.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 77 | L77        | 23.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 78 | L78        | 23.06.2016       | Acılı Ezme        | -  |
| 79 | L79        | 23.06.2016       | Acılı Ezme        | -  |
| 80 | L80        | 23.06.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 81 | L81        | 23.06.2016       | İtalyan Salatası  | +  |
| 82 | L82        | 23.06.2016       | İtalyan Salatası  | +  |
| 83 | L83        | 19.07.2016       | Çiğ Köfte         | -  |
| 84 | L84        | 19.07.2016       | Çiğ Köfte         | -  |
| 85 | L85        | 19.07.2016       | Arnavut Ciğeri    | +  |
| 86 | L86        | 19.07.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 87 | L87        | 21.07.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |

Çizelge 4.2 Tüketime hazır gıdalardan izole edilen *Listeria* izolatları (devam)

| No  | Örnek Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|-----|------------|------------------|-------------------|--|
| 88  | L88        | 21.07.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 89  | L89        | 21.07.2016       | Acılı Ezme        | -  |
| 90  | L90        | 21.07.2016       | Acılı Ezme        | -  |
| 91  | L91        | 04.08.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 92  | L92        | 04.08.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 93  | L93        | 04.08.2016       | Salam             | -  |
| 94  | L94        | 04.08.2016       | Salam             | -  |
| 95  | L95        | 04.08.2016       | Salam             | -  |
| 96  | L96        | 04.08.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 97  | L97        | 23.08.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 98  | L98        | 23.08.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 99  | L99        | 23.08.2016       | Arnavut Ciğeri    | -  |
| 100 | L100       | 23.08.2016       | Midye Dolma       | -  |
| 101 | L101       | 23.08.2016       | Midye Dolma       | -  |
| 102 | L102       | 16.10.2016       | Midye Dolma       | -  |
| 103 | L103       | 16.10.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 104 | L104       | 16.10.2016       | Mercimek Köftesi  | -  |
| 105 | L105       | 16.10.2016       | Mercimek Köftesi  | -  |
| 106 | L106       | 26.10.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 107 | L107       | 26.10.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 108 | L108       | 26.10.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 109 | L109       | 26.10.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 110 | L110       | 26.10.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 111 | L111       | 26.10.2016       | Acılı Ezme        | -  |
| 112 | L112       | 26.10.2016       | Mercimek Köftesi  | -  |
| 113 | L113       | 26.10.2016       | Mercimek Köftesi  | -  |
| 114 | L114       | 01.11.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 115 | L115       | 01.11.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 116 | L116       | 01.11.2016       | Rus Salatası      | -  |



Çizelge 4.2 Tüketime hazır gıdalardan izole edilen *Listeria* izolatları (devam)

| No  | Örnek Kodu | İzolasyon Tarihi | İzolasyon Kaynağı | ALOA ve PALCAM Agarda Tipik Koloni Oluşumu |
|-----|------------|------------------|-------------------|--|
| 117 | L117       | 01.11.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 118 | L118       | 03.11.2016       | Piliç Burger      | -  |
| 119 | L119       | 03.11.2016       | Piliç Burger      | -  |
| 120 | L120       | 03.11.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 121 | L121       | 03.11.2016       | Rus Salatası      | -  |
| 122 | L122       | 03.11.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 123 | L123       | 03.11.2016       | Tavuk Döner       | +  |
| 124 | L124       | 03.11.2016       | Şinitzel          | +  |
| 125 | L125       | 03.11.2016       | Şinitzel          | +  |
| 126 | L126       | 04.11.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 127 | L127       | 05.11.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 128 | L128       | 06.11.2016       | Köfte Ekmek       | -  |
| 129 | L129       | 12.11.2016       | Kokoreç           | +  |
| 130 | L130       | 15.11.2016       | Kokoreç           | +  |
| 131 | L131       | 16.11.2016       | Hazır Köfte       | +  |
| 132 | L132       | 17.11.2016       | Kokoreç           | +  |
| 133 | L133       | 20.12.2016       | Kokoreç           | +  |
| 134 | L134       | 20.12.2016       | Hazır Köfte       | +  |

ISO 11290-1 protokolü doğrultusunda *Listeria* spp. varlığı taraması yapılan toplam 134 adet tüketime hazır gıda örneğinden 44 adedinde, ALOA ve PALCAM agar ortamlarında tipik koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Bu kapsamda arnavut ciğeri, et sote, hazır köfte, İtalyan salatası, kokoreç, ekmek arası köfte, rus salatası, şinitzel ve tavuk döner muhtemel *Listeria* varlığı bakımından pozitif gıda örnekleri olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3). Ancak acılı ezme, çiğ köfte, et döner, haydari, lahana dolma, mercimek köfte, mevsim salata, midye dolma, piliç burger, salam, sosisli sandviç, şakşuka, tantuni ve tavuklu salata örnekleri ise muhtemel *Listeria* varlığı bakımından negatif gıda örnekleri olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3 Muhtemel *Listeria* izolatlarının gıda bazında dağılımı

| Gıda Örnekleri   | Toplam Örnek Sayısı | Tipik Koloni Oluşumu Gözlemlenen Örnek Sayısı | Yüzde (%)    |
|------------------|---------------------|---|--------------|
| Arnavut Ciğeri   | 23                  | 10  | 43,48        |
| Et Sote          | 1                   | 1   | 100,00       |
| Hazır Köfte      | 2                   | 2   | 100,00       |
| İtalyan Salatası | 3                   | 2   | 66,60        |
| Kokoreç          | 10                  | 5   | 50,00        |
| Köfte Ekmek      | 17                  | 8   | 47,05        |
| Rus Salatası     | 26                  | 2   | 11,54        |
| Şinitzel         | 2                   | 2   | 100,00       |
| Tavuk Döner      | 16                  | 12  | 81,25        |
| <b>TOPLAM</b>    | <b>134</b>          | <b>44</b>                                     | <b>32,84</b> |

*Listeria* spp. varlığı bakımından taraması yapılan et sote, hazır köfte ve şinitzel'de örneklerin % 100'ünde, tavuk dönerin % 81,25'inde, İtalyan salatasının % 66,60'ında, kokorecin % 50'sinde, ekmek arası köftenin % 47,05'inde, Arnavut ciğerinin % 43,48'inde ve rus salatasının % 11,54'ünde ALOA ve PALCAM agar ortamlarında tipik koloni oluşumu saptanmıştır. Toplamda ise gıda örneklerinin % 32,84'ü *Listeria* spp. varlığı bakımından şüpheli olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

Tez çalışmasının bundan sonraki aşamasında ALOA ve PALCAM agar ortamlarında tipik koloni oluşumu gözlemlenen 44 örnekten izole edilen kültür ortamlarına, morfolojik ve biyokimyasal tanımlamalar yapılmıştır. Çizelge 4.2'de verilen örnek kodları aynı zamanda bakteri kodları olarak ta kullanılmıştır.

## 4.2 *Listeria* İzolatlarının Tanımlanması

### 4.2.1 Morfolojik ve kültürel testler

ALOA ve PALCAM agar ortamlarında *Listeria* spp. varlığı bakımından tipik koloni oluşumu gözlemlenen 44 örnekten elde edilen izolata gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi ve hareketlilik testi uygulanmıştır. İncelenen 44 izolatın tamamı çubuk morfolojisine sahip Gr (+) ve oksidaz (-) olarak saptanmıştır. Ancak izolatların 39 tanesi katalaz (+) özellik gösterirken, 5 tanesi katalaz (-) özellik göstermiştir. Benzer şekilde izolatların 35 tanesi hareketlik testi için pozitif sonuç gösterirken, 9 tanesi negatif sonuç göstermiştir. Toplamda 35 örnek; Gr (+), katalaz (+), oksidaz (-) ve hareketlilik (+) olarak tanımlanmıştır. Hareketsiz ve/veya katalaz (-) olarak tanımlanan L8, L19, L22, L30, L36, L130, L131, L132 ve L134 izolatları tez çalışması kapsamı dışında bırakılmıştır (Çizelge 4.4). Muhtemel *Listeria* spp. izolatları olarak değerlendirilen 35 izolat, % 40 steril gliserol içeren TSYE broth ortamında -20 °C’de stoğa alınmıştır.

Morfolojik ve kültürel test sonuçları esas alınarak, muhtemel *Listeria* spp. izolatlarının gıda bazında dağılımları çizelge 4.5’de verilmiştir. Bu kapsamda 35 adet muhtemel *Listeria* spp. izolatından; 11 tanesi tavuk dönerden, 10 tanesi Arnavut ciğerinden, 6 tanesi ekmek arası köfteden, 2’şer tanesi İtalyan salatası, kokoreç ve şinitzelden, 1’er tanesi ise et sote ve rus salatasından izole edilmiştir. ALOA ve PALCAM agarda *Listeria* spp. varlığı bakımından tipik koloni oluşumu gözlemlenen ancak hareketlilik ve katalaz testleri sonucu negatif olarak değerlendirilen toplam 9 izolatın ise; 2 tanesi hazır köfteden, 3 tanesi kokoreçten, 2 tanesi ekmek arası köfteden, 1’er tanesi ise rus salatası ve tavuk döner örneklerinden izole edilmiştir.

Çizelge 4.4 *Listeria* izolatlarının morfolojik ve kültürel test sonuçları

| No | Bakteri Kodu | Gram Boyama | Katalaz Testi | Oksidaz Testi | Hareketlilik Testi |
|----|--------------|-------------|---------------|---------------|--------------------|
| 1  | L6           | +           | +             | -             | +                  |
| 2  | L8           | +           | +             | -             | -                  |
| 3  | L10          | +           | +             | -             | +                  |
| 4  | L19          | +           | +             | -             | -                  |
| 5  | L20          | +           | +             | -             | +                  |
| 6  | L22          | +           | +             | -             | -                  |
| 7  | L28          | +           | +             | -             | +                  |
| 8  | L29          | +           | +             | -             | +                  |
| 9  | L30          | +           | +             | -             | -                  |
| 10 | L32          | +           | +             | -             | +                  |
| 11 | L36          | +           | -             | -             | -                  |
| 12 | L37          | +           | +             | -             | +                  |
| 13 | L38          | +           | +             | -             | +                  |
| 14 | L46          | +           | +             | -             | +                  |
| 15 | L47          | +           | +             | -             | +                  |
| 16 | L48          | +           | +             | -             | +                  |
| 17 | L49          | +           | +             | -             | +                  |
| 18 | L50          | +           | +             | -             | +                  |
| 19 | L51          | +           | +             | -             | +                  |
| 20 | L53          | +           | +             | -             | +                  |
| 21 | L54          | +           | +             | -             | +                  |
| 22 | L55          | +           | +             | -             | +                  |
| 23 | L56          | +           | +             | -             | +                  |
| 24 | L72          | +           | +             | -             | +                  |
| 25 | L81          | +           | +             | -             | +                  |
| 26 | L82          | +           | +             | -             | +                  |
| 27 | L85          | +           | +             | -             | +                  |
| 28 | L91          | +           | +             | -             | +                  |
| 29 | L92          | +           | +             | -             | +                  |
| 30 | L96          | +           | +             | -             | +                  |
| 31 | L97          | +           | +             | -             | +                  |
| 32 | L106         | +           | +             | -             | +                  |

Çizelge 4.4 *Listeria* izolatlarının morfolojik ve kültürel test sonuçları (devam)

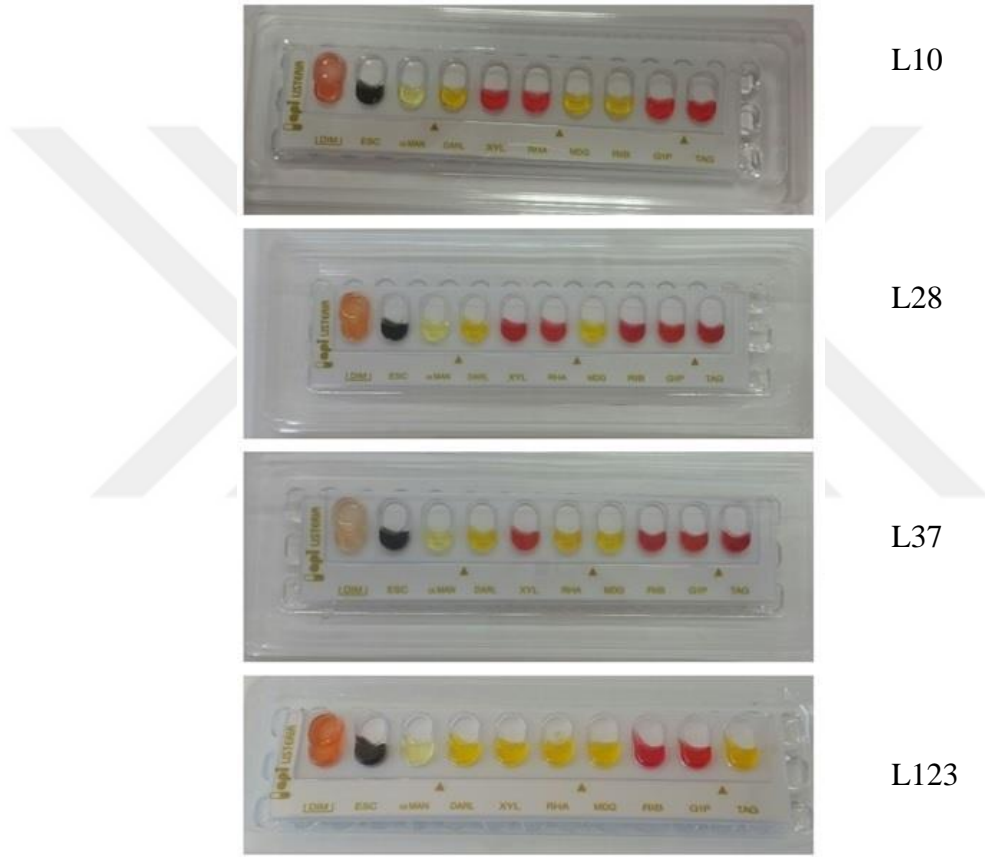
| No | Bakteri Kodu | Gram Boyama | Katalaz Testi | Oksidaz Testi | Hareketlilik Testi |
|----|--------------|-------------|---------------|---------------|--------------------|
| 33 | L107         | +           | +             | -             | +                  |
| 34 | L108         | +           | +             | -             | +                  |
| 35 | L122         | +           | +             | -             | +                  |
| 36 | L123         | +           | +             | -             | +                  |
| 37 | L124         | +           | +             | -             | +                  |
| 38 | L125         | +           | +             | -             | +                  |
| 39 | L129         | +           | +             | -             | +                  |
| 40 | L130         | +           | -             | -             | -                  |
| 41 | L131         | +           | -             | -             | -                  |
| 42 | L132         | +           | -             | -             | -                  |
| 43 | L133         | +           | +             | -             | +                  |
| 44 | L134         | +           | -             | -             | -                  |

Çizelge 4.5 Morfolojik ve kültürel testler sonucunda gıda bazında *Listeria* izolat sayısı

| Gıda Örnekleri   | Muhtemel <i>Listeria</i> spp. İzolat Sayısı |
|------------------|---|
| Arnavut Ciğeri   | 10  |
| Et Sote          | 1   |
| İtalyan Salatası | 2   |
| Kokoreç          | 2   |
| Köfte Ekmek      | 6   |
| Rus Salatası     | 1   |
| Schnitzel        | 2   |
| Tavuk Döner      | 11  |
| <b>TOPLAM</b>    | <b>35</b>                                   |

#### 4.2.2 İzolatların biyokimyasal tanımlama

Morfolojik ve kültürel testlerde *Listeria* bakımından tipik reaksiyon gösteren 35 izolatın biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve tür düzeyinde tanımlamalarının yapılması için API®*Listeria* test kitleri kullanılmıştır (Şekil 4.1, Çizelge 4.6 - 4.7).



Şekil 4.1 *Listeria* spp. izolatlarının API®*Listeria* test sonuçları

- L10 : *Listeria grayi*  
L28 : *Listeria innocua*  
L37 : *Listeria monocytogenes*  
L123 : *Listeria welshimeri*

Çizelge 4.6 *Listeria* izolatlarının biyokimyasal tanısı

| No | İzolat Kodu | DIM | ESC | $\alpha$ MAN | DARL | XYL | RHA | MDG | RIB | G1P | TAG |
|----|-------------|-----|-----|--------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1  | L6          | -   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | -   | -   | +   |
| 2  | L10         | -   | +   | +            | +    | -   | -   | +   | +   | -   | -   |
| 3  | L20         | -   | +   | -            | +    | -   | -   | -   | +   | -   | -   |
| 4  | L28         | +   | +   | +            | +    | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| 5  | L29         | -   | +   | +            | +    | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| 6  | L32         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 7  | L37         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 8  | L38         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 9  | L46         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 10 | L47         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 11 | L48         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 12 | L49         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 13 | L50         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 14 | L51         | -   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 15 | L53         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 16 | L54         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 17 | L55         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 18 | L56         | +   | +   | +            | +    | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| 19 | L72         | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 20 | L81         | +   | +   | +            | +    | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| 21 | L82         | +   | +   | +            | +    | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| 22 | L85         | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 23 | L91         | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 24 | L92         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 25 | L96         | +   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | -   | -   | -   |

Çizelge 4.6 *Listeria* izolatlarının biyokimyasal tanısı (devam)

| No | İzolat Kodu | DIM | ESC | $\alpha$ MAN | DARL | XYL | RHA | MDG | RIB | G1P | TAG |
|----|-------------|-----|-----|--------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 26 | L97         | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 27 | L106        | +   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 28 | L107        | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 29 | L108        | -   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 30 | L122        | -   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 31 | L123        | +   | +   | +            | +    | +   | +   | +   | -   | -   | +   |
| 32 | L124        | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 33 | L125        | -   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 34 | L129        | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |
| 35 | L133        | +   | +   | +            | +    | -   | +   | +   | -   | -   | -   |

DIM  
ESC  
 $\alpha$ MAN  
DARL  
XYL  
RHA  
MDG  
RIB  
G1P  
TAG

*L. innocua* ve *L. monocytogenes*'in ayrıştırılması  
Eskulin  
 $\alpha$ -Mannosidaz  
D-arabitol  
D-Ksiloz  
L-Ramnoz  
Metil- $\alpha$ D- Glukopiranosid  
D-Riboz  
Glikoz-1-fosfat  
D-Tagatoz



Çizelge 4.7 *Listeria* izolatlarının API®*Listeria* test kiti ile tür düzeyinde tanımlanması

| No | Bakteri Kodu | API® <i>Listeria</i> Test Kiti ile Tanımlanan Tür   | % ID Tanımlama Yüzdesi | T Yakınlık |
|----|--------------|---|------------------------|------------|
| 1  | L6           | <i>Listeria welshimeri</i>  | 99,0                   | 0,77       |
| 2  | L10          | <i>Listeria grayi</i>   | 99,3                   | 0,5        |
| 3  | L20          | <i>Listeria grayi</i>   | 98,5                   | 0,15       |
| 4  | L28          | <i>Listeria innocua</i>   | 98,7                   | 0,93       |
| 5  | L29          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 80,0                   | 0,62       |
| 6  | L32          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 7  | L37          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 8  | L38          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 9  | L46          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 99,9                   | 0,68       |
| 10 | L47          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 11 | L48          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 12 | L49          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 13 | L50          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 14 | L51          | <i>Listeria grayi</i><br><i>Listeria welshimeri</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>Listeria innocua</i><br><i>Listeria ivanovii</i> | -                      | -          |
| 15 | L53          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 16 | L54          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 17 | L55          | <i>Listeria monocytogenes</i>   | 98,5                   | 1,0        |
| 18 | L56          | <i>Listeria innocua</i>   | 98,7                   | 0,93       |
| 19 | L72          | <i>Listeria innocua</i>   | 99,6                   | 1,0        |
| 20 | L81          | <i>Listeria innocua</i>   | 98,7                   | 0,93       |
| 21 | L82          | <i>Listeria innocua</i>   | 98,7                   | 0,93       |
| 22 | L85          | <i>Listeria innocua</i>   | 99,6                   | 1,0        |
| 23 | L91          | <i>Listeria innocua</i>   | 99,6                   | 1,0        |

Çizelge 4.7 *Listeria* izolatlarının API®*Listeria* test kiti ile tür düzeyinde tanımlanması (devam)

| No | Bakteri Kodu | API® <i>Listeria</i> Test Kiti ile Tanımlanan Tür                                      | % ID Tanımlama Yüzdesi | T Yakınlık           |
|----|--------------|--|------------------------|----------------------|
| 24 | L92          | <i>Listeria monocytogenes</i>  | 98,5                   | 1,0                  |
| 25 | L96          | <i>Listeria welshimeri</i><br><i>Listeria innocua</i>                                  | 65,7<br>34,1           | 0,65<br>0,58         |
| 26 | L97          | <i>Listeria monocytogenes</i>  | 98,5                   | 1,0                  |
| 27 | L106         | <i>Listeria welshimeri</i><br><i>Listeria innocua</i>                                  | 65,7<br>34,1           | 0,65<br>0,58         |
| 28 | L107         | <i>Listeria innocua</i>  | 99,6                   | 1,0                  |
| 29 | L108         | <i>Listeria welshimeri</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>Listeria innocua</i> | 72,8<br>20,7<br>6,3    | 0,42<br>0,25<br>0,16 |
| 30 | L122         | <i>Listeria welshimeri</i><br><i>Listeria monocytogenes</i><br><i>Listeria innocua</i> | 72,8<br>20,7<br>6,3    | 0,42<br>0,25<br>0,16 |
| 31 | L123         | <i>Listeria welshimeri</i>   | 99,9                   | 1,0                  |
| 32 | L124         | <i>Listeria innocua</i>  | 99,6                   | 1,0                  |
| 33 | L125         | <i>Listeria monocytogenes</i>  | 98,5                   | 1,0                  |
| 34 | L129         | <i>Listeria innocua</i>  | 99,6                   | 1,0                  |
| 35 | L133         | <i>Listeria innocua</i>  | 98,7                   | 0,93                 |

Mükemmel Tanımlama : % ID  $\geq$ 99,9 T  $\geq$ 0,75

Çok İyi Tanımlama : % ID  $\geq$ 99,0 T  $\geq$  0,50

İyi Tanımlama : % ID  $\geq$ 90,0 T  $\geq$  0,25

Kabul Edilebilir Tanımlama : % ID  $\geq$  80,0 T  $\geq$  0,0

*Listeria* spp. izolatlarının tür düzeyinde API®*Listeria* test kiti ile tanımlanması sonucunda; izolatların 15'i *L. monocytogenes*, 11'i *L. innocua*, 2'si *L. welshimeri* ve 2'si ise *L. grayi* olarak tanımlanmıştır. 1 izolatın (L51) tanımlaması yapılamamış olup, 4 izolat (L96, L106, L108 ve L 122) ise tür düzeyinde doğru tanımlanamamıştır (Çizelge 4.7).

Çalışmamızla benzer şekilde, Setiani vd. (2015), 37 *Listeria* izolatının tür düzeyinde tanımlamasını API®*Listeria* test kitlerini kullanarak yapmışlardır. Araştırmacılar toplamda 4 izolatın tür düzeyinde tanımlamasını şüpheli olarak vurgulamışlardır.

API®*Listeria* test kitleri ile tür düzeyinde tanımlaması yapılan *Listeria* spp. izolatlarının gıdalar bazında dağılımı ise çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Tavuk dönerinden izole edilen 11 adet izolatın; 3'ü *L. innocua*, 2'si *L. monocytogenes* ve 2'si ise *L. welshimeri* olarak tanımlanırken, 4 izolatın tanımlaması net olarak yapılamamıştır. Arnavut ciğerinden izole edilen toplam 10 adet izolatın; 8'i *L. monocytogenes*, 1'i *L. grayi* ve 1'i ise *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. Ekmek arası köfteden izole edilen 6 adet izolatın; 4'ü *L. monocytogenes* ve 1'i *L. innocua* olarak tanımlanırken, 1'inin ise tanımlaması yapılamamıştır. İtalyan salatası ve kokoreçten izole edilen 2'şer adet izolatlar ise *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. Şinitzelden izole edilen 2 adet izolatın; 1'i *L. monocytogenes* ve 1'i ise *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. Et soteden izole edilen 1 adet izolat *L. grayi* ve rus salatasından izole edilen 1 adet izolat ise *L. innocua* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.8 API®*Listeria* test kiti ile tür düzeyinde tanımlaması yapılan *Listeria* izolatlarının gıda örnekleri bazında dağılımı

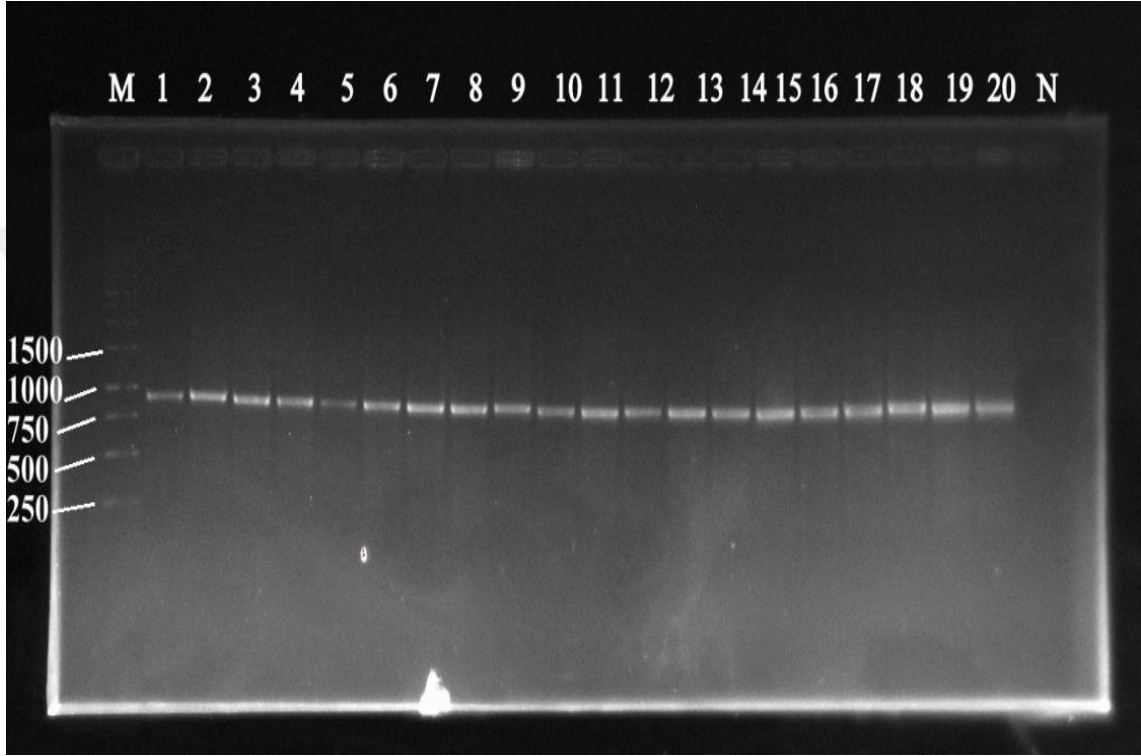
| Tüketime Hazır Gıda Örnekleri | Tanımlanamayan | <i>L. monocytogenes</i>                              | <i>L. welshimeri</i> | <i>L. grayi</i> | <i>L. innocua</i>  | <i>L. welshimeri</i> /<br><i>L. innocua</i> | <i>L. welshimeri</i> /<br><i>L. innocua</i> /<br><i>L. monocytogenes</i> | TOPLAM    |
|-------------------------------|----------------|--|----------------------|-----------------|--------------------|---|--|-----------|
| Arnavut Ciğeri                | -              | L32<br>L37<br>L38<br>L46<br>L48<br>L53<br>L54<br>L55 | -                    | L20             | L85                | -   | -  | 10        |
| Et Sote                       | -              | -  | -                    | L10             | -                  | -   | -  | 1         |
| İtalyan Salatası              | -              | -  | -                    | -               | L81<br>L82         | -   | -  | 2         |
| Kokoreç                       | -              | -  | -                    | -               | L129<br>L133       | -   | -  | 2         |
| Köfte Ekmek                   | L51            | L29<br>L47<br>L49<br>L50                             | -                    | -               | L28                | -   | -  | 6         |
| Rus Salatası                  | -              | -  | -                    | -               | L56                | -   | -  | 1         |
| Şinitzel                      | -              | L125   | -                    | -               | L124               | -   | -  | 2         |
| Tavuk Döner                   | -              | L92<br>L97   | L6<br>L123           | -               | L72<br>L91<br>L107 | L96<br>L106                                 | L108<br>L122   | 11        |
| <b>TOPLAM</b>                 | <b>1</b>       | <b>15</b>  | <b>2</b>             | <b>2</b>        | <b>11</b>          | <b>2</b>                                    | <b>2</b>   | <b>35</b> |

#### 4.2.3 *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi ile moleküler düzeyde tanımlanması

*Listeria* spp. suşlarının moleküler düzeyde tanımlanmasında 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. 16S rRNA bölgesinin çoğaltılmasında universal primerler kullanılmış olup, jel fotoğraflarının çekiminde jel görüntüleme sisteminden (Kodak Gel Logic 200 Imaging System) yararlanılmıştır (Şekil 4.2). PZR ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin çift yönlü DNA dizi analizi sonuçları, BLAST programı kullanılarak

NCBI veri tabanında bulunan 16S rRNA dizileriyle benzerlik oranları karşılaştırılmıştır. (Çizelge 4.9).

Denemeye alınan toplam 35 *Listeria* spp. izolatının tümü 900 bp'lik tek bant vermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *Listeria* spp. suşlarının PZR ile çoğaltılan 16S rRNA fragmentleri

M O'Gene Ruler DNA marker (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

1-20 : L6, L10, L20, L28, L29, L32, L37, L38, L46, L47, L48, L49, L50, L51, L53, L54, L55, L56, L72, L81

N : Negatif Kontrol

Çizelge 4.9 *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tür düzeyinde tanısı

| Bakteri Kodu | İleri (F)               | Benzerlik Oranı (%) | Geri ( R)               | Benzerlik Oranı (%) | 16S rRNA Dizisine Göre Yapılan Tanı |
|--------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| L6           | <i>L. welschimeri</i>   | 99                  | <i>L. welschimeri</i>   | 100                 | <i>L. welschimeri</i>               |
| L10          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L20          | <i>L. grayi</i>         | 99                  | <i>L. grayi</i>         | 99                  | <i>L. grayi</i>                     |
| L28          | <i>L. innocua</i>       | 92                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L29          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L32          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L37          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 100                 | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L38          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L46          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L47          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L48          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L49          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L50          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L51          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L53          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L54          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L55          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L56          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L72          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L81          | <i>L. innocua</i>       | 97                  | <i>L. innocua</i>       | 97                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L82          | <i>L. innocua</i>       | 100                 | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L85          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L91          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L92          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L96          | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L97          | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L106         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |

Çizelge 4.9 *Listeria* spp. suşlarının 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tür düzeyinde tanısı (devam)

| Bakteri Kodu | İleri (F)               | Benzerlik Oranı (%) | Geri (R)                | Benzerlik Oranı (%) | 16S rRNA Dizisine Göre Yapılan Tanı |
|--------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| L107         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L108         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L122         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L123         | <i>L. welschimeri</i>   | 99                  | <i>L. welschimeri</i>   | 99                  | <i>L. welschimeri</i>               |
| L124         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L125         | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i> | 99                  | <i>L. monocytogenes</i>             |
| L129         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |
| L133         | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>       | 99                  | <i>L. innocua</i>                   |

16S rRNA dizi analizinden elde edilen veriler dikkate alındığında, 35 *Listeria* spp. suşunun 18'i *L. monocytogenes* (L29, L32, L37, L38, L46, L47, L48, L49, L50, L51, L53, L54, L55, L92, L97, L108, L122 ve L125), 14'ü *L. innocua* (L10, L28, L56, L72, L81, L82, L85, L91, L96, L106, L107, L124, L129 ve L133), 2'si *L. welschimeri* (L6 ve L123) ve 1'i ise *L. grayi* (L20) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.9).

Elde edilen veriler doğrultusunda *L. monocytogenes* varlığı en yüksek belirlenen gıdalar; Arnavut ciğeri ((L32, L37, L38, L46, L48, L53, L54, L55), köfte ekmek (L29, L47, L49, L50, L51) ve tavuk döner (L92, L97, L108, L122) olarak belirlenmiştir. Ayrıca 2 şinitzel örneğinden izole edilen 1 suşta (L125) *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Et sote (L10), İtalyan salatası (L81, L82), kokoreç (L129, L133) ve rus salatasından (L56) izole edilen suşlarda *L. innocua* olarak moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Arnavut ciğerinden izole edilen diğer suşlardan biri (L20) *L. grayi* ve diğeri ise (L85) *L. innocua* olarak isimlendirilmiştir. Aynı şekilde tavuk dönerden izole edilmiş olan 2 suş (L6, L123) *L. welschimeri* ve 5 suş (L72, L91, L96, L106, L107) ise *L. innocua* olarak adlandırılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 16S rRNA dizi analiz yöntemiyle tanımlanan türlerin gıda örneği bazında dağılımı

| <b>Tüketime Hazır Gıda Örnekleri</b> | <i>L. monocytogenes</i>                              | <i>L. welshimeri</i> | <i>L. grayi</i> | <i>L. innocua</i>                 | <b>TOPLAM</b> |
|--------------------------------------|--|----------------------|-----------------|-----------------------------------|---------------|
| Arnavut Ciğeri                       | L32<br>L37<br>L38<br>L46<br>L48<br>L53<br>L54<br>L55 |                      | L20             | L85                               | <b>10</b>     |
| Et Sote                              |  |                      |                 | L10                               | <b>1</b>      |
| İtalyan Salatası                     |  |                      |                 | L81<br>L82                        | <b>2</b>      |
| Kokoreç                              |  |                      |                 | L129<br>L133                      | <b>2</b>      |
| Köfte Ekmek                          | L29<br>L47<br>L49<br>L50<br>L51                      |                      |                 | L28                               | <b>6</b>      |
| Rus Salatası                         |  |                      |                 | L56                               | <b>1</b>      |
| Schnitzel                            | L125   |                      |                 | L124                              | <b>2</b>      |
| Tavuk Döner                          | L92<br>L97<br>L108<br>L122                           | L6<br>L123           |                 | L72<br>L91<br>L96<br>L106<br>L107 | <b>11</b>     |
| <b>TOPLAM</b>                        | <b>18</b>  | <b>2</b>             | <b>1</b>        | <b>14</b>                         | <b>35</b>     |

Tez çalışması kapsamında, *Listeria* varlığı bakımından taranan 23 Arnavut ciğerinden 8'inde, 17 köfte ekmekten 5'inde, 15 tavuk dönerden 4'ünde ve 2 şinitzelden 1'inde *L. monocytogenes* varlığının saptanması halk sağlığı açısından endişe verici bir durumdur.

*L. monocytogenes*, çevreye geniş ölçüde yayılmış, buzdolabı sıcaklığında, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını sürdürebilen, halk sağlığı açısından riskli bir patojendir (Koçan ve Halkman 2010,



Jamali vd. 2013, Çetinkaya vd. 2014, Lerasle vd. 2014, Phraephaisarn vd. 2017). Büyük kentlerde çalışan nüfusun artmasıyla birlikte tüketicinin talebi, kolay ve hızlı hazırlanabilir tüketime hazır gıdalara yönelmiştir (Güner vd. 2012, Brasileiro vd. 2016). Gıda satış noktalarında satışa sunulan ve hemen tüketilebilecek hazır yiyecekler/gıdalar tüketime hazır gıdalar olarak adlandırılmakta ve bu gıdalar çiğ ya da pişmiş, sıcak veya soğuk, ya da yeniden ısıtma gibi bir ısıl işlem uygulanmadan tüketilebilir halde bulunmaktadır (Şenses Ergül vd. 2015). Gıda hazırlama ve depolama aşamalarında hijyenik kurallara uyulmadığı takdirde, bu tarz gıdaların mikrobiyolojik yönden güvenilirliği kaybolmaktadır. *L. monocytogenes*, gelişmiş ülkelerde nadiren gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakla birlikte enfekte olan kişilerin % 20-30'u bu nedenle ölmektedir (Abdellrazeq vd. 2014, Büyükyörük vd. 2014). Bu oran diğer gıda kaynaklı hastalıklara göre yüksek bir rakamdır (Stephan vd. 2015).

Tez çalışması kapsamında temin edilen çiğ ve işlem görmüş tüketime hazır gıdalar arasında *L. monocytogenes* varlığı bakımından en riskli gıda olarak Arnavut ciğeri belirlenmiştir. Ekmek arası köfte ve tavuk dönerde riskli gıdalar arasında yer almaktadır. 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı resmi gazete yayımlanan “Gıda Güvenilirliği Kriterleri” esasınca, 25 gr tüketime hazır gıda örneğinde *L. monocytogenes* bulunmasına izin verilmemektedir. Bu kapsamda, tez çalışmasında tanımlanan *L. monocytogenes* sayısının fazla olması (18/35), Ankara ilinde satışa sunulan tüketime hazır gıdaların hijyenik açıdan güvenilir olmadığının ve bu gıdaları üreten ve/veya satan işletmelerin de aynı şekilde üretim ve depolama sırasında hijyenik kurallara uymadığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Akkaya vd. (2006), Afyonkarahisar’da toplam 75 adet kremalı pastada *Listeria* türlerinin varlığını araştırmışlar ve kremalı pastaların 5’inde *L. monocytogenes*, 8’inde *L. innocua* ve 3’ünde ise *L. seeligeri* izole etmişlerdir. Araştırmacılar Afyonkarahisar’da satışa sunulan kremalı pastaların halk sağlığı açısından risk oluşturabileceğini vurgulamışlardır. Topcu (2006), Ankara il merkezinde çeşitli lokanta ve büfelerden topladığı 25 adet çiğ ve 25 adet pişmiş olmak üzere 50 adet tüketime hazır et ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesini araştırmıştır. Pişmiş et dönerlerin % 4’ünde ve çiğ tavuk dönerlerin ise % 12’sinde *L. monocytogenes* varlığını saptamıştır. Şireli ve Gücükoğlu

(2007), Ankara’da satışı sunulan 100 adet tüketime hazır gıdadan 13’ünde *Listeria* spp. varlığını tanımlamışlardır. Tuğrulelçi (2011), Kayseri ilinde farklı satış noktalarından temin edilen toplam 100 adet tüketime hazır gıda örneğinden sadece 3 adet *L. innocua* izole ederek tanımlamıştır. Araştırmacı, Kayseri’deki tüketime hazır gıda satış noktalarının halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturmadığını belirtmiştir. Ceylan (2012), Tokat’ta satışı sunulan 25 gıda örneğinden 4’ünde *L. monocytogenes* varlığını saptamıştır. Öksüztepe vd. (2013), Elazığ’da satışı sunulan 100 adet sütlü tatlıyı *Listeria* varlığı bakımından araştırmışlar ve hiçbir örnekte *Listeria* spp. varlığına rastlanmamışlardır. Yıldırım (2013), benzer şekilde Ankara’da tüketime sunulan 80 çiğ süt ve 80 peynir örneğinde *Listeria* türlerinin varlığını araştırmıştır. İncelenen örneklerden 15 izolat elde edilmiş ve bunların 11’i *L. innocua*, 3’ü *L. grayi* ve 1’i *L. welshimeri* olarak tanımlanmıştır. Büyükyörük vd. (2014), Aydın’da farklı kafeteryalardan temin ettikleri toplamda 270 tüketime hazır gıdada *Listeria* varlığını araştırmışlardır. Örneklerin 8’inde *Listeria* spp. varlığı saptanırken, bunlardan 1’i *L. monocytogenes*, 5’i *L. ivanovii*, 1’i *L. grayi* ve 1’i ise *L. seeligeri* olarak belirlenmiştir. Çetinkaya vd. (2014), 512 farklı gıda örneğinden 20’sinde *L. monocytogenes* belirlemişlerdir. Uçar vd. (2014), 20 adet kanatlı etinde *Listeria* spp. varlığını araştırmışlar ve sadece 2’sinin *Listeria* ile kontamine olduğunu saptamışlardır. Şenses-Ergül vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, 666 hazır yemek ürününün mikrobiyolojik kalitesi araştırılmış ve örneklerin hiçbirinde *L. monocytogenes* varlığına rastlanmamıştır. Yavuz (2015), Kütahya’dan temin ettiği 151 farklı gıda örneğinden sadece 13 tanesinde *Listeria* varlığını saptamıştır. Bunların 7’si *L. innocua*, 4’ü *L. grayi* ve 2’si ise *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Yerlikaya ve Yıldırım (2015), Kayseri’de çiğ, pişmeye hazır ve tüketime hazır kanatlı eti ürünlerinde *Listeria* türleri varlığını araştırmış ve örneklerin % 14’ünde *L. innocua*, % 11’inde *L. welshimeri* ve % 2’sinde ise *L. ivanovii* varlığını belirlemişlerdir. Toplam 100 örnekten hiçbirinde *L. monocytogenes* kontaminasyonuna rastlanmamıştır. Gökmen vd. (2016), Balıkesir’de market ve restoranlarda satışı sunulan 235 adet tüketime hazır gıdadan 22’sinde *Listeria* spp. varlığını ortaya koymuşlardır. Bu izolatlardan 5’i ise *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır.

Dünyada yapılan benzer çalışmalara bakıldığı zaman ise; Sant'Ana vd. (2012), Brezilya'da 512 adet paketli tüketime hazır sebze ürününden 16'sında *L. monocytogenes* varlığını belirlemişlerdir. Jamali vd. (2013), Malezya'da 396 tüketime hazır gıdadan 71'inde *Listeria* varlığını saptamıştır. Bu izolatlardan 45'i *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Momtaz ve Yadollahi (2013), tarafından İran'da 300 taze deniz ürünü incelenmiş ve bunlardan 24'ü *Listeria* varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bunlardan 18'i ise *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Garedeu vd. (2015), Etiyopya'da 384 adet tüketime hazır gıdadan 96'sını *Listeria* varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirmiş ve bunlardan 24'ünü *L. monocytogenes*, 2'sini *L. ivanovii*, 48'ini *L. innocua*, 5'ini *L. seeligeri*, 9'unu *L. welshimeri*, 2'sini *L. grayi* ve 6'sını ise *L. murrayi* olarak tanımlanmıştır. Saludes vd. (2015), Şili'de 2647 tüketime hazır gıdayı *L. monocytogenes* varlığı bakımından taramışlar ve 265'inden pozitif sonuç almışlardır. Wang vd. (2015), Çin'de 628 tüketime hazır gıdayı *L. monocytogenes* varlığı bakımından incelemişler ve 33 tanesini pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Benzer şekilde, Abdollahzadeh vd. (2016), İran'da 237 adet tüketime hazır gıdayı *Listeria* spp. varlığı bakımından araştırmışlar ve bunlardan 7'si *L. monocytogenes* olarak tanımlamışlardır. Coroneo vd. (2016) tarafından, 252 adet Ricotta salatası üzerinde yapılan tarama çalışmaları sonucunda, 87 örnekte *L. monocytogenes* varlığı belirlenmiştir. D'Ostuni vd. (2016) tarafından İtalya'da 5241 kuzu eti üzerinde yapılan tarama çalışmasında, örneklerin 125'inde *L. monocytogenes* tanımlanmıştır. Mohamed vd. (2016) ise, Mısır'da 100 adet işlem görmüş et ürününde *L. monocytogenes* varlığını araştırmışlar ve sadece 10'unda tanımlama yapabilmışlerdir.

Tez çalışmamızda elde edilen veriler, hem ülkemizde hem de dünyada yapılan ve yukarıda özetlenen çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ayrıca Ankara'da yapılmış olan benzer çalışmalarda (Topcu 2006, Şireli ve Gücükoğlu 2007, Yıldırım 2013) elde olunan değerler, tez çalışmamızda saptanan değerlerle yüksek oranda benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.11'de *Listeria* suşlarının tanımlanması aşamasında kullanılan API®*Listeria* test kiti ile 16S rRNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması yer almaktadır.

Çizelge 4.11 *Listeria* suşlarının tanımlanması aşamasında kullanılan API®*Listeria* test kiti ile 16S rRNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması

| <b>Bakteri Kodu</b> | <b>16S rRNA Dizi Analizleri Sonucu Tanımlanan Tür Adı</b> | <b>API®<i>Listeria</i> Test Kiti ile Tanımlanan Tür Adı</b> |
|---------------------|---|---|
| L6                  | <i>Listeria welshimeri</i>                                | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
| L10                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria grayi</i>                                       |
| L20                 | <i>Listeria grayi</i>                                     | <i>Listeria grayi</i>                                       |
| L28                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L29                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L32                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L37                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L38                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L46                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L47                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L48                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L49                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L50                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L51                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria grayi</i>                                       |
|                     |   | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
|                     |   | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L53                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L54                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L55                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L56                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L72                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L81                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |

Çizelge 4.11 *Listeria* suşlarının tanımlanması aşamasında kullanılan API®*Listeria* test kiti ile 16S rRNA dizi analizi sonuçlarının karşılaştırılması (devam)

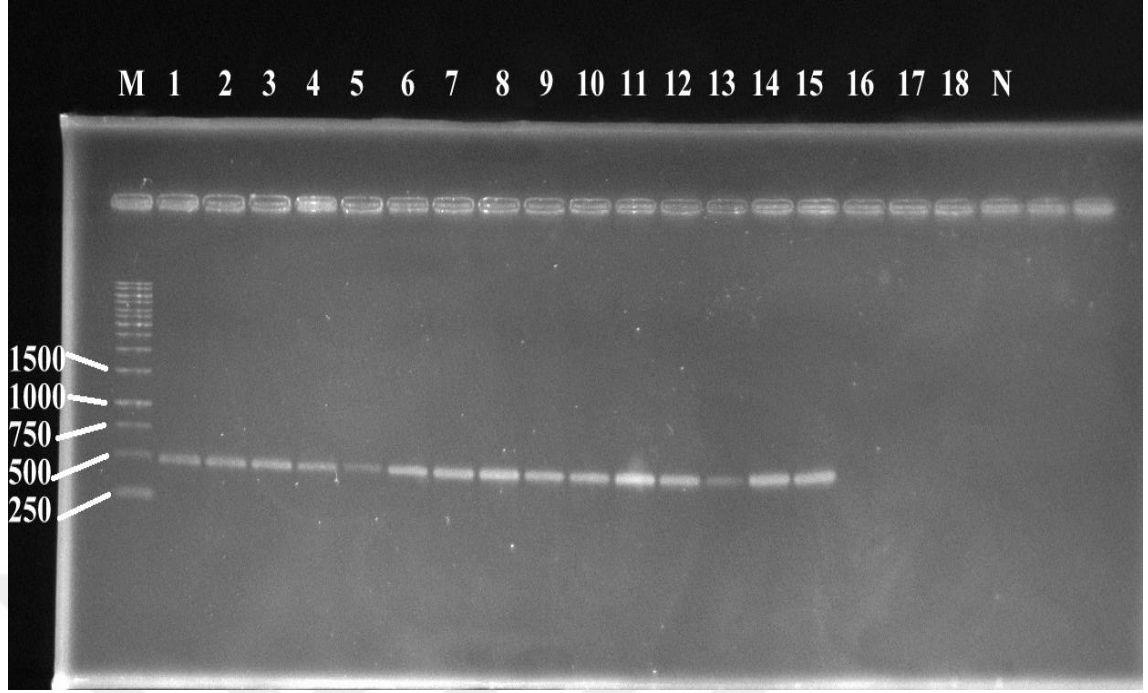
| <b>Bakteri Kodu</b> | <b>16S rRNA Dizi Analizleri Sonucu Tanımlanan Tür Adı</b> | <b>API®<i>Listeria</i> Test Kiti ile Tanımlanan Tür Adı</b> |
|---------------------|---|---|
| L82                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L85                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L91                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L92                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L96                 | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
|                     |   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L97                 | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L106                | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
|                     |   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L107                | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L108                | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
|                     |   | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
|                     |   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L122                | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
|                     |   | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
|                     |   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L123                | <i>Listeria welschimeri</i>                               | <i>Listeria welshimeri</i>                                  |
| L124                | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L125                | <i>Listeria monocytogenes</i>                             | <i>Listeria monocytogenes</i>                               |
| L129                | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |
| L133                | <i>Listeria innocua</i>                                   | <i>Listeria innocua</i>                                     |

API® *Listeria* Test Kiti ile *L. grayi* olarak tanımlanan L10 suşu, 16S rRNA dizi analizleri sonucunda *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. 29 suşun ise 16S rRNA dizi analizi sonucunda tür düzeyinde adlandırılmasında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. API® *Listeria* test kiti ile tür düzeyinde tanımlaması doğru bir şekilde yapılamayan L51, L108 ve L122 suşları 16S rRNA dizi analizleri sonucunda *L. monocytogenes*, L96 ve L106 suşları ise *L. innocua* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.11). Sonuç olarak; tez çalışmamızda API®*Listeria* test kitleri ile *Listeria* suşlarının tür düzeyinde tanımlanması aşamasında başarı oranı % 82,85 olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu değer, Setiani vd. (2015) ve Yehia vd. (2016) tarafından elde olunan verilerle benzerlik göstermektedir.

#### **4.2.4 *Listeria* spp. suşlarında *hlyA* gen bölgesi varlığının araştırılması**

16S rRNA dizi analizi yöntemi ile *L. monocytogenes* olarak tanımlanan 18 suşta (L29, L32, L37, L38, L46, L47, L48, L49, L50, L51, L53, L54, L55, L92, L97, L108 L122 ve L125 suşları), *hlyA* patojenite gen bölgesinin varlığı araştırılmıştır. Bu amaç için 5'- GCA GTT GCA AGC GCT TGG AGT GAA-3' ileri primeri ve 5'- GCA ACG TAT CCT CCA GAG TGA TCG -3' geri primeri kullanılmıştır. *hlyA* gen bölgesi fragmentleri % 1 oranında agaroz içeren jellerde koşturulmuş ve jel fotoğraflarının çekiminde jel görüntüleme sisteminden yararlanılmıştır (Şekil 4.3).

Tez çalışması kapsamında 18 *L. monocytogenes* suşundan sadece 15'inin (L32, L37, L38, L46, L47, L48, L49, L50, L51, L53, L54, L55, L97, L108, L122) 495 bç'lik *hlyA* gen bölgesi bandını içerdiği saptanmıştır. 3 *L. monocytogenes* suşunda (L29, L92, L125) ise *hlyA* gen bölgesi saptanamamıştır.



Şekil 4.3 *Listeria* spp. suşlarında PZR ile çoğaltılan *hlyA* fragmentleri

M O'Gene Ruler DNA marker (bç): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

1-18 : L32, L37, L38, L46, L47, L48, L49, L50, L51, L53, L54, L55, L56, L108, L122, L29, L92, L125

N : Negatif Kontrol

*L. monocytogenes*'e özgü olan ve virülanslıktan sorumlu birkaç gen tanımlanmış ve rolleri saptanmıştır (Osaili vd. 2011, Soni vd. 2013, Zeinali vd. 2015, Coroneo vd. 2016). Internalin (*inlA* ve *inlB*), hemolisin (*hlyA*), fosfatidilinositol-özgü fosfolipaz C (PI-PLC, *plcA*), fosfatidilkolin-özgü fosfolipaz C (PC-PLC, *plcB*) ve aktin polimerizasyon proteini (*actA*); *L. monocytogenes*'in patojenitesi için önemli birkaç temel virülanslık faktörüdür (Soni vd. 2013, Zeinali vd. 2015).

Tez çalışmamız kapsamında *L. monocytogenes* suşlarında sadece *hlyA* gen bölgesi taraması yapılmıştır. 18 suşun sadece 15'inde *hlyA* gen bölgesi saptanırken, 3'ünde ise bu gen bölgesine rastlanmamıştır. Benzer şekilde; Osaili vd. (2011) 51 *L. monocytogenes* suşunun 29'unun, Coroneo vd. (2016) 87 suşun % 93'ünün ve Zeinali vd. (2015) 36 suşun 32'sinin *hlyA* gen bölgesini taşımadığını belirtmişlerdir. *hlyA* gen bölgesi içermeyen *L. monocytogenes* suşları, patojenik özellik göstermemekte ve herhangi bir enfeksiyona neden olmamaktadır. *hlyA* gen bölgesi içinde meydana gelebilecek bir mutasyonun, patojenik *L. monocytogenes* suşlarını atipik suşlara dönüştürmüş olabileceği düşünülmektedir (Zeinali vd. 2015).

Tez çalışması kapsamında *hlyA* gen bölgesini içermeyen 3 *L. monocytogenes* suşu (L29, L92, L125) atipik *L. monocytogenes* suşları olarak tanımlanmıştır.



## 5. SONUÇ

Bu çalışmada Ankara'da 20 Ocak 2016-20 Aralık 2016 tarihleri arasında farklı satış yerlerinden temin edilen birbirinden farklı çiğ ve işlem görmüş tüketime hazır gıdaların *Listeria* spp. varlığı bakımından taranması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Tez çalışması kapsamında temin edilen toplam 134 tüketime hazır gıda örneğinin taraması, ISO 11290-1 protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Gıda örneklerinden 44'ünde, ALOA ve PALCAM agar ortamlarında *Listeria* varlığı bakımından tipik koloni morfolojisi gözlemlenmiştir. Toplamda gıda örneklerinin % 32,84'ü muhtemel *Listeria* varlığı bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir.
2. Tez çalışmasının bundan sonraki aşaması tipik koloni morfolojisi gösteren 44 izolat üzerinden devam etmiştir. 44 izolata gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi ve hareketlilik testi uygulanmıştır. Yapılan morfolojik ve kültürel testler sonucunda 35 izolat katalaz (+), oksidaz (-) ve hareket (+) sonuç göstermiştir. Katalaz (-) ve hareketlilik (-) özellik gösteren 9 izolat ise deneme dışında bırakılmıştır.
3. 35 muhtemel *Listeria* spp. izolatının tür düzeyinde biyokimyasal olarak tanımlanması amacıyla API®*Listeria* test kiti kullanılmıştır. Bu kapsamda, 35 izolattan 15'i *L. monocytogenes*, 11'i *L. innocua*, 2'si *L. welshimeri* ve 2'si ise *L. grayi* olarak tanımlanmıştır. 5 izolatın ise tür düzeyinde net bir tanımlaması yapılamamıştır.
4. İzolatların moleküler düzeyde tanımlamasını yapabilmek için 16S rRNA dizi analizi uygulanmıştır. 16S rRNA dizi analizinden elde edilen veriler doğrultusunda; 35 izolattan 18'i *L. monocytogenes*, 14'ü *L. innocua*, 2'si *L. welshimeri* ve 1'i ise *L. grayi* olarak tanımlanmıştır.

5. API®*Listeria* test kiti ile 16S rRNA dizi analizleri kıyaslandığında, 29 suşun tür düzeyinde tanımlanmasında değişiklik olmamıştır. API®*Listeria* test kiti ile *L. grayi* olarak tanımlanan bir suş, moleküler çalışmalar sonunda *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. API®*Listeria* test kiti ile *Listeria* suşlarının tür düzeyinde tanımlanması aşamasında başarı oranı % 82,85 olarak saptanmıştır.
6. 16S rRNA dizi analizleri sonucunda tanımlanan 18 *L. monocytogenes* suşunda patojeniteden sorumlu *hlyA* virülans geni varlığı araştırılmıştır. 18 *L. monocytogenes* suşundan sadece 15'inin (L32, L37, L38, L46, L47, L48, L49, L50, L51, L53, L54, L55, L97, L108, L122) 495 bp'lik *hlyA* gen bölgesi bandını içerdiği saptanmıştır. 3 *L. monocytogenes* suşunda (L29, L92, L125) ise *hlyA* gen bölgesi saptanamamıştır.
7. Tez çalışması kapsamında denemeye alınan tüketime hazır gıdalar arasında en riskli gıdalar Arnavut ciğeri, köfte ekmeği ve tavuk döner olarak değerlendirilmiştir. Ankara ilinde satışa sunulan tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* sayısının fazla bulunması (18/35), bu gıdaların gerek üretim gerekse pazarlanması aşamalarında gerekli hijyen kurallarına yeteri dikkat edilmediğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.
8. Bu çalışma, günlük yaşantımızın vazgeçilmezi haline gelen tüketime hazır gıdaların, toplum sağlığı açısından risk teşkil edip etmediğinin araştırılması açısından önemli taşımaktadır. Özellikle kolay ulaşılabilir ve ekonomik olması sebebiyle sıklıkla tercih edilen tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* gibi patojen bir bakteri varlığı; bağışıklığı baskılanmış kişiler, hamileler, çocuklar ve yaşlılar başta olmak üzere halk sağlığı açısından oldukça tehlikeli arz etmektedir. Bu bağlamda tez çalışması sonuçlarına göre Ankara'da satışa sunulan tüketime hazır gıdalar *L. monocytogenes* bakımından riskli bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Abdellrazeq, G., Kamar, A. and ElHoushy, S. 2014. Molecular Characterization of *Listeria* Species Isolated from Frozen Fish. Alexandria Journal of Veterinary Sciences, 40; 1-15.
- Abdollahzadeh, E., Ojagh, S., Hosseini, H., Irajian, G. and Ghaemi, E. 2016. Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. LWT- Food Science and Technology, 73; 205-211.
- Akan, E. ve Kınık, Ö. 2014. Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi. Journal of Food and Feed Science – Technology, 14; 42-51.
- Akçelik, N. ve Akçelik M. 2017. Bakteriyel Biyofilmler ve Konakçı Savunma Sistemi ile Etkileşimleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 33(1); 15-28.
- Akkaya, L., Alisharlı, M., Kara, R. ve Telli, R. 2006. Afyonkarahisar’da Tüketime Sunulan Kremalı Pastalarda *Listeria* Türlerinin Varlığının Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17 (1-2); 93-97.
- Allen, K., Walecka-Zacharska, E., Chen, J., Katarzyna, K., Devlieghere, F., Van Meervenue, E., Osek, J., Wiczorek, K. and Bania, J. 2016. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. Food Microbiology, 54; 178-189.
- Alsheikh, A., Mohammed, G., Abdalla, M. and Bakhiet, A. 2014. First Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* Isolated from Frozen and Shock Frozen Dressed Broiler Chicken in Sudan. British Microbiology Research Journal, 4(1); 28-38.
- Anonim. 2011. Web Sitesi:  
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>  
Erişim Tarihi: 28.06.2017
- Anonymous. 2007a. Web Sitesi:  
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/>  
Erişim Tarihi: 20.04.2017
- Anonymous. 2007b, Commission Regulation (EC) No:1441/2007. Official Journal of the European Union, 50; 12-29.
- Anonymous. 2013. Web Sitesi:  
<https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/foodcode/ucm374510.pdf> Erişim Tarihi: 19.04.2017

- Anonymous. 2017a. Web Sites:  
<http://www.textbookofbacteriology.net/Listeria.html> Erişim Tarihi: 12.04.2017
- Anonymous. 2017b. Web Sites:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1637> Erişim Tarihi 24.03.2017
- Anonymous. 2017c Web Sites:  
<https://www.cdc.gov/Listeria/outbreaks/index.html> Erişim Tarihi 19.01.2017
- Bang, J., Beuchat, L., Song, H., Gu, M., Chang, H., Kim, H. and Ryu, J. 2013. Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2); 134-141.
- Barre, L., Angelidis, A., Boussaid, D., Brasseur, E., Manso, E. and Gnanou Besse, N. 2016. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. *International Journal of Food Microbiology*, 238; 281-287.
- Beasley, S. S. and Saris, P. E. J. 2004. Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Human Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8); 5051-5053.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C., and Meile, L. 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63; 526-532.
- Bifulco, L., Ingianni, A. and Pompei, R. 2013. An Internalin A Probe-Based Genosensor for *Listeria monocytogenes* Detection and Differentiation. *BioMed Research International*, 2013; 1-6.
- Bigot, A. and Charbit, A. 2008. Genetic Manipulations, In: *Handbook of Listeria monocytogenes*. Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press, 273-309, USA
- Biomerieux, 2004. API 20 STREP. Identification System for Streptococcus and Related Organisms. 07625F-GB/08.
- Blaiotta, G., Pepe, O., Mauiello, G., Villani, F., Andolfi, R. and Moschetti, G. 2002. 16S-23S rRNA DNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garreriae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis system. *Applied and Environmental Microbiology*, 25; 520-527.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P., Jacquet, C. and Piffaretti, J. 1992. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(1); 69-73.
- Botticella, G., Russo, P., Capozzi, V., Amodio, M. L., Massa, S., Spano, G. and Beneduce, L. 2013. *Listeria monocytogenes*, biofilm formation and fresh cut

produce. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Méndez-Vilas, A. (eds), Formatex Research Center, 114-123, Spain.

- Brasileiro, I., Barbosa, M., Igarashi, M., Biscola, V., Maffei, D., Landgraf, M. and Franco, B. 2016. Use of growth inhibitors for control of *Listeria monocytogenes* in heat-processed ready-to-eat meat products simulating post-processing contamination. *LWT - Food Science and Technology*, 74; 7-13.
- Büyükörük, S., Beyaz, D., Göksoy, E. Ö., Kök, F. and Koçak, P. 2014. Microbiological evaluation of ready-to-eat sandwiches served near hospitals and schools. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61; 193-198.
- Cenet, O. 2007. Alabalık Fletolarında Farklı Yöntemlerle *Listeria monocytogenes*'in Arastırması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2); 41-44.
- Ceylan, Ş. 2012. Tokat Piyasasında Satışa Sunulan Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendiliği Anabilim Dalı, 55, Tokat.
- Chasseignaux, E., Gerault, P., Toquin, M., Salvat, G., Colin, P. and Ermel, G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2); 271-275.
- Chatterjee, S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T. and Hain, T. 2006. Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 74(2); 1323-1338.
- Chiara, M., Caruso, M., D'Erchia, A., Manzari, C., Fraccalvieri, R., Goffredo, E., Latorre, L., Miccolupo, A., Padalino, I., Santagada, G., Chiocco, D., Pesole, G., Horner, D. and Parisi, A. 2015. Comparative Genomics of *Listeria Sensu Lato*: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution*, 7(8); 2154-2172.
- Clarridge, J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4); 840-862.
- Coroneo, V., Carraro, V., Aissani, N., Sanna, A., Ruggeri, A., Succa, S., Meloni, B., Pinna, A. and Sanna, C. 2016. Detection of Virulence Genes and Growth Potential in *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Ricotta Salata Cheese. *Journal of Food Science*, 81(1); M114-M120.
- Crandall, P., O'Bryan, C., Peterson, R., Dyenson, N. and Yiannas, F. 2015. A survey estimating the benefits of incorporating *Listeria* specific growth inhibitors in bulk luncheon meats to be sliced in retail delis. *Food Control*, 53; 185-188.

- Çakır, İ. ve Çakmakçı, M. L. 2005. Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 03(1); 1-7.
- Çetinkaya, F., Elal Mus, T., Yibar, A., Güçlü, N., Tavşanlı, H. and Çıbık, R. 2014. Prevalence, Serotype Identification by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Antimicrobial Resistance Patterns of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Retail Foods. Journal of Food Safety, 34(1); 42-49.
- Den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A.F., Ahlstrom, C., Manuel C.S., Stasiewicz, M.J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L.K., Fortes, E., Nightingale, K.K., Kephart, D. and Wiedmann, M. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 1882-1889.
- D'Ostuni, V., Tristezza, M., De Giorgi, M., Rampino, P., Grieco, F. and Perrotta, C. 2016. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in meat processed products from industrial plants in Southern Italy. Food Control, 62, 104-109.
- Du, X., Zhang, X., Wang, X., Su, Y., Li, P. and Wang, S. 2017. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. Food Control, 74, 9-16.
- Felix, B., Danan, C., Van Walle, I., Lailier, R., Texier, T., Lombard, B., Brisabois, A. and Roussel, S. 2014. Building a molecular *Listeria monocytogenes* database to centralize and share PFGE typing data from food, environmental and animal strains throughout Europe. Journal of Microbiological Methods, 104, 1-8.
- Garedew, L., Taddese, A., Biru, T., Nigatu, S., Kebede, E., Ejo, M., Fikru, A. and Birhanu, T. 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *listeria* species from ready-to-eat foods of animal origin in Gondar Town, Ethiopia. BMC Microbiology, 15(1).
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretro, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H. and Simões, M. 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology, 6, 841
- Gorski, L. 2008. Phenotypic Identification, In: Handbook of *Listeria monocytogenes* Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press, 139-168, USA
- Gökmen, M., Akkaya, L., Kara R. ve Önen, A. 2016. Balıkesir’de satışa sunulan bazı tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*’in yaygınlığı. Van Veterinary Journal, 27 (1); 31-36.

- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. and Saunders, B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 1280-1288.
- Gülmez M., Sezer Ç., Duman B., Vatansever L., Oral N., ve Baz E. 2005. Lokantalarda Tüketime sunulan bazı gıdaların ve içme sularının mikrobiyolojik kaliteleri. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 11(1); 5-10
- Güner, A., Atasever, M. ve Aydemir Atasever, M. 2012. Yeni Ortaya Çıkan ve Tekrar Önem Kazanan Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18 (5); 883-892.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M. and Drosinos, E. 2016. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. Food Microbiology, 55, 7-15.
- Harvey, J., Keenan, K. and Gilmour, A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food Microbiology, 24(4); 380-392.
- Henriques, A., Telo da Gama, L. and Fraqueza, M. 2014. Assessing *Listeria monocytogenes* presence in Portuguese ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. Food Research International, 63, 81-88.
- Hof, H. 2003. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35(3); 199-202.
- Huang, B., Eglezos, S., Heron, B., Smith, H., Graham, T., Bates, J. and Savill, J. 2007. Comparison of Multiplex PCR with Conventional Biochemical Methods for the Identification of *Listeria* spp. Isolates from Food and Clinical Samples in Queensland, Australia. Journal of Food Protection, 70(8); 1874-1880.
- Jallewar, P., Kalorey, D., Kurkure, N., Pande, V. and Barbuddhe, S. 2007. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. International Journal of Food Microbiology, 114(1); 120-123.
- Jamali, H., Paydar, M., Loo, C. Y. and Wong W. F. 2013. Prevalence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes in ready mayonnaise salads and salad vegetables in Iran. African Journal of Microbiology Research, 7(19); 1903-1906.
- Jaradat, Z., Schutze, G. and Bhunia, A. 2002. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. International Journal of Food Microbiology, 76(1-2); 1-10.

- Koçan, D. 2007. *Listeria Monocytogenes*'in Belirlenmesinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 177, Ankara.
- Koçan, D. ve Halkman, A.K., 2010. Gıdalarda lateral akış testi ile *Listeria* analizi. *Gıda Dergisi*, 35(2); 121-126.
- Korsak, D. and Szuplewska, M. 2016. Characterization of nonpathogenic *Listeria* species isolated from food and food processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 274-280.
- Kotzekidou, P. 2013. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. *Food Microbiology* 35, 86-91.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Keto-Timonen, R., Mäesaar, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Hörman, A. and Korkeala, H. 2016. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vacuum and modified atmosphere packaged meat and fish products of Estonian origin at retail level. *Food Control*, 67, 48-52.
- Kuhn, M., Scortti, M., Vazquez-Boland J. A. 2008. Pathogenesis, In: *Handbook of Listeria monocytogenes* Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press, 97-136, USA
- Kum, E., Yıldırım, Y. ve Ertaş, N. 2011. Kayseri'de Satışa Sunulan Peynir Örneklerinde *Listeria monocytogenes* Varlığının Klasik Kültür Yöntemi ile Belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8(2); 105-109.
- Lang Halter, E., Neuhaus, K. and Scherer, S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(2); 641-647.
- Law, J., Ab Mutalib, N., Chan, K. and Lee, L. 2015. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1227.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Fleche-Mateos, A., Roche S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. and Allerberger, F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:2210-2214.
- Lerasle, M., Guillou, S., Simonin, H., Anthoine, V., Chéret, R., Federighi, M. and Membré, J. 2014. Assessment of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* level in ready-to-cook poultry meat: Effect of various high pressure treatments and potassium lactate concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 74-83.
- Liu, D., Lawrence M. L., Ainsworth A. J. and Austin F. W. 2008. Genotypic Identification, In: *Handbook of Listeria monocytogenes* Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press, 170-201, USA.



- Liu, D. 2008. Epidemiology, In: Handbook of *Listeria monocytogenes* Dongyou Liu, D. (eds) CDC Press, 27-59, USA.
- Maklon, K., Minami, A., Kusumoto, A., Takeshi, K., Thuy, N., Makino, S. and Kawamoto, K. 2010. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles). International Journal of Food Microbiology, 139(3), 134-139.
- Macrina, F.L., Tobian, J.A., Jones, K.R., Evans, R.P. and Clewell, D.B. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. Gene, 19, 345–353.
- Meloni, D., Galluzzo, P., Mureddu, A., Piras, F., Griffiths, M. and Mazzette, R. 2009. *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: Prevalence and automated EcoRI ribotyping of the isolates. International Journal of Food Microbiology, 129(2); 166-173.
- Modzelewska-Kapitula, M. and Maj-Sobotka, K., 2014. The microbial safety of ready-to-eat raw and cooked sausages in Poland: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. occurrence. Food Control 36, 212–216
- Mohamed, Y., Reda, W., Abdel-Moein, K., Abd El-Razik, K., Barakat, A., El Fadaly, H., Hassanain, N. and Hegazi, A. (2016). Prevalence and phylogenetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from processed meat marketed in Egypt. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 14(1); 119-123.
- Momtaz, H. and Yadollahi, S. 2013. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. Diagnostic Pathology, 8(1).
- Moretro, T. and Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. Biofilms, 1(2); 107-121.
- Morlay, A., Duquenoy, A., Piat, F., Calemczuk, R., Mercey, T., Livache, T. and Roupioz, Y. 2017. Label-free immuno-sensors for the fast detection of *Listeria* in food. Measurement, 98, 305-310.
- Nayak, D., Savalia, C., Kalyani, I., Kumar, R. and Kshirsagar, D. 2015. Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. Veterinary World, 8(6); 695-701.
- Ohshima, C., Takahashi, H., Phraephaisarn, C., Vesaratchavest, M., Keeratipibul, S., Kuda, T. and Kimura, B. 2014. Establishment of a Simple and Rapid Identification Method for *Listeria* spp. by Using High-Resolution Melting Analysis, and Its Application in Food Industry. PLoS ONE, 9(6); p.e99223.
- Orsi, R. and Wiedmann, M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(12); 5273-5287.

- Orsi, R., Bakker, H. and Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(2); 79-96.
- Osaili, T., Alaboudi, A. and Nesiari, E. 2011. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*, 22(3-4); 586-590.
- Overney, A., Jacques-André-Coquin, J., Ng, P., Carpentier, B., Guillier, L. and Firmesse, O. 2017. Impact of environmental factors on the culturability and viability of *Listeria monocytogenes* under conditions encountered in food processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 74-81.
- Öksüztepe, G., Şahan Güran, H. ve İncili, G., K. 2013. Elazığ'da Satışa Sunulan Bazı Sütlü Tatlıların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 27(1); 19-24.
- Paziak-Domanska B, Bogulawska E, Wiekowska-Szakiel M, Kotlowski R, Rozalska B, Chmiela M, Kur J, Dabrowski W, Rudnicka W. 1999. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 209–214.
- Phraephaisarn, C., Khumthong, R., Takahashi, H., Ohshima, C., Kodama, K., Techaruvichit, P., Vesaratchavest, M., Taharnklaew, R. and Keeratipibul, S. 2017. A novel biomarker for detection of *Listeria* species in food processing factory. *Food Control*, 73, 1032-1038.
- Pirie, J. 1940. *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature*, 145(3668); 264-264.
- Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, M., Cipolla, L. and Callejo, R. 2016. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2); 91-95.
- Radtke, A., Anderson, K., Davis, M., DiMagno, M., Swanson, J. and O'Riordan, M. 2011. *Listeria monocytogenes* exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4); 1633-1638.
- Rawool, D., Doijad, S., Poharkar, K., Negi, M., Kale, S., Malik, S., Kurkure, N., Chakraborty, T. and Barbuddhe, S. 2016. A multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes* and its lineages. *Journal of Microbiological Methods*, 130, 144-147.
- Roccatto, A., Uyttendaele, M., Barrucci, F., Cibir, V., Favretti, M., Cereser, A., Cin, M., Pezzuto, A., Piovesana, A., Longo, A., Ramon, E., De Rui, S. and Ricci, A. 2017. Artisanal Italian salami and sopresse: Identification of control strategies to manage microbiological hazards. *Food Microbiology*, 61, 5-13.

- Roche, S. M., Velge P., and Liu D. 2008. Virulence Determination, In: Handbook of *Listeria monocytogenes*. Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press, 241-272, USA
- Rocourt, J. and Buchrieser, C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification, In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety 3rd ed, Ryser E. T. and Marth E. H., CRC Press, 1-20, New York
- Rocourt, J. and Grimont, P.A.D. 1983. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 33, 866-869.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C. and Piffaretti, J.C. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 42, 171-174.
- Saludes, M., Troncoso, M. and Figueroa, G. 2015. Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. Food Control, 50, 331-335.
- Sant'Ana, A., Igarashi, M., Landgraf, M., Destro, M. and Franco, B. 2012. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. International Journal of Food Microbiology, 155(1-2); 1-9.
- Schmid, M., Ng, E., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M. and Schleifer, K. 2004. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. Systematic and Applied Microbiology, 28(1); 1-18.
- Seeliger, H.P.R. 1981. Apathogen listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger and Schoofs, 1977). Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.A. 249, 487-493.
- Seeliger, H.P.R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P.A.D. and Jones, D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 34, 336-337. Validation List no. 10. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology., 1983, 33, 438-440
- Setiani, B., Elegado, F., Perez, M., Mabesa, R., Dizon, E. and Sevilla, C. 2015. API® *LISTERIA* Rapid kit for Confirmatory Phenotypic Conventional Biochemical Test of the Prevalence *Listeria Monocytogenes* in Selected Meat and Meat Products. Procedia Food Science, 3, 445-452.
- Soni, D., Singh, R., Singh, D. and Dubey, S. 2013. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Ganges water, human clinical and milk samples at Varanasi, India. Infection, Genetics and Evolution, 14, 83-91.
- Stack, H. M., Hill, C., Gahan, C. G. M. 2008. Stress Responses, In: Handbook of *Listeria monocytogenes* Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press, 62-96, USA.

- Stephan, R., Althaus, D., Kiefer, S., Lehner, A., Hatz, C. and Schmutz, C. 2015. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: a nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. *Food Control*, 57,14-17
- Şanlıbaba, P. ve Uymaz, B. 2015. Gıdalarda *Listeria monocytogenes*'in Biyokontrolünde Faj Uygulaması. *Akademik Gıda*, 13(1); 81-88.
- Şenses Ergül, Ş., Sarı, H., Ertaş, S, Berberoğlu, U., Cesaretli, Y. ve Irmak, H. 2015. Tüketime Sunulan Çeşitli Hazır Yemek Ürünlerinin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(3); 199 – 208.
- Şireli, U. T. and Gücükoğlu, A. 2007. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria* spp. Isolated from Ready-to-Eat Foods in Ankara. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.*, 32(2); 131-135.
- Tan, M., Siow, C., Dutta, A., Mutha, N., Wee, W., Heydari, H., Tan, S., Ang, M., Wong, G. and Choo, S. 2015. Development of *Listeria*Base and comparative analysis of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics*, 16(1).
- Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, F. and Lu, Z. 2017. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. *Food Control*, 73, 704-711.
- Temiz, 2000. Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar. *Gıda Mikrobiyolojisi*, Mengi Tan Basımevi, İzmir.
- Topcu, S. 2006. Ankara'da Satışa Sunulan Döner Kebap Çeşitlerinden *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* İzolasyonu ve Çeşitli Antibiyotiklere Dirençlilikleri. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 133, Ankara.
- Tuğrülçü, N. 2011. Kayseri'de Satışa Sunulan Tüketime Hazır Gıda Örneklerinde *Listeria monocytogenes* Varlığının Konvansiyel Yöntemler ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 58, Kayseri.
- Uçar, G., Telli, N., Tekinşen, K., Telli, A. ve Kahraman, H. 2014. Investigations on *Listeria* spp. in partridge (*Alectoris chukar*) meat. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 30(1); 20-20.
- Vardar, İ., Yurtsever, S., Coşkun, N., Kaptan, F., El, S. ve Ural, S. 2011. *Listeria monocytogenes*'e Bağlı Bir Menenjit Olgusu. *ANKEM Dergi*, 25(1); 54-57.
- Wagner, M. and McLauchlin, J. 2008. Biology, In: Handbook of *Listeria monocytogenes* Dongyou Liu, D. (eds), CDC Press,3-25, USA.
- Wang, G., Qian, W., Zhang, X., Wang, H., Ye, K., Bai, Y. and Zhou, G. 2015. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. *Food Control*, 50, 202-208.

- Wang, D., Chen, Q., Huo, H., Bai, S., Cai, G., Lai, W. and Lin, J. 2017. Efficient separation and quantitative detection of *Listeria monocytogenes* based on screen-printed interdigitated electrode, urease and magnetic nanoparticles. *Food Control*, 73, 555-561.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M. and den Bakker, H.C. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 286-292.
- Wellington, N., 2015. *Listeria* and *Erysipelothrix*, In: *Manual of Clinical Microbiology 11th Edition*. Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, 462-473, Washington, DC.
- Xu, W., Cater, M., Gaitan, A., Drewery, M., Gravois, R. and Lammi-Keefe, C. 2017. Awareness of *Listeria* and high-risk food consumption behavior among pregnant women in Louisiana. *Food Control*, 76, 62-65.
- Yavuz, M. ve Korukluoğlu, M. 2010. *Listeria monocytogenes*'in Gıdalaradaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 24(1); 1-10.
- Yavuz, N. 2015. Kütahya İlinde Tüketime Sunulan Gıdalarda *Listeria Monocytogenes* Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 100, Kütahya.
- Yehia, H. M., Ibraheim, S. M. and Hassanein, W. A. 2016. Prevalence of *Listeria* species in some foods and their rapid identification. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 15(5); 1047-1052.
- Yerlikaya, O. B. ve Yıldırım, Y. 2015. Kayseri'de Satışa Sunulan Kanatlı Eti Ürünlerinde *Listeria* spp. Varlığının Belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(3); 177-183.
- Yıldırım, H. 2013. Çiğ Süt ve Peynir Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 107, Ankara.
- Zeinali, T., Jamshidi, A., Rad, M and Bassami, M. 2015. A comparison analysis of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from chicken carcasses and human by using RAPD PCR. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8(6); 10152–10157.

**EK 1 Kültürel Çalışmalar İçin Kullanılan Malzemeler**

| <b>BESİYERİ/KATKI ADI</b>   | <b>KATALOG NUMARASI</b> | <b>FİRMA</b>      |
|---|-------------------------|-------------------|
| API® <i>LISTERIA</i>  | 10300                   | BIOMÉRIEUX        |
| Bactident® Oxidase  | 1.13300.0001            | MERCK             |
| BHI (Brain Heart Infusion) Broth  | 1.10493.0500            | MERCK             |
| Chromocult® <i>Listeria</i> agar enrichment supplement                    | 1.00439.0010            | MERCK             |
| Chromocult® <i>Listeria</i> agar selective supplement                     | 1.00432.0010            | MERCK             |
| Chromocult® <i>Listeria</i> selective agar base acc. OTTAVIANI and AGOSTI | 1.00427.0500            | MERCK             |
| Etanol  | 1.00983.2511            | MERCK             |
| FRASER <i>Listeria</i> ammonium iron (III) supplement                     | 1.00092.0010            | MERCK             |
| FRASER <i>Listeria</i> selective enrichment Broth (Base)                  | 1.10398.0500            | MERCK             |
| FRASER <i>Listeria</i> selective supplement                               | 1.00093.0010            | MERCK             |
| Gliserol  | 1.04092.2500            | MERCK             |
| Gram-Boyama Seti  | 1.11885.0001            | MERCK             |
| Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (30% )                 | 1.08597.2500            | MERCK             |
| LB Broth Base   | 12780052                | THERMO SCIENTIFIC |
| PALCAM <i>Listeria</i> selective agar base acc. To Van Netten et al.      | 1.11755.0500            | MERCK             |
| PALCAM <i>Listeria</i> selective supplement acc. To Van Netten et al.     | 1.12122.0001            | MERCK             |
| SIM Medium  | 1.05470.0500            | MERCK             |
| Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYA)                                   | 93395                   | SIGMA-ALDRICH     |
| Tryptone soya yeast extract broth ISO 11290-2:1998 (TSYEB)                | 55309                   | SIGMA-ALDRICH     |

## EK 2 Moleküler Çalışmalar İçin Kullanılan Malzemeler

| <b>KİMYASAL</b>  | <b>KATALOG<br/>NUMARASI</b> | <b>FİRMA</b>         |
|--|-----------------------------|----------------------|
| 16S Primer (Geri/R)<br>(CCGTCAATTCCTTTGAGTTT)              | 6121200641E08<br>189/212    | ELLA BIOTECH         |
| 16S Primer (İleri/F)<br>(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)             | 6121200641E07<br>188/212    | ELLA BIOTECH         |
| 6X DNA Loading Dye   | R0611                       | THERMO<br>SCIENTIFIC |
| Agaroz   | A9539-100G                  | SIGMA-ALDRICH        |
| dNTP (100 mM)  | 359866                      | THERMO<br>SCIENTIFIC |
| Etilendiaamintetraasetik asit (EDTA)                       | E5134-500G                  | SIGMA-ALDRICH        |
| Gene Ruler 1kb DNA Ladder                                  | 350148                      | THERMO<br>SCIENTIFIC |
| GeneJet Genomic DNA Purification kit                       | K0722                       | THERMO<br>SCIENTIFIC |
| GeneJET PCR Purification Kit                               | K0702                       | THERMO<br>SCIENTIFIC |
| <i>hlyA</i> Primer (Geri/R)<br>(GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG)  | 6121200641E02<br>187/212    | ELLA BIOTECH         |
| <i>hlyA</i> Primer (İleri/F)<br>(GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA) | 6121200641E01<br>186/212    | ELLA BIOTECH         |
| İzopropanol  | 1.00993.1000                | MERCK                |
| Kloroform  | 1024452500                  | MERCK                |
| Lizozim  | 89833                       | THERMO<br>SCIENTIFIC |
| Taq DNA Polimeraz  | 346217                      | THERMO<br>SCIENTIFIC |

## EK 2 Moleküler Çalışmalar İçin Kullanılan Malzemeler (Devam)

| <b>KİMYASAL</b>                     | <b>KATALOG NUMARASI</b> | <b>FİRMA</b>         |
|-------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| TBE Buffer (Tris-borate-EDTA) (10X) | B52                     | THERMOSCIENTIFI<br>C |
| Tris-Hidroklorür                    | T5941-500G              | SIGMA                |
| Triton® X-100                       | 1086432500              | MERCK                |





## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Gürcü Aybige ÇAKMAK  
**Doğum Yeri** : Sivas  
**Doğum Tarihi** : 23.03.1991  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise** : Sivas Selçuk Anadolu Lisesi (2005 - 2009)  
**Lisans** : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2010 - 2015)  
**Yüksek Lisans** : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2015 – Temmuz 2017)

### Yayınlar

#### **A. Hakemli Ulusal/Uluslararası Dergiler**

1. Şanlıbaba, P., Çakmak, A.G., Şentürk, E., Uymaz, B. (2015). “Antibiotic Resistance in Enterococci”, *European International Journal of Science and Humanitie*, Vol.1, No.9, p: 15-29, ISSN: 2420-587X
2. Şanlıbaba, P., Çakmak, A.G. (2016). “Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria”, *Applied Microbiology: Open Access*, Vol.2, No. 2, 1000115, DOI: 10.4172/2471-9315.1000115, ISSN: 2471-9315 AMOA.

#### **B. Uluslar Arası Düzenlenen Kongrelerde Yapılan Sunumlar**

1. Çakmak, G. A., Keskin, R., Tezel, B. U., Şanlıbaba, P. (2016). “Isolation of *Listeria* from Raw Milk and Cheese Samples in Ankara and Çanakkale”, *International Conference on Biological Science (ICBS)*, 21-23 October 2016, Konya/Turkey, p:105. POSTER BİLDİRİ.
2. Çakmak, G. A., Şanlıbaba, P., Keskin, R., Tezel, B. U. (2017). “Detection and Isolation of *Listeria* spp. in Ready-to-Eat Foods in Turkey”, *International*

*Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOT 2017)*, 15-17 May 2017, Cappadocia/ Nevşehir/Turkey, p: 30. SÖZLÜ BİLDİRİ

**C. Ulusal Düzenlenen Kongrelerde Yapılan Sunumlar**

1. Şanlıbaba, P., **Çakmak, G. A.**, Uymaz, B. (2016). “Laktik Asit Bakterilerinde Probiyotik Fonksiyonlar Bakımından Ekzopolisakkarit Üretimi”, *Türkiye 12. Gıda Kongresi*, 05-07 Ekim 2016, Edirne, s:448. POSTER BİLDİRİ
2. **Çakmak, A. G.**, Şanlıbaba, P. (2017). “*Listeria* Türlerinin Virülans Özellikleri”, 10. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 09-11 Kasım 2017, Antalya, **BİLİMSEL DEĞERLENDİRMEDE**.
3. **Çakmak, A. G.**, Şanlıbaba, P., Tezel, B. U. (2017). “Mikrobiyel Biyofilmler”, 10. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 09-11 Kasım 2017, Antalya, **BİLİMSEL DEĞERLENDİRMEDE**
4. Keskin, R., **Çakmak, G. A.**, Şanlıbaba, P., Tezel, B. U. (2017). “Çiğ Et ve Et Ürünlerinin *Listeria* ssp. varlığı Bakımından Taranması”, 10. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, 09-11 Kasım 2017, Antalya, **BİLİMSEL DEĞERLENDİRMEDE**