



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANA BİLİM DALI

**MODİFİYE ATMOSFER PAKETLİ SIĞIR KIYMA VE KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE
LISTERIA MONOCYTOGENES VE SEROTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adem ÖZKİRAZ

Samsun

Haziran-2016



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANA BİLİM DALI

**MODİFİYE ATMOSFER PAKETLİ SIĞIR KIYMA VE KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE
LISTERİA MONOCYTOGENES VE SEROTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adem ÖZKİRAZ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU

Samsun

Haziran-2016

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Adem ÖZKİRAZ tarafından Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU danışmanlığında hazırlanan “Modifiye Atmosfer Paketli Sığır Kıyma ve Kuşbaşı Örneklerinde *Listeria monocytogenes* ve Serotiplerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 03/06/2016 tarihinde yapılan sınav ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Özgür ÇADIRCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOĞLU, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Doç. Dr. Aydın HİM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında desteğini ve önerilerini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali GÜCÜKOğLU'na Őükranlarımı sunarım.

Çalıőmalarım sırasında maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme ve değerli dostum Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa DUMAN'a teőekkürlerimi sunarım. Özellikle varlığı ve desteği ile her daim beni onurlandıran eőim, arkadaőım, varlık sebebim kısacası her Őeyim olan Nebahat ÖZKİRAZ'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Bu alıőma PYO.VET 1904.12.002 kod numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilim Araştırma Projesi Komisyonu tarafından desteklenmiőtir.

ÖZET

MODİFİYE ATMOSFER PAKETLİ SIĞIR KIYMA VE KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE *LISTERIA MONOCYTOGENES* VE SEROTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Amaç: Bu çalışma modifiye atmosfer paketli sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *Listeria monocytogenes*'in varlığı, serotipleri ve çeşitli antibiyotiklere karşı dirençliliğinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Mayıs 2013 - Ekim 2013 tarihleri arasında Samsun Merkezi'nde bulunan market ve kasaplardan temin edilen toplam 100 adet modifiye atmosfer paketli (MAP) sığır et ürünü (50 kıyma, 50 kuşbaşı) materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerindeki *L. monocytogenes* varlığının araştırılmasında immunomagnetik separasyon (IMS) bazlı klasik kültür tekniği, identifikasyonda Vitek 2 Compact (Bio Merieux) otomatik identifikasyon sistem ile konfirmasyon, serotiplendirmede ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmıştır. Doğrulanmış izolatların antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon testi kullanılmıştır.

Bulgular: MAP sığır kıyma örneğinin 5'inin (% 10), 50 MAP sığır kuşbaşı örneğinin ise 3'ünün (% 6) *L. monocytogenes* pozitif olduğu belirlenmiştir. PCR yöntemi ile *hlyA* geni varlığı araştırılan MAP sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinden elde edilen 11 *L. monocytogenes* izolatının tamamının (% 100) bu gene sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan serotiplendirme sonucunda MAP sığır kıyma örneklerinden elde edilen 8 izolatın 3'ünün *L. monocytogenes* 1/2a, 3'ünün 1/2b, 2'sinin ise 4b olduğu saptanmıştır. Ayrıca MAP sığır kuşbaşı örneklerinden elde edilen 3 izolattan ise 1'inin *L. monocytogenes* 1/2b, 1'inin 1/2c ve 1'inin de 4b olduğu tespit edilmiştir. PCR ile doğrulanan 11 *L. monocytogenes* izolatının, 1'inin (% 9) ampisiline, 2'sinin (% 18,2) kloromfenikole, 3'ünün (% 27,2) eritromisine, 4'ünün (% 36,3) oksitetrasikline, 4'ünün (% 36,3) penisilin G'ye, 6'sının (% 54,5) tetrasikline ve 3'ünün (% 27,2) de vankomisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik testi sonucunda bir veya birden fazla antibiyotiklere karşı dirençli olduğu saptandı. Sonuç olarak antibiyotiklere dirençli suşların gelişmesinin önlenmesi amacıyla bilinçsiz antibiyotik kullanımı önlenmesine ilişkin resmi otorite tarafından ulusal kalıntı izleme programının etkin olarak yürütülmesi büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*; PCR; Serotip; Antibiyotik direnç; MAP.

Adem ÖZKİRAZ, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2016

ABSTRACT

DETERMINATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND SEROTYPES IN MODIFIED ATMOSPHERE PACKED GROUND BEEF AND CUBED SAMPLES

Aim: This study was conducted to determine the *Listeria monocytogenes*'s presence, serotypes and resistance against various antibiotics in modified atmosphere packaged ground and cubed beef samples.

Material and Method: Total of 100 modified atmosphere packaged (MAP) bovine meat products (50 ground, 50 cubed) was used as a material obtained from supermarkets and butchers in Samsun province between May 2013 and October 2013. Immunomagnetik separation (IMS) based on conventional culture techniques in the investigation of the presence of *L. monocytogenes*, confirmation with Vitek 2 Compact (Bio Merieux) automatic identification system in identification and polymerase chain reaction (PCR) method in serotyping was used. The disk diffusion test was used to determine the antibiotic resistance profile in verified isolates.

Results: Five of ground beef sample (10 %) and 3 of cubed beef sample (6 %) were identified as *L. monocytogenes* positive in MAP samples. Eleven *L. monocytogenes* isolates that obtained from ground and cubed beef samples being investigated in term of *hlyA* gene by PCR method have verified that this gene (100 %). In serotyping results, 3 of 8 isolate that obtained from MAP ground beef samples was 1/2a, the other 3 isolate was 1/2b and the remaining 2 isolate was 4b. Also, 1 of 3 isolate that obtained from MAP cubed beef samples was 1/2b, the other one isolate was 1/2c and the last one was 4b. One isolate against (9 %) ampicillin, 2 isolate against (18,2 %) chloramphenicol, 3 isolate against (27,2 %) erythromycin, 4 isolate against (36,3 %) oxytetracycline and 4 isolate against (36,3 %) penicillin G, 6 isolate against (54,5 %) tetracycline and 3 isolate against (27,2 %) vancomycin were resistant in 11 *L. monocytogenes* isolates that confirmed by PCR.

Conclusion: The *L. monocytogenes* isolates were found to be resistant to one or more antibiotics in antibiotic-resistance test results. In conclusion, applying of national residue monitoring program by official authority for prevention of intensive antibiotic use in order to prevent the development of resistant strains to antibiotics has great importance.

Keywords: ; *Listeria monocytogenes*; PCR; Serotype; Antibiotic resistance; MAP.

Adem ÖZKİRAZ, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>actA</i>	: Aktin A
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention.
CFU	: Colony Forming Unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	: Karbondioksit
GP	: Gram Pozitif
H ₂	: Hidrojen
<i>HlyA</i>	: Hemolizin-Listeriolizin
IMS	: Immunomagnetik Separasyon
<i>InlA</i>	: İnternalin A
<i>InlB</i>	: İnternalin B
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
LLO	: Listeriolysin O
MAP	: Modifiye Atmosfer Paketleme
MPC-S	: Dynal Manyetik Parçacık Portüğü
Mpl	: Metalloproteaz
N ₂	: Azot
O ₂	: Oksijen
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>PlcA</i>	: Fosfolipaz A
<i>PlcB</i>	: Fosfolipaz B
<i>PrfA</i>	: Pleiotropic Transcriptional Activator
SIM	: Sulphate Indol Motility
TSA-YE	: Tryptic Soy Agar-Yeast Extract

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etkenin Genel Özellikleri	3
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Genetik Özellikleri	6
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Virülens Faktörleri	6
2.4. <i>PrfA</i> 'nın Aktivitesi ve Virülens Genlerine Etkisi.....	6
2.5. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Antibiyotik Dirençliliği	7
2.6. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Gıdalarda Bulunuşu.....	8
2.6.1 Kırmızı Et ve Ürünlerinde <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.7. Modifiye Atmosfer Paketleme	11
2.8. MAP ile Paketlenmiş Gıdalarda <i>Listeria monocytogenes</i>	13
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. MATERYAL	15
3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Malzemeler.....	15
3.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının PCR ile Doğrulanmasında Kullanılan Kimyasallar	16
3.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Malzemeler.....	17
3.2. METOT.....	17
3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in İzolasyonu	18
3.2.2. Ön Zenginleştirme	19
3.2.3. İmmunomanyetik Seperasyon (IMS)	20
3.2.4. Katı Besi Yerine Ekim	21
3.2.5. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Vitek 2 Compact (Bio Merieux) Otomatik İdentifikasyonu.....	22
3.2.6. <i>Listeria monocytogenes</i> 'in PCR ile Doğrulanması	25
3.2.7. Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	25

3.2.8. PCR Amplifikasyonu ve Elektroforez.....	25
3.2.9. Serotiplendirme	26
3.2.10. PCR Amplifikasyonu ve Elektroforez.....	27
3.2.11. Antibiyotik Dirençlilik Testleri	27
4. BULGULAR	29
4.1. IMS Bazlı Kültür Tekniği ile Vitek 2 Compact (<i>Bio Merieux</i>) Otomatik İdentifikasyon Sistem Sonuçları.....	29
4.2. İzolatların PCR ile Doğrulanması.....	30
4.3. <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının Serotiplendirilmesi	30
4.4. <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.....	32
4.5. <i>Listeria monocytogenes</i> İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik ve Serotiplerinin Dağılımları.....	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	52

1. GİRİŞ

Listeria monocytogenes son yıllarda özellikle hayvansal orijinli gıdalar aracılığı ile insanlarda sporadik veya epidemik karakterde listeriosis vakaları meydana getirmesi ve hayvancılığın yoğun olduğu bölgelerde ekonomik kayıplara neden olması ile birlikte, et ve süt ürünü gibi hayvansal gıdaların üretildiği yerlerde bulunması, bu ürünlerin kontaminasyonuna neden olması ve insanlarda veya kontamine yemlerle beslenen duyarlı hayvanlarda çok şiddetli enfeksiyonlara neden olan önemli bir hücre içi patojen olması sebebiyle üzerinde en fazla durulan mikroorganizmaların başında gelmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Jemmi ve Stephan, 2006; Liu ve ark., 2006). Etkenin temel rezervuarları arasında sığırların payının büyük olduğu bilinmektedir. Farklı ülkelerde sığırların derileri ve karkaslarında *L. monocytogenes* izole edildiği, sığırların derilerinde bulunan etkenin hayvanların kesilmesi ve işlenmesi sırasında, mezbaha araç-gereçleri ve mezbaha çalışanları gibi çeşitli yollarla karkasa bulaştığı, bu şekilde kontamine et ve et ürünleriyle gıda zincirine karıştığı, hayvansal gıdaların tüketilmesi sonucu insanlarda zehirlenmelere, ciddi hastalıklara ve ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Erol, 2007; Akkaya ve ark., 2008a; 2008b). Bununla beraber temel hijyen kurallarına uyularak kesilen sığır karkaslarında başlangıçta bu patojenin bulunmadığı ancak daha sonra çapraz kontaminasyonlarla karkasa bulaştığı tespit edilmiş ve karkas yüzeylerinde etkenin üremesi sonucu halk sağlığı açısından risk oluşturduğu belirlenmiştir (Sofos ve ark., 1999). Bununla beraber *L. monocytogenes*'in karkas etine göre işlenmiş et ürünlerinde daha fazla saptandığı vurgulanmaktadır (Sofos, 2008). Etken özellikle hamilelerde, yeni doğanlar, yaşlılar ve immunsupresif ilaç kullanan insanlarda % 20-30 oranında mortaliteye sebep olan invaziv listeriosis (özellikle gebe uterusu, merkezi sinir sistemi) ve invaziv olmayan (referred to as febrile listerial gastroenteritis) listeriosis şeklinde seyretmektedir. Listeriosis diğer gıda patojenlerine kıyasla görülme sıklığı daha düşük olmakla beraber, listeriosisden kaynaklanan ölüm oranı % 30 civarında olduğu bildirilmektedir (Liu ve ark., 2006). *L. monocytogenes*'in virulens özelliği 6 gen (*prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mplA*, *actA* ve *plcB*) ve internalinlere bağlıdır (Chakraborty ve ark., 1992). Bununla beraber *hlyA* geni tarafından kodlanan Listeriolysin O (LLO) ise en önemli virulens faktördür. *L. monocytogenes*'in 13 serotipi bulunmaktadır ve insanlarda listeriosis vakalarının % 98'inden 1/2a, 1/2b ve 4b serotipleri sorumlu tutulmaktadır

(Holzapfel ve Becker, 2007). *L. monocytogenes*; aerob, mikroaerofilik ve anaerob koşullarda üreyebilmektedir. Bununla beraber modifiye atmosfer paketlemede (MAP) yüksek düzeyde CO₂ kullanımının ve gıdaların düşük sıcaklıklar derecelerindeki muhafazanın *L. monocytogenes*'in üremesini baskıladığı ancak tam inhibisyonun sağlanmadığı bildirilmiştir (Fernandez ve ark., 1997). Farklı yıllarda ve çeşitli ölkelerde etkenin kendini salgınlar halinde göstermesi araştırmacıları et ürünlerinde etkeni saptamaya yönelik çalışmalara yönlendirmiştir. Bununla beraber ölkemizde modifiye atmosfer paketli (MAP) sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *L. monocytogenes*'in insidensi, patojenitesi ve antibiyotik dirençliliğine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, günümüzde en önemli gıda patojenlerinden biri olarak bilinen *L. monocytogenes*'in Samsun il merkezindeki kasap ve marketlerden alınan Modifiye Atmosfer Paketli (MAP) sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerindeki prevalansı araştırılmıştır. Etkenin izolasyonunda IMS (Immunomagnetik separasyon) bazlı klasik kültür tekniği, identifikasyonda Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem, konfirmasyon ve serotiplendirmede ise PCR tekniği kullanılmıştır. Çalışmanın devamında izolatların antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon testi uygulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

L. monocytogenes, ilk kez 1926 yılında Murray ve ark. (1926) tarafından İngiltere Cambrigde'de laboratuvar rodentlerinden izole edilmiş ve bakteriye mononükleer lokositoza neden olmasından dolayı *Bacterium monocytogenes* adı verilmiştir. Bakteri daha sonra Pirie (1927) tarafından, Güney Afrika'da vahşi gerbillerden izole edilmiş ve antisepsisin öncüsü ünlü cerrah Lord Lister'in anısına etkenin adının *Listerella hepatolytica* olması önerilmiştir. Bu öneriden sonra Murray ve Pirie izole ettikleri etkene *Listerella monocytogenes* adını vermişler, daha sonra 1940 yılında yapılan taksonomik çalışmalarda etkenin ismi *Listeria monocytogenes* olarak belirlenmiştir (Pirie, 1940).

2.1. Etkenin Genel Özellikleri:

Listeriaceae soyunda bulunan bütün türler gram pozitif, 0,4-0,5 µm genişliğinde, 1-2 µm uzunluğunda kısa çubukçuklar olarak tanımlanmışlardır. Bütün *Listeria* türlerinin peritrik flagellaları sayesinde hareketli olduğu belirlenmiş ve in vitro koşullarda 30 °C'nin altında inkübe edildiklerinde hareketli fakat 37 °C'de inkübe edildiklerinde ise hareketsiz oldukları tespit edilmiştir. Aerob veya fakültatif anaerob metabolizmaya sahip olan *Listeria*'ların pH 4,3 - 9 arasında, < 0 - 45 °C sıcaklıklarda ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 10) canlılıklarını sürdürebildikleri rapor edilmiştir. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif olan *Listeria* türlerinin şekerleri gaz oluşturmadan fermente edebilme özelliğinde oldukları belirlenmiştir. Buna ek olarak Metil-red ve Voges-Proskauer testlerinin de pozitif olduğu, indolün ise negatif olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda *Listeria* türlerinin eskülini ve hippuratu hidrolize ettiği fakat üreyi hidrolize edemedikleri bildirilmiştir (Seeliger ve Jones, 1986; Farber ve Peterkin, 1991) (Tablo 1).

Tablo 1. *Listeria* türü bakterilerin genel üreme koşulları (Erol, 2007)

	Minimum-Maksimum	Optimal
Sıcaklık (°C)	0 - 45	35 - 37
pH	4,3 - 9,6	7,0
a _w	0,92 -	0,97

Listeria türlerinin hücre duvarı Gram pozitif bakterilere özgü kalın katmanlı yapıda olduğu ve tüm *Listeria* türlerindeki peptidoglikan tabaka L-alanin, D-glutamin ve mezodiaminopimelik asit içerdiği, hücre duvarı ve salgılanan proteinler *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* türlerinin virulansı ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Borrelia ve ark., 2005; Ludwig ve ark., 2009).

Taksonomik olarak *Listeria*'ların 8 türü bulunmaktadır. Bunlar; *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii* ve *Listeria rocourtiae* 'dir. Bu türler içinde sadece *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* insan ve diğer memeliler için patojendir (Robinson ve ark., 2000) (Tablo 2).

Tablo 2. *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri (Wagner ve McLauchlin, 2008; Graves ve ark., 2010; Leclercq ve ark., 2010)

TESTLER	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. marthii</i>	<i>L. rocourtiae</i>
Gr Boyama	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-
β - Hemoliz	+	++	-	-	±	-	-	-
Eskülin	+	+	+	+	+	+	+	+
D - Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
L - Ramnoz	+	-	±	±	-	±	+	-
D - Ksiloz	-	+	-	+	+	-	-	-
CAMP Test	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	-	-	<i>S. aureus</i>	-	-	-

L. monocytogenes doğada yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanlarda hastalık yapan gram pozitif, sporsuz, fakültatif anaerob, ve fakültatif intraselüler bir bakteridir (Beuchat ve ark., 1997; Fernandez-Garayzabal ve ark., 1992). *Listeria* türleri oksidaz negatif, katalaz pozitif, Voges-Proskauer ve Metil Red testleri pozitif olup, indol ve H₂S oluşturmazlar. Eskülünü hidrolize ederler ve oksijenli ortamda 30 °C’de hareketli olduklarından Sulphate Indol Motility (SIM) mediumda şemsiye tarzında üreme gösterirler. *L. monocytogenes* ramnozu fermente ederek asit oluştururken, ksiloz ve mannitolü fermente edemez (Seeliger ve Jones, 1986). Buna ek olarak kanlı besi yerlerinde β-Hemoliz oluşturma yeteneğine de sahiptir (Farber ve Peterkin, 1991). Kanlı agarda yapılan CAMP testinde etkenin *S. aureus* ile sinerjizm oluşturduğu bildirilmiştir (Seeliger ve Jones, 1986).

L. monocytogenes’in somatik (O) ve flagella (H) antijenine göre yapılan sınıflandırmasında 13 adet serotipinin olduğu belirlenmiştir. Bunların içinde insanlarda en sık hastalık oluşturan serotiplerin 4b, 1/2a, 1/2b, 1/2c olduğu bildirilmiştir (Seeliger ve Höhne, 1979) (Tablo 3). Doğada oldukça yaygın bulunduğundan gıda kaynaklı patojenler içinde oldukça önemli bir rola sahiptir ve son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konuların başında gelmektedir (Swaminathan, 2001; Kuhn ve Goebel, 1999).

Tablo 3. *L. monocytogenes*’in serotip ve antijen dağılımı (Seeliger ve Höhne, 1979)

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

2.2. *Listeria monocytogenes*'in Genetik Özellikleri

Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalarla *Listeria* türlerinin tüm gen haritası çıkarılmış ve *Listeria* türlerinin gen büyüklükleri 2,7 ile 3 milyon baz (mb) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Toplam gen dizilimlerinin yaklaşık % 89'u kodlandığı ve bu kodlanan genlerin % 62,5 oranındaki kısmının bir fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir. *Listeria* izolatları serotiplerinin kendilerine özgü genleri dışında, *Listeria* türlerinin gen organizasyonlarında ve içeriklerinde yüksek bir benzerlik bulunduğu, *Listeria* türleri karşılaştırıldığında en küçük gene sahip olan *L. welshimeri* (2,7 mb) olduğu tespit edilmiştir. *Listeria* cinsinin başlıca patojen türü olan *L. monocytogenes*'in tüm kromozomu 2.944.528 baz çifti büyüklüğünde ve halka formunda olduğu, *L. innocua* ise 3.011.209 baz çifti büyüklüğünde gene sahip olduğu, *L. monocytogenes* geninin G+C nükleotidlerinin oranı % 39, *L. innocua*'nın ise % 37 olduğu, ayrıca her iki *Listeria* türünde de çevreye adaptasyonu kolaylaştıran, yüzey, sekresyon, transport proteinlerini ve transkripsiyon düzenleyici proteinlerini kodlayan çok sayıda gen bulunduğu bildirilmiştir (Glaser ve ark., 2001; Hain ve ark., 2007).

2.3. *Listeria monocytogenes*'in Virülens Faktörleri

L. monocytogenes, insan ve hayvan hücrelerini istila eden ve hücre içinde çoğalabilen, fakültatif hücre içi patojen bir bakteri olup, bazı genleri hücre istila şeklinde bir mekanizmaya sahip olduğu, bunlarında *prfA* (pleiotropic transcriptional activator) geninin regüle ettiği virülens gen grubu olup, bu gen grubunun üyeleri *plcA* (fosfolipaz A), *plcB*, *hlyA* (hemolizin-listeriolizin), *mpl* (metalloproteaz), *actA* (aktin A) ve *inl* (internalin) olduğu bildirilmiştir (Chakraborty ve ark., 1992).

2.4. *PrfA*'nın Aktivitesi ve Virülens Genlerine Etkisi

PrfA'nın, virülens faktörlerini belirleyen genlerin transkripsiyonundan ve koordinasyonundan sorumlu olduğu bildirilmiş, *prfA*'nın ve ona bağlı virülens genlerinin aktivasyonu için çevre sıcaklığının 37 °C olması gerektiği, *L. monocytogenes*'in virülens genlerinin *hlyA*, *plcA*, *mpl*, *actA*, *inlA* ve *inlB* olduğu ve

bütün bu virülens faktörlerinin enfeksiyon oluşumunda ve bakterinin yayılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Tablo 4), (Smith ve ark., 1995; Kuhn ve Goebel, 1999).

Tablo 4. *L. monocytogenes* 'in virülens genleri (Smith ve ark., 1995; Kuhn ve Goebel, 1999)

Genin Adı	Genin Fonksiyonu	
<i>prfA</i>	Positive regulatory factor A	Virülens genlerinin transkripsiyonu
<i>plcA</i>	Phosphatidylinositol specific phospholipase C	Vakuolden kaçış
<i>plcB</i>	Phosphatidylinositol specific phospholipase C	Hücreden hücreye geçiş
<i>hlyA</i>	Listeriolysin O	Vakuolden kaçış
<i>mpl</i>	Zinc dependet metalloprotease	PLC'nin aktivasyonu
<i>actA</i>	Actin polymerizing protein	Hücreden hücreye geçiş
<i>inlA</i>	Internalin A	Hücreye penetrasyon
<i>inlB</i>	Internalin B	Hücreye penetrasyon

2.5. *Listeria monocytogenes*'in Antibiyotik Dirençliliği

Antibiyotikler, hem beşeri hem de veteriner hekimlikte bakteriyel etkenlere karşı mücadelede oldukça önemli silahlardır. Ancak kontrolsüz kullanımı sonucu ortaya çıkan antibiyotik dirençlilik kavramı da giderek büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Geçmişten günümüze antibiyotiklerin yoğun ve bilinçsiz olarak kullanılması sonucu dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve tedavide yeni antimikrobiyel ilaçların kullanılması zorunlu bir hal almıştır. *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türlerinin gen dizilimleri ile antibiyotik dirençliliği oluşumunda rol oynayan mekanizmalar üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiş, üç tür hareketli gen parçasının *Listeria* türlerinde dirençlilik mekanizmasında rol oynadığını, bu gen parçalarını, kendiliğinden aktarılabilir plazmidler, hareketlenebilir plazmidler ve konjugatif transpozonlar olarak nitelendirilmiştir (Charpentier ve Courvalin, 1999).

L. monocytogenes de zaman içerisinde yoğun antibiyotik kullanılmasına bağlı olarak, antibiyotiklere direnç geliştirmiş ve hastalığın tedavisi için kullanılan antibiyotik seçenekleri değişmiştir (Hof, 1991). Önceleri listeriozisin tedavisi için tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, penisilin ve ampisilin kullanılırken günümüzde ampisilin ve gentamisin kombinasyonu kullanılmaktadır (Charpentier ve Courvalin, 1999). Ayrıca *L. monocytogenes* sefalosporinlere de dirençli olduğundan menenjit

tedavisinde bu ajanlar etkili olmamaktadır (Schlech, 2000). Buna ek olarak insanlardan izole edilen *L. monocytogenes*'lerde tetrasikline direnç sıklıkla tespit edilmektedir. Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in antibiyotik direnç genlerini çevresel kaynaklardan alabildiği ortaya konulmuştur (Poyart-Salmeron ve ark., 1990; Hadorn ve ark., 1993).

2.6. *Listeria monocytogenes*'in Gıdalarda Bulunuşu

L. monocytogenes hava ve toprakta bulunan bir bakteridir. Sebzeler bu bakteri ile topraktaki gübre aracılığıyla kontamine olabilirler. *Listeria* ile kontamine hayvanlar hastalık belirtisi göstermeden bakteriyi taşıyabilirler. Fakat bu hayvanlardan elde edilen et ve süt gibi gıdalar bakteri ile kontamine olabilirler. Bakteri genellikle iyi pişmemiş et, pastörize edilmemiş süt, sebze, soğuk meze ve hazır yemeklerde bulunabilir. *Listeria* pastörizasyon ve pişirme gibi işlemlerle ölmesine karşın hazır yenen gıdalar (ready to eat) pişirildikten sonra paketlenme işlemi esnasında bakteri ile kontamine olabilirler (CDC, 2008). Buna ek olarak sağlıklı hayvanların *L. monocytogenes*'in taşıyıcısı olabileceği ve bu hayvanlardan elde edilen süt, et gibi gıdaların *L. monocytogenes* ile kontamine olabileceği bildirilmiştir.

L. monocytogenes ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu insanlarda menenjit, ensefalit, abort, sepsis ve hatta ölümlere varan ciddi infeksiyonlar şekillenmektedir. *L. monocytogenes*'den kaynaklanan hastalıklarda ölüm oranı oldukça yüksektir (% 30) (McLauchlin, 1996; Kathariou, 2002). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 2500 Listeriosis vakasının şekillendiği ve yaklaşık yılda 500 kişinin öldüğü bildirilmektedir (CDC, 2008). *L. monocytogenes*'in virulensi internalinler ve 9 kb dizi içeren altı gene (*prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mplA*, *actA* ve *plcB*) bağlıdır. *hlyA* geni tarafından kodlanan Listeriolysin O (LLO) ise en önemli virülens faktör olup patojen *L. monocytogenes* serotipleri tarafından por oluşturan toksin olarak salgılanır (Jay, 1996).

Listeria ile ilişkili olarak dünya çapında meydana gelen vakalar; 1967-1985 yılları arasında İngiltere'de 722 vaka, 1986'da ABD'nin altı eyaletinde 246 vaka,

1982-1999'da ABD'nin dört eyaletinde 119 vaka, 1971-1989'da Finlandiya-Helsinki'de 74 vaka, 1990'da İspanya-Barselona'da 31 vaka, 1983-1992'de İngiltere-Bristol'da 29 vaka, 1983-1992'de Avustralya-Sidney'de 84 vaka, 1983-1997'de İsviçre'de 122 vaka, 1992'de Fransa'da 225 vaka, 1995-1999'da İsrail'de 156 vaka olmak üzere 1967-1999 yılları arasında tüm dünyada toplam 1808 listeriosis vakası görülmüştür (McLauchlin ve ark., 1990; Cherubin ve ark., 1991; Gellin ve ark., 1991; Skogberg ve ark., 1992; Nolla-Salas ve ark., 1993; Jones ve ark., 1994; Goulet ve Marchetti, 1996).

L. monocytogenes ile ilgili olarak gıda kaynaklı ilk salgın 1981 yılında Nova Scotia-Kanada'da lahana ile ilişkili olarak meydana gelmiştir (Schlech ve ark., 1983). Sonraki salgınlar süt, pastörize edilmemiş yumuşak peynir, hindi sosis ve hazır yenen et ürünlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir. 1980-2000 yılları arasında Amerika Birleşik Devletlerinde meydana gelen gıda kaynaklı *L. monocytogenes* salgınları; 1983 yılında Massachusetts ve Connecticut'da pastörize edilmiş süt kaynaklı 62 vaka, 1985 yılında Kaliforniya Meksika sitili peynir kaynaklı 86 vaka, 1986 yılında Pennsylvania'da sebebi bilinmeyen 36 vaka, 1989'da Connecticut'da istakoz kaynaklı 10 vaka, 1994'de Illinois, Michigan, Wisconsin'da pastörize edilmiş çilolatalı süt kaynaklı 69 vaka, 1998'de 22 eyalette işlenmiş et kaynaklı 101 vaka, 1998'de Colorado'da hot dog kaynaklı 4 vaka, 1998'de Ohio'da sebebi bilinmeyen 3 vaka, 1999'da Florida'da hindi eti, sığır eti ve jambon kaynaklı 2 vaka, 1999'da Connecticut, Maryland, New York'da kelle kaynaklı 11 vaka, 1999'da Minnesota'da meze kaynaklı 5 vaka, 1999'da New York'da hot dog kaynaklı 4 vaka, 1999'da New York'da sebebi bilinmeyen 6 vaka, 2000'de 11 eyalette meze kaynaklı 30 vaka, 2000'de North Carolina'da ev yapımı Meksika usulü peynirlerde 12 vaka şekillendiği bildirilmiştir (CDC, 1985; Fleming ve ark., 1985; Riedo ve ark., 1994; CDC, 1998; CDC, 1999; CDC, 2000; CDC, 2001; CDC, 2003)

2.6.1 Kırmızı Et ve Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*

Ülkemizde ve dünyada *L. monocytogenes*'in kırmızı et ve et ürünlerinde bulunma oranı ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Kasaplık hayvanların *L. monocytogenes*'i kendi floralarında taşıyabildiği ve kesim işlemi sırasında hijyenik

koşulların sağlanamadığı durumlarda *L. monocytogenes*'in karkasa bulaşabildiği bildirilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991).

Samadpour ve ark. (2006), ABD'de marketlerde satışa sunulan paketlenmiş kırmızı et örneklerinin % 3,5'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir.

Pesavento ve ark. (2010), İtalya'nın Floransa şehrinde çiğ et örneklerinin % 21,4' ünün *Listeria* türleri ile kontamine olduğunu ve elde edilen izolatların % 23,6'sını da *L. monocytogenes* olduğunu bildirmişlerdir.

İngiltere'de 1989 ve 1990 yıllarında toplamda 300 kişinin etkilendiği listeriozis vakasında sorumlu gıda olarak köfte bildirilmiştir. Benzer şekilde 1992 yılında Fransa'da şekillenen bir diğer listeriozis vakasında 279 kişi *L. monocytogenes* 4b'den etkilenmiş ve zehirlenmelerin domuz dilinden kaynaklandığı belirlenmiştir. ABD'de 1998 yılında 108 kişinin etkilendiği listeriozis vakasında ise sorumlu gıdanın sosisli sandviç olduğu rapor edilmiştir (McLauchlin ve ark., 1990; Thevenot ve ark., 2005).

İsviçre'de yapılan bir çalışmada, 211 adet sığır, 189 adet domuz olmak üzere toplam 400 adet kıyma numunesinde 43 (% 10,8) adet *L. monocytogenes* yönünden pozitif bulunmuş, çalışmada izole edilen *L. monocytogenes*'lerden 9 adedinin serotip 1/2a, 2 adedinin 1/2b, 12 adedinin 1/2c ve 10 adedinin 4b olduğu bildirilmiştir (Fantelli ve Stephan 2001). *L. monocytogenes*'in çiğ domuz etlerinde yaygın olarak tespit edildiği (Norrung ve ark., 1999), domuz eti de dahil olmak üzere etlerin genellikle *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b ve 1/2c serotiplerinin oldukları bildirilmiştir (Hof ve Rocourt 1992; Thevenot ve ark., 2005).

Ülkemizde ise Eylül 1994-Mayıs 1995 tarihleri arasında Ankara'daki market ve kasaplardan alınan 100 adet hazır sığır kıyması numunesinden 97 (% 97) adet 6 farklı *Listeria* türü tespit edilmiş, çalışmada en yaygın *Listeria* türünün % 92 ile *L. innocua* olduğu tespit edilirken, bunu % 28 ile *L. monocytogenes*, % 10 ile *L. murrayi*, % 9 ile *L. grayi*, % 3 ile *L. seeligeri* ve % 2 ile *L. welshimeri*'nin takip ettiği bildirilmiştir (Şireli

ve Erol 1999). Yücel ve ark. (2005), Ankara'da satışa sunulan et ürünlerinde *Listeria* türlerinin prevalansını ve antibiyotik dirençliliklerini ortaya koymak için yaptıkları bir araştırmada, elde ettikleri 146 örneğin % 54,1 oranında *Listeria* türleri ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen izolatların % 6,16'sının ise *L. monocytogenes* olarak tanımlanmış olduğunu rapor etmişlerdir.

Berktaş ve ark. (2006), Van ilinde satışa sunulan 100 kıyma, 50 parça et, 25 sucuk, 25 salam, sosis ve 25 pastırma örneğinde *L. monocytogenes*'in prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kıyma örneklerinin % 15,07; parça etlerin % 21,6; sucukların % 31,6; salamların % 0; sosislerin % 27,3 ve pastırmaların % 50'sinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Çolak ve ark. (2007), İstanbul'da satışa sunulan 300 adet fermente Türk sucuğunun % 21'inin *Listeria* türleri ile bulaşık olduğunu, elde edilen izolatların da % 11,6'sının *L. monocytogenes* olarak tanımlanmış olduğunu rapor etmişlerdir.

Akkaya ve ark. (2008a), sığır karkaslarında *L. monocytogenes* prevalansının belirlenmesi amacıyla Afyonkarahisar ili kesimhanelerinde yapmış oldukları bir araştırmada, 250 sığır karkasının % 6,8 oranında *L. monocytogenes* ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

2.7. Modifiye Atmosfer Paketleme

Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanan gıdalar doğal halde anabolik reaksiyonlarını gerçekleştirmektedir ancak hasat ve kesim sonrası anabolik reaksiyonlar yerini katabolik reaksiyonlara bırakmakta ve gıdalarda ortamın oksijeninin de indirici etkisiyle bozulmalar meydana gelmektedir. Bu yıkım reaksiyonlarında gıdaların yapıtaşları karbonhidrat, protein ve yağlar hızla parçalanmakta ve CO₂ ve H₂ oluşumu meydana gelmektedir. Gıda işlemenin temel amacı bu parçalama işlemi kesmek veya yavaşlatmaktır. Bu amaçla gıdaların muhafazasında dondurma, ışınlama, ısıl işlem uygulama vb. teknikler kullanılmakta ve bu sayede biyolojik ve

mikrobiyolojik bozulmaların önemli ölçüde azaltılmaktadır. Ancak tüm bu işlemler gıdanın yapısında değişikliklere yol açabilmektedir (Brody, 1989).

Günümüzde tüketicilerin tercihi doğrultusunda gıdaların doğal yapısını koruyarak katkı maddeleri ve koruyucuları ilave etmeksizin doğal katkıların kullanımı ve raf ömrünü uzatılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır. Bu nedenle gıdalarda oluşan katabolik reaksiyonları azaltmak amacıyla gıdanın etrafını saran atmosferin değiştirilmesiyle elde edilen Modifiye Atmosfer Paketleme (MAP) yöntemi kullanılmaktadır. MAP paketlemede, paketin içerisinde gaz fiziksel olarak hareket ettirilmekte ve ortam yeni bir gaz karışımı ile doldurulmaktadır (Coulon ve Louis, 1989).

Modifiye atmosfer paketlemenin raf ömrü üzerindeki etkisi; ürün tipine, taze materyalin başlangıç kalitesine, gaz karışımına, depolama sıcaklığına, işleme ve paketleme esnasında hijyene, gaz/ürün hacim oranına ve paketleme materyalinin koruma özelliklerine bağlıdır (Sivertsvik ve ark., 2002; Sivertsvik ve ark., 2004).

Paketleme de kullanılan gaz karışımlarının doğru seçimi önemli noktayı oluşturmaktadır (Coulon ve Louis, 1989). Modifiye atmosfer paketlemede kullanılan 3 tip gaz; O₂, N₂ ve CO₂'dir. Bu gazların iki veya üç farklı kombinasyonu ürün ihtiyacına göre seçilerek kullanılır. Genellikle solunum yapmayan ürünler için, mikrobiyal gelişimin olduğu yer en önemli bozulma parametrisidir. % 30-60 CO₂ kalanı saf N₂, hassas ürünler için O₂ veya N₂ ve O₂ kombinasyonu kullanılır. Solunum yapan ürünler için % 5 CO₂ ve O₂ ve kalan kısmı N₂ solunum oranını minimize edebilmek için kullanılır.

Diğer bazı gazlar karbonmonoksit (kırmızı rengin sağlanmasında), ozon, etilen oksit, nitrous oksit, helyum, neon, argon, propilen oksit, etanol, hidrojen, sülfürdioksit ve klorin çoğu ürünün raf ömrünü artırmak için kullanılmakta buna karşın bu gazların kullanımının ekonomik olmaması yanısıra duyu kalite kayıplarına da neden olmaktadır (Sivertsvik ve ark., 2002). Ayrıca etilen oksit, nitrous oksit ve diğer

bakterisidal veya bakteriostatik gazların taze balıkların korunmasında toksik özellikleri nedeniyle uygun olmadığı belirtilmiştir (Brody, 1989).

2.8. MAP ile Paketlenmiş Gıdalarda *Listeria monocytogenes*

Gill ve Reichel (1989), % 100 CO₂ ile paketlenmiş kırmızı ette 5 °C veya daha düşük sıcaklıkta *L. monocytogenes*'in çoğalmasının durduğunu bildirmiştir. Ayrıca 10 °C' de ise *L. monocytogenes*'in gelişemediğini tespit etmiştir.

Beumer ve ark. (1996), yapay olarak *L. monocytogenes* ile kontamine edilen dilimlenmiş salam, jambon ve tavuk göğüs etlerinde 4-6 haftalık sürede mikrobiyal gelişimi izlemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre vakum paketlenme ile modifiye atmosfer paketlenme (%30 CO₂, %70 N₂) yöntemleri arasında *L. monocytogenes* açısından istatistiki bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir.

Barakat ve Harris (1999), *L. monocytogenes* (1,000 CFU/150-g) ile enfekte ettikleri pişirilmiş tavuk eti parçalarını 44:56 CO₂-N₂ ile paketlenerek 3.5, 6.5, ve 10 °C'de 5 hafta süre ile depolamışlar, sonuç olarak tüm test gruplarında *L. monocytogenes*'in ürediğini, bu paketlenme yönteminin *L. monocytogenes* gelişimini engelleyemediğini bildirmişlerdir.

Tsigarida ve ark. (2000), farklı yöntemler ile paketlenmiş ve 5 °C'da depolanmış etlerdeki *L. monocytogenes* davranışlarını inceledikleri çalışmada; hava ile paketlenme, MAP (yüksek CO₂ geçirgen filmlili), MAP (düşük CO₂ geçirgen filmlili), vakum (yüksek CO₂ geçirgen filmlili) ve vakum (düşük CO₂ geçirgen filmlili) paketlenme yöntemlerindeki *L. monocytogenes* miktarını sırasıyla 6,37; 4,84; 2,84, 5,36 ve 3,69 log₁₀ cfu/g olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak paketlenme yönteminin *L. monocytogenes* üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırma için en iyi paketlenme yönteminin düşük CO₂ geçirgen filmlili modifiye atmosfer paketlenme olduğunu bildirmişlerdir.

Whitley ve ark. (2000), MAP yöntemi ile paketlenmiş peynirlerde *L. monocytogenes*'in gelişimini arştırdıkları çalışmada, kob sayısının % 80 N₂, %10 CO₂ ve %10 O₂ ile paketlenmede % 2300, % 100 N₂, % 0 CO₂ ve % 0 O₂ ile paketlenmede %

350 oranında arttığını, ancak % 80 N₂, % 20 CO₂, % 0 O₂ ile paketlemede % 17 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

Olarte ve ark. (2002), MAP ile paketlenmiş keçi peynirlerindeki *L. monocytogenes* varlığını araştırdıkları çalışmada; modifiye atmosfer paketlemenin *L. monocytogenes* varlığını kontrol etmek için uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varmışlardır.

Garcia-Esteban ve ark. (2004), dilimlenmiş jombonları vakumlama, % 100 N₂ ve % 20 CO₂ + % 80 N₂ ile paketlenerek 8 hafta depolamamışlardır. Depolama başlangıcı ve sonunda yapılan mikrobiyolojik analizlerde hiçbir örnekte *L. monocytogenes* tespit etmemişlerdir.

Rutherford ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada farklı yöntemlerle (hava, vakum, MAP) paketlenmiş karidesleri farklı sıcaklıklarda (3, 7 ve 12 °C) 15 gün süre ile depolamışlardır. Tüm sıcaklıklarda modifiye atmosfer paketleme yöntemi ile paketlenmiş örneklerdeki *L. monocytogenes* varlığını düşük bulmuşlardır. Sonuç olarak *L. monocytogenes*'in kontrolünde en iyi yöntemin 3 °C'de modifiye atmosfer paketleme yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

Yılmaz ve Güneş (2008), yaptıkları çalışmada ışınlamanın ve hava paketleme koşullarının 4 °C'de depolanmış pişirmeye hazır köftelerde *L. monocytogenes* üzerine etkileri araştırmışlardır. Işınlama *L. monocytogenes* üzerinde önemli düzeyde inaktivasyon sağlamıştır. *L. monocytogenes* 3 kGy dozda ışınlamayla tespit sınırının (>10² kob/g) altına inmiştir. *L. monocytogenes* için D10-değerini hava atmosferli paketlerde 0,39 kGy; MAP'de 0,41 kGy olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak hava atmosferli paketlerde ışınlamanın patojen inaktivasyonunu MAP'ye göre az da olsa artırmıştır olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

Bu çalışmada Mayıs-Ekim 2013 tarihleri arasında Samsun il merkezinde bulunan market ve kasaplardan temin edilen toplam 100 adet MAP sığır et ürünü (50 kıyma, 50 kuşbaşı) materyal olarak kullanıldı. Örnekler her ay 20'şer adet olmak üzere 5 ay boyunca periyodik olarak temin edildi. En az 500 g olarak satın alınan numuneler, soğuk zincir altında mümkün olan en kısa sürede laboratuvara getirilerek analize alındı.

3.1.1. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Malzemeler

Half Fraser Broth

Fraser Broth Base (Oxoid, CM0895)

Fraser Supplement (Oxoid, SR0156)

Half Fraser Supplement (Oxoid, SR0166)

Hazırlanışı: Selektif ön zenginleştirme aşamasında kullanılmak üzere hazır besiyerinden 57,4 g tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü ve pH değeri 7,2 ± 0,2 olarak ayarlandı. Daha sonra besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besi yeri 50 °C'ye kadar soğutuldu ve 1'er ml steril su ile sulandırılan 1 vial Fraser Supplement eklendi.

Dynabeads® anti-*Listeria* (710.06 Dynal Biotec, Oslo - Norveç)

İnvitrogen firmasından temin edilen 5 ml ve 250 testlik Dynabeads® anti-*Listeria* üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanıldı.

Phosphate Buffered Saline Tween 20 (Sigma, P3563) (0.05%; pH 7,4; 25 °C)

NaCl 0,138 M

KCl 0,0027 M

Tween 20 % 0,05 w/v

pH 7,4

Hazırlanışı: 1 paket toz PBS-Tween 200 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve 121 °C’de 15 dakika steril edildi. IMS işleminde kullanılmak üzere 4 °C’de muhafaza edildi.

Modifiye Oxford Agar

Listeria Selective Agar (Oxoid, CM0856)

Modified Listeria Selective Supplement (Oxoid, SR0206)

Hazırlanışı: Besiyerinden 27,75 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürüldü, pH değeri $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Su banyosunda 95 °C’de eritildi. Daha sonra besiyeri otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50 °C’ye kadar soğutulurak 2,5 ml steril distile su ve 2,5 ml etil alkol (% 70) ile suspanse edilmiş 1 vial Modified Listeria Selective Supplement eklendi. Daha sonra steril plastik petrilere döküldü ve 4 °C’de muhafaza edildi.

Tryptic Soy Agar Yeast Extract (TSA-YE)

Tryptic Soy Agar (Fluka, 22091, St. Gallen-İsviçre)

Yeast Extract (Oxoid, LP0021, Hampshire-İngiltere)

Hazırlanışı: Tryptic Soy Agar besiyerinden 20 g ve Yeast Extract’dan 3 g (% 0,6) tartıldı ve 500 ml distile suda çözündürüldü, pH değeri $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlandı ve su banyosunda 95 °C’de eritildi. Daha sonra besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50 °C’ye kadar soğutuldu. Steril plastik petrilere döküldü ve 4 °C’de muhafaza edildi.

3.1.2 *Listeria monocytogenes* izolatlarının PCR ile Doğrulanmasında Kullanılan Kimyasallar

Taq DNA Polymerase Seti (Sigma, D4545)

Taq DNA Polymerase 500 U

10X Reaction Buffer

25mM MgCl₂

dNTP Mix (Sigma, D7295)

dNTP Mix 10mM

BHI Broth (Oxoid, CM 1135)

Hazırlanışı: 37 g BHI broth 1 litre distile su içerisinde çözöldü. İyice karıştırılarak tüplere alındı. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi.

3.1.3 *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Kullanılan Malzemeler

Mueller Hinton Agar

Mueller Hinton Agar (Oxoid, CM 0337)

Hazırlanışı: Besiyerinden 19 g tartıldı ve 500 ml distile su içerisinde çözöndüröldü. pH değeri $7,3 \pm 0,2$ olarak ayarlandıktan sonra su banyosunda 95 °C’de eritildi. Daha sonra besiyeri otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan besi yeri 45 °C’ye kadar soğutuldu. Steril plastik petrilere dököldü ve 4 °C’de muhafaza edildi.

Antibiyotik Diskleri

Amoksisilin/Klavulanik asit	(Oxoid, CT0223)
Ampisilin	(Oxoid, CT0003B)
Kloramfenikol	(Oxoid, CT0013B)
Eritromisin	(Oxoid, CT0020B)
Oksitetrasiklin	(Oxoid, CT0041)
Penisilin G	(Oxoid, CT0043B)
Tetrasiklin	(Oxoid, CT0054B)
Vankomisin	(Oxoid, CT0058B)

3.2. METOT

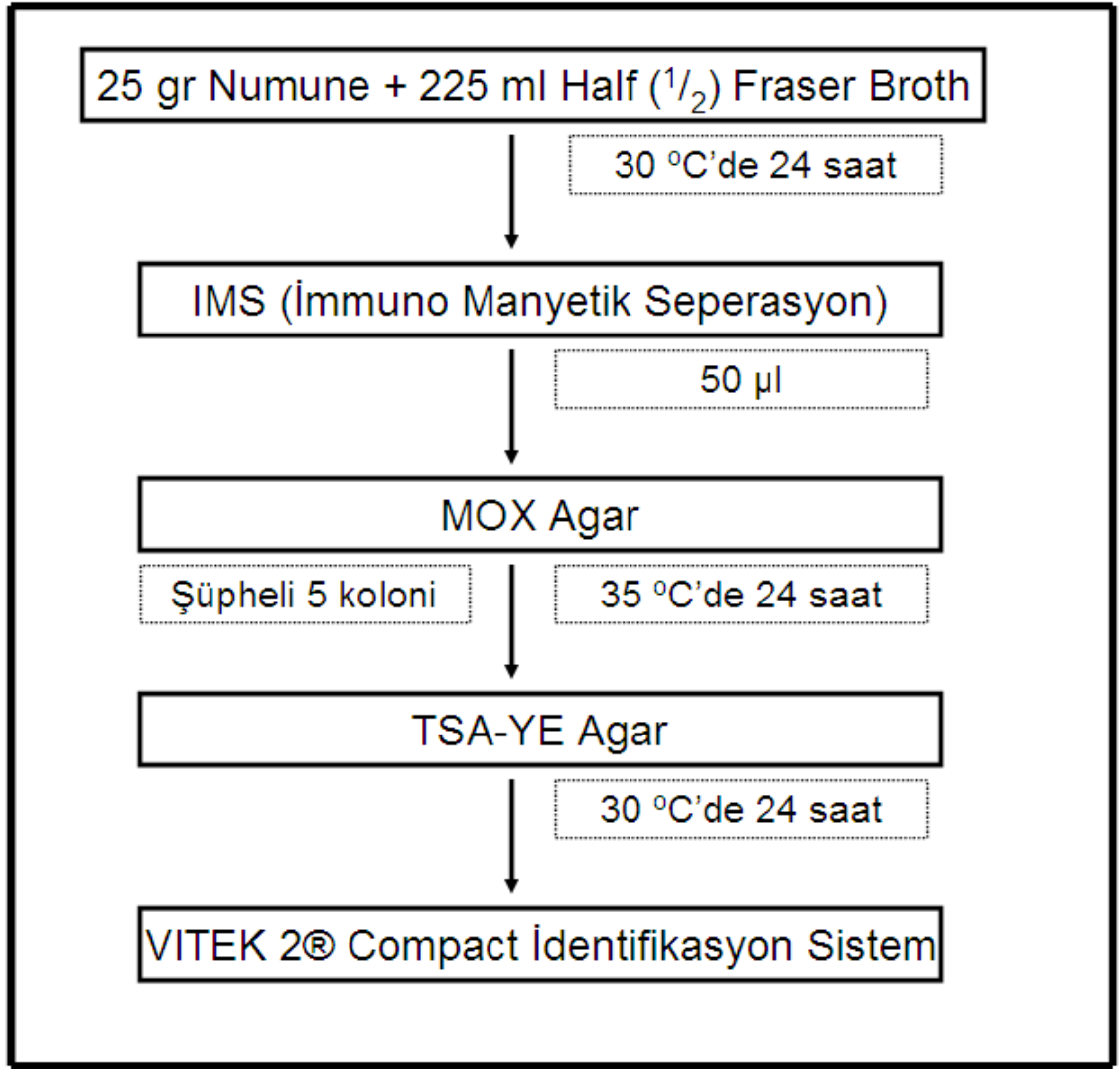
Laboratuvara soğuk zincir altında getirilen MAP paketli sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerindeki *L. monocytogenes* varlığının araştırılmasında IMS (Immunomagnetik separasyon) bazlı klasik kültür tekniğı, identifikasyonda Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem, konfirmasyon ve serotiplendirmede ise PCR yöntemi kullanıldı. Daha sonra doğrulanmış *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik

dirençlilik profillerinin belirlenmesi amacıyla CLSI (2012), tarafından bildirilen disk difüzyon testi kullanıldı.

3.2.1. *Listeria monocytogenes*'in İzolasyonu

Bu çalışmada MAP paketli sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *L. monocytogenes*'in izolasyonu amacıyla ISO 11290-1 (The International Standards Organization- Uluslararası Standartlar Organizasyonu) (Anon, 1995) ve Dynal (Anon, 1996) tarafından önerilen IMS bazlı kültür tekniği ile Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem (Pincus, 2010) kullanıldı (Şekil 1).





Şekil 1. *L. monocytogenes*'in izolasyon ve identifikasyon şeması

3.2.2. Ön Zenginleştirme

Soğuk zincir altında ve laboratuara getirilen et örneklerinden aseptik koşullarda 25 g tartılarak 225 ml Half Fraser Broth (Oxoid, CM 895, SR 156,Hampshire, UK) ile sulandırıldı ve stomacherde (Interscience Bagmixer 400) orta hızda 90 saniye homojenize edildi. Daha sonra 30 °C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı (Anon, 1995).

3.2.3. İmmuno Manyetik Seperasyon (IMS)

Ön zenginleştirme işlemini takiben, üretici firmanın talimatları çerçevesinde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine vorteks ile homojenize edilmiş immunomanyetik mikropartikül solüsyonundan (Dynabeads anti-Listeria 710.06) 20'şer µl konuldu ve tüpler manyetik çubuğu çıkartılmış Dynal manyetik parçacık portüpüne (MPC-S) yerleştirildi. Daha sonra üzerine Half Fraser Broth'da (Oxoid, CM895-SR156) ön zenginleştirilmesi yapılan homojenattan 1 ml ilave edildi ve tüplerin ağzı kapatıldı. Karışım 5 kez alt üst edikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika Dynal MX sample mixer (Şekil 2) ile orta hızda sürekli karıştırılarak inkübe edildi. Bu aşamada örneklerde bulunabilecek *Listeria*'ların spesifik antijen-antikor reaksiyonu ile dynabeadslere bağlanması sağlandı. Bu işlemi takiben Dynal manyetik parçacık portüpünün arka kısmına manyetik çubuk yerleştirildi ve oluşan manyetik alanın etkisiyle, *Listeria* türleri ile bağlanan dynabeadslerin mikrosantrifüj tüplerinin iç arka yüzüne yapışması sağlandı. Üç dakikalık bekleme aşamasından sonra manyetik olarak bağlanmamış olan kısım mikropipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra manyetik plak portüpten ayrıldı. Manyetik çubuğun ayrılmasından sonra tüplere 1 ml steril PBS-Tween 20 yıkama sıvısı eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika Dynal MX sample mixer ile orta hızda sürekli karıştırılarak ikinci kez inkübe edildi. Daha sonra Dynal manyetik parçacık portübünün arkasına manyetik plak tekrar takıldı ve 3 dakika beklendi. Manyetik olarak bağlanmamış olan kısım mikropipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı. Son olarak dynabeads-Listeria karışımı 100 µl steril PBS- % 0,005 Tween 20 (pH 7,4) içinde süspanse edildi ve süspanse edilen bu dynabeads-Listeria karışımından 50 µl selektif katı agara (Modified Oxford Agar; Oxoid, CM 856- SR 206) drigalski çubuğu ile ekildi (Anon, 1996).



Şekil 2. İmmuno magnetik separasyon cihazı

3.2.4. Katı Besi Yerine Ekim

IMS işlemi sonucunda elde edilen 100 µl Dynabeads-Listeria kompleksinden 50 µl MOX (Modified Oxford Agar; Oxoid, CM856-SR 140) agara ekim yapıldı ve plaklar 35 °C'de 24 - 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası plaklarda üreyen yaklaşık 1-2 mm çaplı, orta kısmı çökük (simit şeklinde), koyu kahverengi etrafı siyah haleli olan tipik kolonilerden 5 adet seçilerek biyokimyasal testler yapılmak üzere, TSA-YE'ye (Tryptic Soy Agar-Yeast Extract, Fluka, 22091, Oxoid, LP0021) steril plastik özeler kullanılarak ekildi ve plaklar 30 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı (Anon, 1995).



Şekil 3. MOX agar görüntüsü

3.2.5. *Listeria monocytogenes*'in Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) Otomatik İdentifikasyonu

TSA-YE'de üreyen kolonilere Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem ile konfirmasyona gidildi. Bu amaçla üretici firmanın protokolü doğrultusunda TSB-YE'de üretilen 24 saatlik taze kültürler içerisinde 3 ml steril % 0.5 tuzlu su içeren tüplere alınarak bulanıklığı McFarland dansitometre cihazı ile 0,5 McFarland'a (10^8 kob/ml) turbitideye ayarlandı. Turbitidesi ayarlanmış tüplerden Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem protokolünde yer alan 64 gözlü GP (Gram-positive cocci and non-spore-forming bacilli) reagent kartlarına (Şekil 5) inokulasyon yapıldıktan sonra, reagent kartlar kaset içerisinde Vitek 2 Compact otoanalizatöre konuldu (Şekil 4). Otoanalizatör içerisinde $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk'lık inkubasyonun ardından protokolün software programına göre identifikasyon tamamlandı. İdentifikasyon prosesinde, üretici firmanın dizaynında yer alan ve kart gözlerinde ki etkene ait çeşitli metabolik aktivitelere bağlı oluşan reaksiyonlar sonucu oluşan renk kombinasyonlarına göre değerlendirmeler yapıldı (Pincus, 2010), (Şekil 6).



Şekil 4. VITEK 2 Otoanalizör



Şekil 5. VITEK 2 reagent kart örneği

Tablo 5. VITEK 2 reagent kart içeriği

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	D-AMYGDALIN	AMY	0.1875 mg
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPAS E C	PIPLC	0.015 mg
5	D-XYLOSE	dXYL	0.3 mg
8	ARGININE DIHYDROLASE 1	ADHI	0.111 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
11	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	APPA	0.384 mg
14	CYCLODEXTRIN	CDEX	0.3 mg
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE	AspA	0.024 mg
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASEE	BGAR	0.00204 mg
17	ALPHA-MANNOSIDASE	AMAN	0.036 mg
19	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
20	Leucine ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
24	BETA GLUCURONIDASE	BGURr	0.0018 mg
25	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
26	L-Pymolidonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0.0378 mg
28	Alanine ARYLAMIDASE	AlaA	0.0216 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	POLYMIXIN B RESISTANCE	POLYB	0.00093 mg
37	D-GALACTOSE	dGAL	0.03 mg
38	D-RIBOSE	dRIB	0.03 mg
39	L-LACTATE alkalization	ILATk	0.15 mg
42	LACTOSE	LAC	0.96 mg
44	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	NAG	0.3 mg
45	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
46	BACITRACIN RESISTANCE	BACI	0.0006 mg
47	NOVOBIOCIN RESISTANCE	NOVO	0.000075 mg
50	GROWTHIN 6.5% NaCl	NC6.5	1.68 mg
52	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
53	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
54	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE	MBdC	0.3 mg
56	PULLULAN	PUL	0.3 mg
57	D-RAFFINOSE	dRAF	0.3 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp. Vibrio.)	O129R	0.0084 mg
59	SALICIN	SAL	0.3 mg
60	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
62	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
63	ARGININE DIHYDROLASE 2	ADH2s	0.27 mg
64	OPTOCHIN RESISTANCE	OPTO	0.000399 mg

3.2.6. *Listeria monocytogenes*'in PCR ile Doğrulanması

Çalışmada biyokimyasal testler sonucu *L. monocytogenes* pozitif veya şüpheli olarak tespit edilen izolatların PCR ile doğrulanması amacıyla Bohnert ve ark. (1992) tarafından dizayn edilen *hlyA* primerleri kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 6. *hlyA* primer dizileri (Bohnert ve ark., 1992)

Hedef gen	Primer	PCR ürünü (bp)
<i>hlyA</i>	F: GAATGTAAACTTCGGCGCAATCAG R: GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC	388 bp

3.2.7. Genomik DNA Ekstraksiyonu

İdentifikasyonu tamamlanan izolatların DNA ekstraksiyonu kaynatma metoduna göre yapıldı. Buna göre izolatlar BHI broth (Oxoid, CM 0225) içerisinde 37 °C'de 24 saat inkube edildi ve buradan 1 ml alınarak steril ependorf tüplerine aktarılıp 10,000×g'de 5 dk santrifüj edildi daha sonra süpernatant tatlılarak 500 µl PBS ilave edilip 95 °C'lik su banyosunda 10 dakika süreyle bekletildi, süre sonunda tekrar 10,000×g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant templete DNA olarak PCR işlemi yapılana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.8. PCR Amplifikasyonu ve Elektroforez

hlyA geni için PCR karışımı, toplam 50 µl hacimde 1X PCR Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase (Sigma, D4545), her primerden 1 µM ve 5 µl DNA olacak şekilde hazırlandı. *hlyA* geni amplifikasyonu Thermal Cycler'da (Bio-Rad MJ mini Gradient CA - USA) koşulları ise 94 °C'de 5 dakika ilk denatürasyon ve 35 siklüs, 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 65 °C'de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 45 saniye primer uzaması ve 72 °C'de 5 dakika son uzama olarak gerçekleştirildi (Bohnert, 1992). Elde edilen ampliconların elektroforez işlemi % 2'lik agaroz içinde 80 volt akımda gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi Bio-Rad PowerPac Basic Power Supply (CA-USA) güç kaynağı ve Bio-Rad Wide Mini Sub-Cell GT Cell

(CA-USA) elektroforez tankında gerçekleştirildi. Elektroforez sonunda *hlyA* geni UV-transilluminatörde 388 bp’de görüntüldü.

3.2.9. Serotiplendirme

L. monocytogenes izolatlarının serotiplendirilmesi amacıyla Doumith ve ark. (2004) tarafından dizayn edilen 1/2a (3a), 1/2b (3b), 1/2c (3c) ve 4b (4d, 4e) serotiplerine ait primer dizileri kullanıldı (Tablo 6-7)

Tablo 7. *L. monocytogenes* serotiplerine ait primer dizilimleri (Doumith ve ark., 2004)

Hedef Gen	Primer Dizilimi	PCR ürünü (bp)	Serotip
<i>Imo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1/2a, 1/2c, 3a, 3c
<i>Imo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCCGCATACTTA	906	1/2c, 3c
<i>ORF2819</i>	F: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTC	471	1/2b, 3b, 4b, 4e, 4d
<i>ORF2110</i>	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	4b, 4e, 4d

Tablo 8. *L. monocytogenes* serotiplerinin sahip olduğu gen bölgeleri

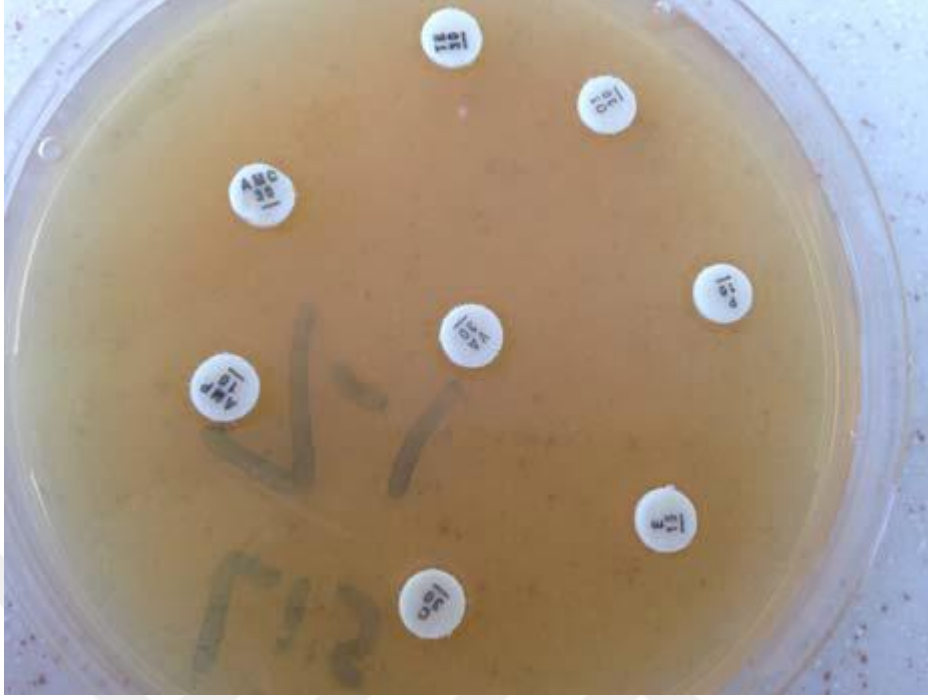
<i>L. monocytogenes</i> serotipleri										
Hedef Gen		1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4b	4e	4d
<i>Imo0737</i>	(691 bp)	+		+	+		+			
<i>Imo1118</i>	(901 bp)			+			+			
<i>ORF2819</i>	(471 bp)		+			+		+	+	+
<i>ORF2110</i>	(597 bp)							+	+	+

3.2.10. PCR Amplifikasyonu ve Elektroforez

Serotiplendirme için PCR karışımı, toplam 50 µl hacimde 1X PCR Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 0,5 U Taq-Polymerase, her primerden 1 µM ve 5 µl DNA olacak şekilde hazırlandı. Serotiplendirme de kullanılacak genler için amplifikasyon koşulları Thermal Cycler'da 94 °C'de 5 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 45 saniye toplam 35 siklus ve 72 °C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde programlandı. Primer dizilimlerinin farklı bağlanma ısılarına göre program yeniden düzenlendi ve optimize edildi. Primer bağlanma dereceleri *ORF2819* için 55 °C, *ORF2110* için 57 °C, *Imo0737* için 57 °C, *Imo1118* için 55 °C olarak ayarlandı. Amplifikasyon işlemi önce tek tek yapıldı. Daha sonra *ORF2819* ile *ORF2110* primerleri ve *Imo0737* ile *Imo1118* primerleri multiplex olarak 56 °C'de amplifiye edildi. Elde edilen ampikonlar elektroforez işlemi için % 2'lik agaroz içinde 80 volt elektrik akımı uygulandı. UV-transilluminatörde *ORF2819* geni 471 bp, *ORF2110* geni 597 bp, *Imo0737* geni 691 bp ve *Imo1118* geni 906 bp'de görüntülendi. Elektroforez sonucunda bir izolat yalnızca *Imo0737* pozitif ise 1/2a veya (3a), hem *Imo0737* hem de *Imo1118* pozitif ise 1/2c veya (3c), yalnızca *ORF2819* pozitif ise 1/2b veya (3b), hem *ORF2819* hem de *ORF2110* pozitif ise 4b veya (4e, 4d) olarak değerlendirildi.

3.2.11. Antibiyotik Dirençlilik Testleri

Elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik profilleri disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla TSB-YE'de üretilen 24 saatlik taze kültürler McFarland dansitometre cihazı ile 0,5 McFarland'a (10⁸ kob/ml) turbiditeye ayarlandı ve bu suspansiyon Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM337) üzerine steril bir eküvyon ile ekildi. Daha sonra petriyer oda sıcaklığında 10-15 dakika kurutuldu ve her bir petriye birbirlerine eşit mesafede olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirildi (Tablo 8). Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesini takiben petriyer 35 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerinin etrafındaki inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü (Şekil 7). Elde edilen zon çapları, CLSI (2012)'deki standartlar ile karşılaştırılarak suşlar antibiyotiklere karşı duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak sınıflandırıldı (Anon, 2012).



Şekil 6. Mueller-Hinton Agar'da antibiyotik dirençlilik zon oluşumu

Tablo 9. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri ve dozları

Antibiyotik Diski	Sembolü	Dozu
Amoksilin/Klavulanik asid	AMC	30µg
Ampisilin	AMP	10µg
Kloramfenikol	C	30µg
Eritromisin	E	15µg
Oksitetrasiklin	OT	30µg
Penisilin G	PG	10µg
Tetrasiklin	TE	30µg
Vankomisin	VA	30µg

4. BULGULAR

Bu çalışmada Samsun ilinde satışa sunulan Modifiye Atmosfer Paketli (MAP) sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *L. monocytogenes*'in tespiti, PCR ile doğrulanması, serotiplendirilmesi ve antibiyotik dirençlilik profillerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmamızda Mayıs 2013- Kasım 2013 tarihleri arasında Samsun il merkezi'nde bulunan kasap ve marketlerden alınan toplam 100 (50 sığır kıyma- 50 sığır kuşbaşı) adet MAP sığır et ürünü materyal olarak kullanıldı. Örneklerden *L. monocytogenes* varlığının araştırılmasında IMS (Immunomagnetik separasyon) bazlı klasik kültür tekniği, identifikasyonda Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem ile konfirmasyon ve serotiplendirmede ise PCR yöntemi kullanıldı. Daha sonra doğrulanmış *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amacıyla CLSI (2012) tarafından bildirilen disk difüzyon testi kullanıldı.

4.1. IMS Bazlı Kültür Tekniği ile Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) Otomatik İdentifikasyon Sistem Sonuçları

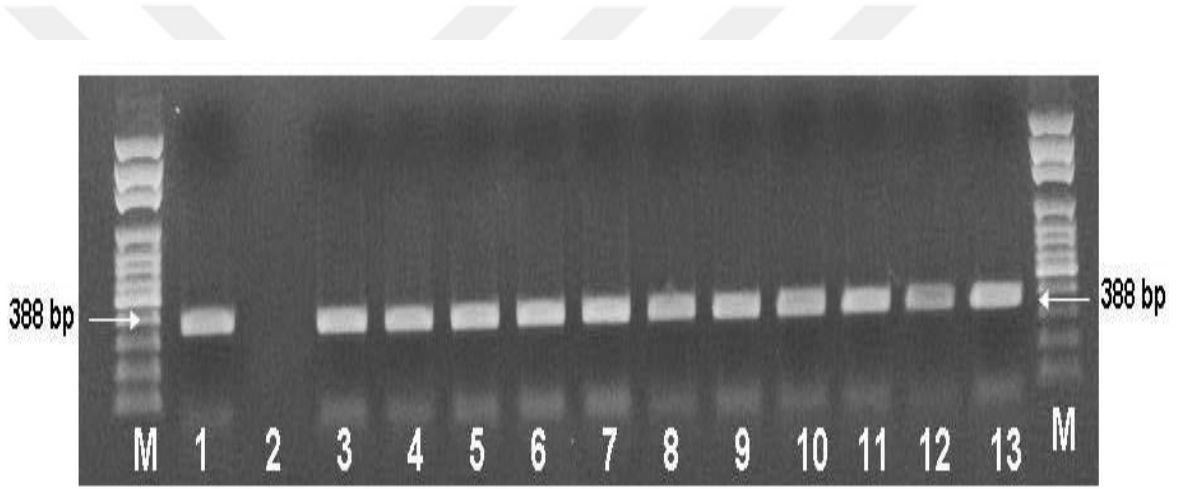
Analiz edilen 50 MAP sığır kıyma örneğinin 5'inin (% 10), 50 MAP sığır kuşbaşı örneğinin ise 3'ünün (% 6) *L. monocytogenes* yönünden pozitif olduğu belirlendi. Elde edilen 11 izolatın tamamının *hlyA* genine sahip olduğu belirlendi (Tablo 10).

Tablo 10. MAP sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde tespit edilen *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* türlerinin numune bazında dağılımı ve izolat sayıları

Numune	Numune Sayısı (n)	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
		(+) numune/oran	(+) izolat sayısı	(+) numune/oran	(+) izolat sayısı
MAP sığır kıyma	50	17 (% 34)	70	5 (% 10)	8
MAP sığır kuşbaşı	50	15 (% 30)	42	3 (% 6)	3
TOPLAM	100	32 (% 32)	112	8 (% 8)	11

4.2. İzolatların PCR ile Doğrulanması

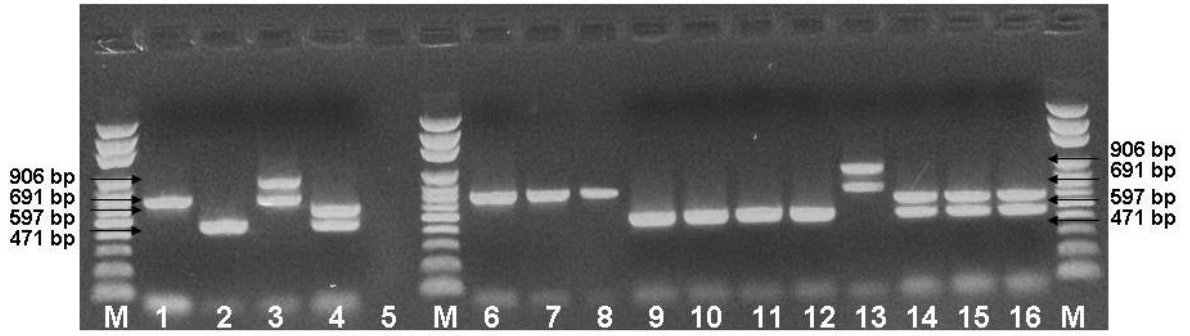
Çalışmamızda, IMS bazlı klasik kültür tekniği ile *L. monocytogenes* olarak identifiye edilen izolatları doğrulamak amacıyla *hlyA* geninin varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı (Bohnert ve ark., 1992). Bu amaçla yapılan analizler sonucunda MAP sığırcıya ve kuşbaşı örneklerinden elde edilen 11 *L. monocytogenes* izolatının tamamının (% 100) bu gene sahip olduğu belirlendi ve *L. monocytogenes* olarak doğrulandı (Şekil 7).



Şekil 7: PCR elektroforez görüntüsü [M: 100 bp DNA marker, **sütun 1:** *L. monocytogenes* pozitif kontrol (*L. monocytogenes* RSKK 471), **sütun 2:** Negatif kontrol **sütun 3-10:** *L. monocytogenes* pozitif MAP sığırcıya numune izolatları **sütun 11-13:** *L. monocytogenes* pozitif MAP sığırcıya numune izolatları]

4.3. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Serotiplendirilmesi

PCR ile doğruladığımız *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirilmesi amacıyla Doumith ve ark. (2004) tarafından geliştirilen *Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819* ve *ORF2110* primer dizileri kullanıldı. İzolatların bu genleri bulundurma durumuna göre serotiplendirilmeleri yapıldı (Tablo 11). PCR işlemi sonunda elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 8: Multipleks PCR elektroforez görüntüsü

[M: 100 bp DNA marker, **sütun 1:** *L. monocytogenes* pozitif kontrol serotip 1/2a, 691 bp (*L. monocytogenes* RSKK 471), **sütun 2:** *L. monocytogenes* pozitif kontrol serotip 1/2b, 471 bp (*L. monocytogenes* RSKK 472), **sütun 3:** *L. monocytogenes* pozitif kontrol serotip 1/2c, 691-906 bp (*L. monocytogenes* ATCC 7644), **sütun 4:** *L. monocytogenes* pozitif kontrol 4b, 471-597 bp (*L. monocytogenes* RSKK 475), **sütun 5:** Negatif kontrol, **sütun 6-8:** Serotip ½ a izolatları, **sütun 9-12:** Serotip 1/2 b izolatları, **sütun 13:** Serotip 1/2 c izolati, **sütun 14-16:** Serotip 4b izolatları]

L. monocytogenes izolatlarının serotiplendirilmesinde Doumith ve ark. (2004) tarafından bildirilen yöntemle göre yapılan değerlendirmede Şekil 9’de görüldüğü gibi 691 bp’de bant veren izolatlar 1/2a (veya 3a), 471 bp’de bant veren izolatlar 1/2b (veya 3b), 691 ve 906 bp’de çift bant veren izolatlar 1/2c (veya 3c), 471 ve 597 bp’de çift bant veren izolatlar 4b (veya 4d, 4e) olarak değerlendirildi. Yapılan bu değerlendirmeler sonucunda MAP sığır kıyma örneklerinden elde edilen 8 izolatın 3’ünün *L. monocytogenes* 1/2a, 3’ünün *L. monocytogenes* 1/2b, 2’sinin ise *L. monocytogenes* 4b, olduğu belirlendi. MAP sığır kuşbaşı örneklerinden elde edilen 3 izolattan ise 1’inin *L. monocytogenes* 1/2b, 1’inin *L. monocytogenes* 1/2c ve 1’inin de *L. monocytogenes* 4b olduğu tespit edildi. (Tablo 11).

Tablo 11. Elde edilen *L. monocytogenes* izolatların patojenik serotip dağılımı

Numune Sayısı	IMS+ Klasik kültür ve VITEK 2® tekniği kullanılarak saptanan <i>L. monocytogenes</i> pozitif izolat sayısı	PCR tekniği kullanılarak belirlenen <i>L. monocytogenes</i> pozitif izolat sayısı (<i>hlyA</i> gen bölgesi üzerinden)	PCR tekniği kullanılarak belirlenen <i>L. monocytogenes</i> serotipleri ve sayıları			
			1/2a (3a)	1/2b (3b)	1/2c (3c)	4 b (4d, 4e)
MAP sığır kıyma (n:50)	8	8	3	3	-	2
MAP sığır kuşbaşı (n:50)	3	3	-	1	1	1
TOPLAM (n:100)	11	11	3	4	1	3

4.4. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

Çalışmamızda PCR ile doğrulanan 11 *L. monocytogenes* izolatının antibiyotik dirençlilik testleri disk difüzyon metodu ile yapıldı. Antibiyotik dirençlilik testleri sonucunda elde edilen 11 izolatın, 1'inin ampisiline, 2'sinin kloromfenikole, 3'ünün eritromisine, 4'ünün oksitetrasikline, 4'ünün penisilin G'ye, 6'sının tetrasikline ve 3'ünün de vankomisine karşı dirençli olduğu belirlendi. Yapılan testler sonucunda 3 tanesinin (% 27,2) en az bir antibiyotiğe, 8 tanesinin ise (% 72,7) birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği belirlendi. Bunun yanı sıra örneklerden elde edilen izolatlarda amoksisilin/klavulanik asit antibiyotik dirençliliği saptanmadı. MAP paketli sığır kıyma örneklerine ait 8 izolatın 1 tanesi (% 12,5) ampisiline, 2 tanesi (% 25) kloromfenikole, 3 tanesi (% 37,5) eritromisine, 4 tanesi (% 50) oksitetrasikline, 4 tanesi (% 50) penisilin G'ye, 6 tanesi (% 75) tetrasikline, 3 tanesi (% 37,5) vankomisine dirençli bulundu. MAP paketli sığır kuşbaşı örneklerine ait 3 izolatın 1 tanesi (% 33,3) kloromfenikole, 3 tanesi (% 66,6) penisilin G'ye dirençli bulundu. Örneklerden elde edilen tüm *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları tablo 12'de gösterilmiştir.

4.5. *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik ve Serotiplerinin Dağılımları

L. monocytogenes serotiplerinin antibiyotik direnç dağılımlarına bakacak olursak; MAP paketli sığır kıyma örneklerinden elde edilen 3 adet *L. monocytogenes* 4b izolatının 3 tanesi (% 100) eritromisine, 2 tanesi (% 66,6) tetrasikline, 2 tanesi (% 66,6) vankomisine dirençli bulundu. Bunun yanı sıra bu 3 *L. monocytogenes* 4b izolatında amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, kloromfenikol, oksitetrasiklin ve penisilin G dirençliliği saptanmadı. Yine MAP paketli sığır kıyma örneklerinden elde edilen 3 adet *L. monocytogenes* 1/2b izolatının 1 tanesi (% 33,3) ampisiline, 2 tanesi (% 66,6) kloromfenikole, 3 tanesi (% 100) oksitetrasikline, 1 tanesi (% 33,3) penisilin G'ye, 2 tanesi (% 66,6) tetrasikline ve 1 tanesi de (% 33,3) vankomisine dirençli bulundu. Fakat bu izolatlarda amoksisilin/klavulanik asit ve eritromisin dirençliliği saptanmadı. Benzer şekilde MAP paketli Sığır kıyma örneklerinden elde edilen 2 adet *L. monocytogenes* 4b

izolatının 1 tanesi (% 50) oksitetrasikline, 1 tanesi (% 50) penisilin G'ye, 1 tanesi (% 50) tetrasikline dirençli bulundu. *L. monocytogenes* 4b izolatlarının hiçbirisi amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, Kloramfenikol, eritromisin ve vankomisine karşı direnç gelişimi göstermedi. Bununla beraber MAP paketli sığır kuşbaşı örneklerinden elde edilen 1 adet *L. monocytogenes* 1/2b izolatı ile 1 adet *L. monocytogenes* 1/2c izolatı (% 100) penisilin G'ye, 1 adet *L. monocytogenes* 4b izolatı ise (% 100) kloromfenikole dirençli bulunurken analiz edilen diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişimi gözlemlenmedi. Örneklerden elde edilen tüm *L. monocytogenes* serotiplerinin antibiyotik direnç dağılımları Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 12: *L. monocytogenes* serotipleri ile izolatların antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotik Dirençlilik	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a (İzolat no: Kıyma 52-1)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a (İzolat no: Kıyma 52-3)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a (İzolat no: Kıyma 52-5)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b (İzolat no: Kıyma 56-1)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b (İzolat no: Kıyma 74-1)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b (İzolat no: Kıyma 74-4)	<i>L. monocytogenes</i> 4b (İzolat no: Kıyma 33-4)	<i>L. monocytogenes</i> 4b (İzolat no: Kıyma 58-2)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c (İzolat no: Kuşbaşı 17-1)	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b (İzolat no: Kuşbaşı 60-2)	<i>L. monocytogenes</i> 4b (İzolat no: Kuşbaşı 62-1)
AMC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AMP	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
C	S	I	I	I	R	I	I	I	I	S	R
E	R	R	R	S	S	S	I	I	S	S	I
OT	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S
PG	S	S	S	R	I	S	R	S	R	R	S
TE	I	R	R	I	R	R	R	I	I	S	R
VA	R	S	R	S	S	R	I	S	S	I	I

AMC: Amoksisilin/Klavulanik asid (30 µg), **AMP:** Ampisilin (10 µg), **C:** Kloramfenikol (30 µg), **E:** Eritromisin (15 µg), **OT:** Oksitetrasiklin (30 µg), **PG:** Penisilin G (10 µg), **TE:** Tetrasiklin (30 µg), **VA:** Vankomisin (30 µg), **S:** Sensitive (Duyarlı), **I:** Intermediate (Yarı-dirençli-duyarlı), **R:** Resistance (Dirençli)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, örneklerden *L. monocytogenes* varlığının araştırılmasında IMS (Immunomagnetik separasyon) bazlı klasik kültür tekniği, identifikasyonda Vitek 2 Compact (*Bio Merieux*) otomatik identifikasyon sistem ile konfirmasyon, serotiplendirmede ise PCR yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra doğrulanmış *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi amacıyla CLSI (2012) tarafından bildirilen disk difüzyon testi uygulanmıştır. İmmuno manyetik separasyon (IMS) tekniğinin hücre süspansiyonlarından *Listeria* türlerinin ayrılmasında etkili bir yöntem olduğu, gıdalardan *L. monocytogenes*'in selektif tespitinde etkin olarak kullanılabilceği ve kültür tekniği ile beraber kullanılmasıyla izolasyon süresini önemli ölçüde kısaltmasının yanı sıra çalışmanın duyarlılığını attırdığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Safarik ve ark., 1995; Uyttendaele ve ark., 1999). Ayrıca PCR tekniğinin gıdalardan mikroorganizmaların saptanmasında başarılı bir şekilde kullanıldığı ve kültür tekniği ile tespit edilen *L. monocytogenes* izolatlarının doğrulanmasında etkin olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Wernars ve ark., 1991; Aznar ve Alarcon, 2003). Cordano ve Rocourt (2001), çeşitli gıdalarda (dondurma, beyaz peynir, kaşar, işlenmiş et ürünleri ve balık); Grady ve ark. (2008) ise beyaz peynir, et, süt, sebze ve balıklarda *L. monocytogenes* varlığını araştırdıkları çalışmalarında PCR tekniğini kullanmışlardır. Ayrıca Aznar ve Alarcon (2003), gıdalardan *L. monocytogenes* tespitinde PCR'in duyarlılığını etkileyen parametreleri araştırdıkları çalışmada, *hlyA* genine primerlerinin en hassas sonucu verdiği bildirilmiştir.

Kasaplık hayvanların *L. monocytogenes*'i kendi floralarında taşıyabildiği ve kesim işlemi sırasında hijyenik koşulların sağlanamadığı durumlarda *L. monocytogenes*'in karkasa bulaşabildiği bildirilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991). Dünya'da *L. monocytogenes*'in kırmızı et ve et ürünlerinde bulunma oranı ile ilgili çeşitli araştırmacılar tarafından çalışmalar yürütülmüştür. Örneğin; Çiftçioğlu (1992), yaptığı çalışmada 100 kıyma örneğinin % 11'inde *L. monocytogenes* olmak üzere örneklerin % 34'ünde *Listeria* türlerini, 100 sucuk eti örneğinin % 2'sinde *L. monocytogenes* olmak üzere % 11'inde diğer *Listeria* türlerinin tespit edildiğini

bildirmiştir. Niederhauer ve ark. (1992), yaptığı çalışmada 100 adet pişmiş ve çiğ et örneğinin 14 tanesinde *L. monocytogenes* varlığını göstermiştir. Pesavento ve ark. (2010) çalışmalarında kullanılan çiğ et örneklerinin % 21,4' ünün *Listeria* türleri ile kontamine olduğunu ve elde edilen izolatların % 23,6'sının da *L. monocytogenes* olduğunu ortaya koymuşlardır. Samadpour ve ark. (2006), sığır etinde Washington Seattle'de, perakende satış yerlerinden aldıkları 1750 sığır kıyma örneğinin 18'inin (% 3,5) *L. monocytogenes* yönünden pozitif olduğunu bildirmiş, McGowan ve ark. (1994), İngiltere'de, toplam 32 adet kanatlı ürünlerinden alınan numunelerden 21 (% 65,6) adet, toplam 26 adet sığır etinden alınan numunelerden 9 (% 34,6) adet, toplam 20 adet kuzu etinden alınan numunelerden 8 (% 40) adet, toplam 32 adet domuz etinden alınan numunelerden 9 (% 28,1) adet, toplam 23 adet sosisten alınan numunelerden 8 (% 34,7) adet *L. monocytogenes* identifiye edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmalar dışında kırmızı et ve et ürünlerinde *L. monocytogenes* bulunma oranı ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan literatür taramalarında modifiye atmosfer paketli sığır kıyma ve kuşbaşı örneklerinde *L. monocytogenes* varlığı ile araştırmaya bulgularımızla kıyaslama yapacak yeterli çalışmaya rastlanılmamıştır. Fakat Gill ve Reichel (1989), % 100 CO₂ ile paketlenmiş kırmızı ette 5 °C veya daha düşük sıcaklıkta *L. monocytogenes*'in üremesinin durduğunu, 10 °C' de ise *L. monocytogenes*'in gelişemediğini bildirmiştir.

Modifiye atmosfer paketli diğer et kaynaklarında *L. monocytogenes* varlığı ile ilgili bazı literatür bildirimleri yapılmıştır. Hart ve ark. (1991), % 100 CO₂ ile paketlenmiş tavuk göğüslerinde *L. monocytogenes* üremesinin inhibe olduğunu bildirmiştir. Farber ve Daley (1994) % 70 CO₂ ve % 30 N₂ ile pakitledikleri dilimlenmiş hindi göğüs etinde *L. monocytogenes* üremesinin baskılandığını ortaya koymuşlardır. Pothuri ve ark. (1996), hava veya vakum paketlemeye kıyasla modifiye atmosfer şartları altında (% 75 CO₂: % 10 O₂: % 15 N₂) paketlenmiş ve laktik asitle muamele edilmiş kerevit kuyruk yüzgeç eti örneklerinde *L. monocytogenes*'in lag evresinin 8 gün uzadığını gözlemiştir. Barakat ve Harris (1999), *L. monocytogenes* (1,000 CFU/150-g) inokule ederek % 44: % 56 CO₂-N₂ ile pakitlediği pişmiş tavuk

etlerini 3,5; 6,5 ve 10 °C'de 5 hafta boyunca depolamıştır. Depolama sonucunda tüm test gruplarında *L. monocytogenes*'in ürediğini bildirmiştir.

Araştırma bulgularına yakın değerleri, Barbuddhea ve ark. (2000), Hindistan'da toplam 201 adet koyun ve keçilere ait et numunelerinde % 17,64 oranında *L. monocytogenes* ile bulaşma olduğunu bildirmişlerdir. 1988 yılında Hollanda da 5779 perakende satış yerlerindeki gıdalar analiz edilmiş, en yüksek oran taze ette bulunmuş olup, 416 numune % 7,5 oranında *L. monocytogenes* yönünden pozitif bulunmuştur (Aznar ve Alarcon, 2003).

Çalışmaya ait verilere benzer olarak ABD de 39 aylık zaman periyodunda ülkenin değişik yerlerinde toplanan 1727 adet taze sığır eti numunelerinden % 7,1 oranında *L. monocytogenes* pozitif pozitif çıktığı bildirilmiştir (Jay, 2000). Aynı paralellikte Luppi ve ark. (1988)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, İtalya'da 113 adet et numunesinde 9 (% 7,96) adet *L. monocytogenes* bulmuşlardır.

Araştırma verilerimizden daha düşük olarak Samadpour ve ark. (2006), ABD'de marketlerde satışa sunulan paketlenmiş kırmızı et örneklerinin % 3,5'inin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu tespit etmişler. Bunun yanısıra yüksek orandaki değerleri de Pesavento ve ark. (2010), İtalya'nın Floransa şehrinde çiğ et örneklerinin % 21,4'ünün *Listeria* türleri ile kontamine olduğunu ve elde edilen izolatların % 23,6'sını da *L. monocytogenes* olduğunu bildirmişlerdir.

İsviçre'de yapılan bir çalışmada, 211 adet sığır, 189 adet domuz olmak üzere toplam 400 adet kıyma numunesinde 43 (% 10,8) adet *L. monocytogenes* yönünden pozitif bulunmuş, çalışmada izole edilen *L. monocytogenes*'lerden 9 adedinin serotip 1/2a, 2 adedinin 1/2b, 12 adedinin 1/2c ve 10 adedinin 4b olduğu bildirilmiştir (Fantelli ve Stephan 2001). *L. monocytogenes*'in çiğ domuz etlerinde yaygın olarak tespit edildiği (Norrung ve ark., 1999), domuz eti de dahil olmak üzere etlerin genellikle bulgularımıza paralel olarak *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b ve 1/2c serotiplerinin oldukları bildirilmiştir (Hof ve Rocourt 1992; Thevenot ve ark., 2005).

Çalışma verilerimizle benzer olarak ülkemizde, Eylül 1994-Mayıs 1995 tarihleri arasında Ankara'daki market ve kasaplardan alınan 100 adet hazır sığır kıyması numunesinden 97 (% 97) adet 6 farklı listeria türü tespit edilmiş, çalışmada en yaygın listeria türünün % 92 ile *L. innocua* olduğu tespit edilirken, bunu % 28 ile *L. monocytogenes*, % 10 ile *L. murrayi*, % 9 ile *L. grayi*, % 3 ile *L. seeligeri* ve % 2 ile *L. welshimeri*' nin takip ettiği bildirilmiştir (Şireli ve Erol 1999). Yücel ve ark. (2005), Ankara'da satışa sunulan et ürünlerinde listeria türlerinin prevalansını ve antibiyotik dirençliliklerini ortaya koymak için yaptıkları bir araştırmada, elde ettikleri 146 örneğin % 54,1 oranında listeria türleri ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen izolatların % 6,16'sının ise *L. monocytogenes* olarak tanımlanmış olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla beraber Çolak ve ark. (2007), İstanbul ilinde satışa sunulan 300 adet fermente Türk sucuğunun % 21'inin *Listeria* türleri ile kontamine olduğunu, elde edilen izolatların da % 11,6'sının *L. monocytogenes* olarak tanımlanmış olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgularla benzer olarak, Akkaya ve ark. (2008b), sığır arkaslarında *L. monocytogenes* prevalansının belirlenmesi amacıyla Afyonkarahisar ili kesimhanelerinde yapmış oldukları bir araştırmada, 250 sığır karkasının % 6,8 oranında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada da araştırma verilerimizle paralel olarak 100 adet kıyma numunesinin 73 (% 73) adedinde, 50 adet parça et numunesinin 37 (% 74) adedinde, 25 adet sucuk numunesinin 19 (% 76) adedinde, 25 adet salam numunesinin 4 (% 16) adedinde, 25 adet sosis numunesinin 11 (% 44) adedinde ve 25 adet pastırma numunesinin 8(%32) adedinde *Listeria* türleri izole edilmiştir (Berktaş ve ark., 2006).

L. monocytogenes'in somatik (O) ve flagella (H) antijenik yapılarına göre 13 serotipe sahip olduğu belirlenmiş ve bununla beraber *L. monocytogenes* 4b, 1/2a, 1/2b ve 1/2c serotiplerinin dünyada meydana gelen gıda kaynaklı listeriozis olgularının % 98'ine neden olduğu bildirilmiştir (Seeliger ve Höhne, 1979; Liu ve ark., 2006; Roberts ve ark., 2006). Çalışmamızda elde ettiğimiz ve PCR ile doğruladığımız *L.*

monocytogenes izolatlarının serotiplendirilmesi amacıyla Doumith ve ark. (2004) tarafından geliştirilen *Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* ve *prs* primer dizileri kullanılmıştır. Analizler sonucunda incelenen 52 izolatın, % 38'i *L. monocytogenes* 4b, % 38'i *L. monocytogenes* 1/2b, % 12'si *L. monocytogenes* 1/2c ve % 12'si *L. monocytogenes* 1/2a olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda 1/2b, 1/2a ve 4b serotiplerinin dominant serotipler olduğu görülmüştür.

Hofer ve ark. (2000), Brezilya'da 1971-1997 yılları arasında gıda, insan, hayvan ve çevre gibi farklı kaynaklardan elde ettikleri 70'i süt ürünleri orijinli toplam 3122 *L. monocytogenes* izolatını antiserum kullanarak serotiplendirmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre süt ürünü kaynaklı izolatların % 58'ini *L. monocytogenes* 1/2a, % 26,6'sını *L. monocytogenes* 4b, % 14'ünü *L. monocytogenes* 1/2b ve % 1,4'ünü *L. monocytogenes* 1/2c olarak bildirmişlerdir. Çalışma genelinde incelenen 3122 izolat içinde *L. monocytogenes* 4b'nin % 45,4 oranında ilk sırada olduğu bunu % 20 ile *L. monocytogenes* 1/2a ve % 20 ile *L. monocytogenes* 1/2b'nin takip ettiği bildirilmiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da ilk sırada *L. monocytogenes* 4b ve 1/2b izole edilmiştir. Makino ve ark. (2005), peynir numunelerinden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirilmesi sonucu benzer şekilde *L. monocytogenes* 1/2b serotipinin dominant olduğunu rapor etmişlerdir.

Ülkemizde, Şireli ve Erol (1999), Ankara'da satışa sunulan donmuş tavuk karkaslarından USDA/FSIS tarafından önerilen yöntem ile *L. monocytogenes*'i % 30 oranında izole etmişlerdir. Yaptıkları serotiplendirme çalışması sonucunda % 73 oranında *L. monocytogenes* 1/2a serotipini dominant olarak belirlemişler ve bunu 1/2b, 1/2c ve 4b'nin izlediğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda ise araştırmacıların aksine 4b serotipi 1/2a'ya göre baskın tespit edilmiştir. Ayrıca Ayaz ve Erol (2011), hindi etlerinden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının serotiplendirilmesi sonucu 4b'yi (% 51,4) dominant serotip olarak belirlemişler bunu 1/2a (% 27) ve 1/2b'nin (% 21) serotiplerinin izlediğini rapor etmişlerdir.

Günümüzde antibiyotiklerin tedavi, koruma ve verim arttırmak amacıyla bilinçsiz ve yüksek dozlarda kullanılması sonucu oluşan antimikrobiyel direnç önemli

bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca oluşan bu direnç tedavi başarısızlıklarını da beraberinde getirmekte, yeni ve daha kuvvetli antimikrobiyel ajanlara ihtiyaç duyulmasına sebep olmaktadır (Perreten ve ark., 1997). Geçmişte insanlarda listeriosis tedavisinde ampisilin kombinasyonlarının sıkça kullanılması önerilmiş fakat günümüzde yapılan çalışmalarda etkenin bu ajana karşı direnç kazandığı rapor edilmiştir (Poros-Golchowska ve Markiewicz, 2003).

Bu çalışmada, MAP paketli sığır kıyma örneklerinden elde edilen 3 adet *L. monocytogenes* 4b izolatının 3 tanesi (% 100) eritromisine, 2 tanesi (% 66,6) tetrasikline, 2 tanesi (% 66,6) vankomisine dirençli bulundu. Bunun yanı sıra bu 3 *L. monocytogenes* 4b izolatında amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, kloromfenikol, oksitetrasiklin ve penisilin G dirençliliği saptanmadı. Yine MAP paketli sığır kıyma örneklerinden elde edilen 3 adet *L. monocytogenes* 1/2b izolatının 1 tanesi (% 33,3) ampisiline, 2 tanesi (% 66,6) kloromfenikole, 3 tanesi (% 100) oksitetrasikline, 1 tanesi (% 3,3) penisilin G'ye, 2 tanesi (% 66,6) tetrasikline ve 1 tanesi de (% 33,3) vankomisine dirençli bulundu. Fakat bu izolatlarda amoksisilin/klavulanik asit ve eritromisin dirençliliği saptanmadı. Benzer şekilde MAP paketli sığır kıyma örneklerinden elde edilen 2 adet *L. monocytogenes* 4b izolatının 1 tanesi (% 50) oksitetrasikline, 1 tanesi (% 50) penisilin G'ye, 1 tanesi (% 50) tetrasikline dirençli bulundu. *L. monocytogenes* 4b izolatlarının hiçbirisi amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, kloramfenikol, eritromisin ve vankomisine karşı direnç gelişimi göstermedi. Bununla beraber MAP paketli sığır kuşbaşı örneklerinden elde edilen 1 adet *L. monocytogenes* 1/2b izolatı ile 1 adet *L. monocytogenes* 1/2c izolatı (% 100) penisilin G'ye, 1 adet *L. monocytogenes* 4b izolatı ise (% 100) kloromfenikole dirençli bulunurken analiz edilen diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişimi gözlemlenmedi. Walsh ve ark. (2001), İrlanda-Dublin'de çeşitli gıdalardan elde ettikleri 351 *L. monocytogenes* izolatının çalışmamıza benzer şekilde ampisilin, penisilin ve tetrasikline yüksek düzeyde dirençli olduğunu buna ek olarak eritromisine orta düzeyde, vankomisine ise düşük düzeyde dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Davis ve Jackson (2009), Amerika Birleşik Devletleri'nde insan, çevre ve gıda kökenli *L. monocytogenes* izolatlarının antimikrobiyel direnç özelliklerini Sensititre® metodunu kullanarak araştırmışlar ve çalışmamıza paralel şekilde izolatların ampisilin, penisilin G,

eritromisin ve tetrasikline dirençli olduğunu belirlemişler. Harakeh ve ark. (2009), Lübnan'da süt ürünlerinden izole ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının % 93,33'ünün oksasiline ve % 90'nının da penisiline dirençli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Rahimi ve ark. (2010) tarafından İran'da süt ve süt ürünlerinden izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının nalidiksik asit, siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, gentamisin, ampisilin, penisilin ve kloramfenikol gibi çeşitli antibiyotiklere dirençli olduğunu bildirilmiştir.

Ülkemizde Arslan ve Özdemir (2008), ev yapımı beyaz peynirlerden elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençliliklerini disk difüzyon metodu ile araştırmış ve izolatların % 7,6 oranında ampisilin, penisilin ve tetrasikline direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda elde ettiğimiz izolatların bazılarının ampisilin, penisilin ve tetrasikline karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Bilir Ormancı ve ark. (2008), hindi etinden izole ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik testlerini disk difüzyon metodu ile yapmışlar ve benzer şekilde elde ettikleri izolatların penisilin ve ampisiline dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Ayaz (2008), doktora tez çalışmasında hindi etlerinden izole ettiği *L. monocytogenes* izolatlarının penisilin ve ampisiline dirençli, eritromisin ve streptomisine de orta dirençli olduğunu bildirmiştir. Ancak çalışmamızdan farklı olarak amoksisilin tetrasiklin, kloramfenikol ve vankomisine direnç tespit edememiştir. Lemes-Marques ve ark. (2007), 1995-2005 yılları arasında Brezilya Sao Paulo'da listeriosisli hastalardan elde ettikleri izolatların antibiyotik direnç profillerini mikrodilüsyon yöntemi ile ayrıca izolatların serotiplendirilmesi ise hem antiserum ile hem de PFGE yöntemi ile belirlemişlerdir. Ancak çalışma bulgularımızdan farklı olarak araştırmalarında belirledikleri *L. monocytogenes* izolatlarında antibiyotik dirençliliğine rastlamadıklarını rapor etmişler.

Ayaz ve Erol (2010), hindi kıymalarından izole ettikleri ve Doumith ve ark. (2004), tarafından bildirilen metod ile serotiplendirdikleri *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik direnç profillerini disk difüzyon yöntemi ile ortaya koymuşlardır. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotiplerinin tamamının sadece ampisilin ve penisiline dirençli olduğunu

bildirmişler. Ayrıca *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2c ve 4b serotiplerinin ise eritromisine karşı orta düzeyde dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda farklı olarak ampisilin, penisilin ve eritromisine karşı direncin yanı sıra farklı olarak amoksisilin/klavulanik asit, kloramfenikol, oksitetrasiklin, tetrasiklin ve vankomisine de dirençli suşlar tespit edilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda insan, gıda ve çevreden izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının vankomisine dirençli olmadığı belirtilirken, farklı olarak çalışmamızda elde edilen *L. monocytogenes* izolatların 3 tanesinin vankomisine dirençli olduğu bulunmuştur (Rahimi ve ark., 2010). Bizim çalışma bulgularımızla benzer olarak Walsh ve ark. (2001), hazır tüketilen gıdalardan elde ettikleri *L. monocytogenes* izolatlarının vankomisine dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Geçen 30-40 yıl içinde glikopeptit antibiyotiklere (vankomisin) karşı direnç bildirilmezken, 1980'li yılların ikinci yarısından itibaren stafılakok ve enterokokların aniden vankomisine direnç geliştirdikleri bildirilmiştir (Biavasco ve ark., 1996).

Yapılan araştırmalarda antibiyotik direnç genlerini taşıyan enterokokal ve streptokokal plazmid ve transpozonların konjugasyon yoluyla *Listeria* türlerine transfer olduğu belirlenmiştir. Charpentier ve Courvalin (1999), tarafından *Streptococcus agalactiae*'da bulunan kloramfenikol, makrolid, linkozamid ve streptogramin dirençliliklerinden sorumlu olan plazmid pIP501'in *L. monocytogenes*'e invitro koşullarda transfer olabildiği bildirilmiştir. Benzer şekilde Biavasco ve ark. (1996), tarafından vankomisine dirençli *Enterococci* suşlarından *Listeria* türlerine *vanA* geninin aktarıldığı ve *Listeria* türlerinin vankomisine direnç kazandığı bildirilmiştir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz vankomisine karşı şekillenen dirençlilik, bakterilerde meydana gelen mutasyonlar ve bakteriler arasındaki etkileşimin sonucu oluşan gen aktarımlarına bağlanabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, analiz edilen 50 MAP sığır kıyma örneğinin 5'inin (% 10), 50 MAP sığır kuşbaşı örneğinin ise 3'ünün (% 6) *L. monocytogenes* yönünden pozitif olduğu belirlendi. Elde edilen izolatin tamamının *hlyA* genine sahip olduğu bulundu. Yapılan serotiplendirme sonucunda MAP sığır kıyma örneklerinden elde edilen 8 izolatin 3'ünün *L. monocytogenes* 1/2a, 3'ünün *L. monocytogenes* 1/2b, 2'sinin ise *L. monocytogenes* 4b, olduğu saptandı. MAP sığır kuşbaşı örneklerinden elde edilen 3 izolattan 1'inin *L. monocytogenes* 1/2b, 1'inin *L. monocytogenes* 1/2c ve 1'inin de *L. monocytogenes* 4b olduğu tespit edildi. Elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençlilik testi sonucunda bir veya birden fazla antibiyotiklere karşı dirençli olduğu saptandı. Sonuç olarak antibiyotiklere dirençli suşların gelişmesinin önlenmesi, gıda güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması amacıyla gıda üretiminde hayvanlarda antibiyotik kullanımına ilişkin AB direktifleri ile uyumlu mevcut düzenlemelere bağlı kalınması ve resmi otorite tarafından ulusal kalıntı izleme programının etkin olarak yürütülmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca ülkemizde bundan sonraki çalışmalarda gıdalarda *L. monocytogenes* kaynaklarının belirlenmesi için daha hızlı tekniklerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmakta ve bu araştırmaların epidemiyolojik açıdan da ele alınması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akkaya L, Alisarlı M, Çetinkaya Z, Kara R, Telli R. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7/O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef slaughterhouse environments, equipment and workers. J Muscle Foods. 2008a;19(3):261-274.
- Akkaya L, Alisarlı M, Cetinkaya Z, Telli R, Gök V. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7/O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on bovine carcasses in Turkey. J Muscle Foods. 2008b;19(4):420- 429.
- Anon. Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 1: Detection method. ISO11290-1:1995.
- Anon. Cell separation and protein purification. Technical handbook. 2nd Ed. Dynal A.S., Norway Printed: 02 96,1996.
[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/710%2006.Dynabeads%20anti%20Listeria \(rev004\).pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/710%2006.Dynabeads%20anti%20Listeria%20(rev004).pdf)
- Anon. Using spectrophotometer to quantitate DNA and RNA.
http://www.mc.vanderbilt.edu/root/pdfs/mclaughlin_lab/dna_and_rna_with_a_spectrophotometer.pdf, 2012.
- Arslan S, Özdemir, F. Prevalance and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in home made white cheese. Food Control. 2008;19:360-363.
- Ayaz ND. Hindi kıymalarında *Listeria monocytogenes*'in İmmuno Manyetik Seperasyon ve PCR ile tanısı ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 2008.
- Ayaz ND, Erol İ. Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey. J Food Prortect. 2010;73(5):967-972.
- Ayaz ND, Erol İ. Serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from turkey meat by multiplex PCR in Turkey. J Food Safety. 2011;31:149-153.
- Aznar R, Alarcon B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple Factors affecting sensitivity. J Appl Microbiol. 2003;95:958-966.
- Barakat RK, Harris LJ. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified-atmosphere-packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microbiota. Appl Environ Microbiol. 1999; 65 (1): 342-345.

- Barbuddhea SB, Malika SVS, Bhilegaonkar KN, Kumar P, Guptab LK. Isolation of *Listeria monocytogenes* and *Anti-listeriolysin* o detection in sheep and goats. *Small Ruminant Res.* 2000;38:151-155.
- Berктаş M, Bozkurt EN, Bozkurt H, Alişarlı M, Güdücüoğlu H. Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes*'in izolasyonu. *Van Tıp Derg.* 2006;13(2):36-41.
- Beuchat LR, Ryu JH. Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis.* 1997;3:459-465.
- Beumer RR, te Giffel MC, de Boer E, Rombouts FM. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food Microbiol.* 1996;13:333–340.
- Biavasco F, Giovanetti E, Miele A, Vignaroli C, Facinelli B, Varaldo PE. In vitro conjugative transfer of *VanA* vancomycin resistance between *Enterococci* and *Listeria* of different species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15(1):50-59.
- Bilir Ormancı S, Erol İ, Ayaz ND, İşeri O, Sarıgüzel D. Immunomagnetic separation and PCR detection of *Listeria monocytogenes* in turkey meat and antibiotic resistance of the isolates. *Brit Poultry Sci.* 2008;49(5):560-568.
- Borrelío SP., Murray, P.R. ve Funke, G. Editörler. *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections Bacteriology Volume 2*, Washington DC, pp: 953-969. 2005.
- Brody, A.L. Modified atmosphere/vacuum packaging of meat. pp. 1-37. In A.L. Brody (ed), *Controlled/modified atmosphere/vacuum packaging of foods*. Food and Nutrition Press, Inc., Trumbull, CT. 1989.
- Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res Microbiol.* 1992;143:271-280.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 34:357–9. 1985.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis—United States, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1998;47:1085–6.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of listeriosis—United States, 1998– 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999;47:1117–8.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis—United States, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2000;49:1129–30.

- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexicanstyle cheese-North Carolina, October 2000–January 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001;50: 560–2.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. US Foodborne Disease Outbreaks, 2003. Available at: [http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks /us_outb.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb.htm). Accessed 2 December 2003.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention Listeriosis. March 27, 2008. http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html
- Chakraborty T, Leimeister-Wachter M, Doman E, Haril M, Goebel W, Nichterlein T. Coordinate regulation of the virulence genes *Listeria monocytogenes* requires the product of the prfa gene. *J Bacteriol.*1992; 174:568-574.
- Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicro Agents Chemo.* 1999;43: 2103-2108.
- Cherubin CE, Appleman MD, Heseltine PNR, Khayr W, Stratton CW. Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. *Rev Infect Dis.* 1991;13:1108-14.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria.* Second edition. Approved Guideline M45-A2, Wayne, PA, USA; 2012.
- Cordano A, Rocourt J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *INT J Food Microbiol.* 2001; 70: 175–178.
- Coulon M, Louis P. Modified atmosphere packaging of precooked foods. In *Controlled/Modified atmosphere/Vacuum packaging of foods*, Edited by: Brody, A. L. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.. Chap. 8. 1989.
- Çiftçioglu, G., 1992. İstanbul Piyasasındaki Kıyma, Sucuk ve Tavuk Eti Örneklerinde *Listeria* Türlerinin Mevcudiyetinin Araştırılması. İstanbul Üniv. Sağlık Bilileri Enstitüsü. Doktora Tezi. İstanbul.
- Çolak H, Hampikyan H, Ulusoy B, Bingöl EB. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermente sausage (sucuk). *Food Control.* 2007;18:30-32
- Davis JA, Jackson CJ. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* and *L. welshimeri*. *Microb Drug Resist.* 2009;15:27-32.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(8):3819-3822.

- Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık, Ankara. 2007
- Fantelli K, Stephan R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. *Int J Food Microbiol.* 2001;70:63-69.
- Farber JM, Daley E. Fate of *Listeria monocytogenes* on modified atmosphere packaged turkey roll slices. *J Food Prot.* 1994;57:1098-1100.
- Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991;55:476-511.
- Fernandez-Garayzabal JF, Blanco M, Vazquez-Boland JA, Briones V, Garcia JA, Delgado C, Domingo M, Marco J, Dominguez L. A direct plating method for monitoring the contamination of *Listeria monocytogenes* in silage. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1992;39:513-518.
- Fernandez PS, George SM, Sills CC, Peck MW. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 1997;37(1):37-45.
- Fleming DW, Cochi SL, Macdonald KL, Brondun J, Hayes PS, Plikaytis BD. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med.* 1985;312:404-407.
- Garcia-Esteban M, Ansorena D, Astiasaran I. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Sci.* 2004;67:57-63.
- Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, Weaver RE, Gaventa S, Mascola L. The epidemiology of listeriosis in the United States--1986. Listeriosis Study Group. *Am J Epidemiol.* 1991;133:392-401.
- Gill CO, Reichel MP. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* 1989;6:223-230.
- Glaser P, Frangeul L, Buchreiser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F. Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science.* 2001;294:849-852.
- Grady JO, Sedano-Balba S, Maher M, Smith T, Barry T. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* 2008; 25:75-84.
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Dneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SE, Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders BD. *Listeria marthii* sp. nov. isolated from natural environment, Finger Lakes Natural Forest. *Int J Syst Micr.* 2010;60:1280-1288.

- Goulet V, Marchetti P. Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. *Scand J Infect Dis.* 1996;28:367-74.
- Hadorn K, Hächler H, Schaffner A, Kayser FH. Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993;12(12):928-937.
- Hain T, Chatterjee SS, Gha IR, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C. Pathogenomics of *Listeria spp.* *Int J Med Microbiol.* 2007;297(7-8):541-557.
- Harakeh S, Saleh İ, Zouhairi O, Baydoun E, Barbour E, Alwan N. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy based products. *Sci Total Environ.* 2009;407:4022-4027.
- Hart CD, Mead GC, Norris AP. Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J Appl Bacteriol.* 1991;70:40-46.
- Hof H. Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis. *Infect.* 1991; 19(4):229-233.
- Hof H, Rocourt J. Is any strain isolated detected in food a health risk? *Int J Food Microbiol.* 1992;16:683-692.
- Hofer E, Ribeiro R, Feitosa DP. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:615-620.
- Holzapfel WH, Becker B. *Listeria monocytogenes*, an important concern for the meat industry, International Symposium on Meat safety: From Abattoir to Consumer, Valencia-Spain, 14-15 February 2007, Abstracts of Invited Lectures, Erisim: [http://www.meat-ims.org/symposium_proceeding.pdf], Erişim Tarihi: 26.03.2014.
- Jay JM. Prevalence of *Listeria spp.* in meat and poultry products. *Food Control.* 1996;7:209-214.
- Jay JM. *Modern Food Microbiology.* Sixth Edition, Maryland. pp: 485-510. 2000.
- Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev Sci Tech.* 2006;25(2):571-580.
- Jones EM, McCulloch SY, Reeves DS, MacGowan AP. A 10 year survey of the epidemiology and clinical aspects of listeriosis in a provincial English city. *J Infect.* 1994;29:91-103.

- Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Protect.* 2002;65:1811-1829.
- Kuhn M, Goebel, W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. New York, In Ryser, E.T., E. H. Marth (eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc. p. 1999:97-130.
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Mateos ALF, Roche SM, Buchrieser C, Daniel VD, Monnier AL, Leuit M, Allerberger F. *Listeria rocourtiae* spp. nov. *Int J Syst Evol Micr.* 2010;60:2210-2214.
- Lemes-Marques EG, Cruz CD, Destro MT. Pheno and ghenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the south-western region of Sao-Paulo Brazil. *Braz J Microbiol.* 2007;38:287-292.
- Liu D, Lawrence ML, Wiedmann M, Gorski L, Mandrell RE. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied virulence potential. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4229-4233.
- Luppi A, Bucci G, Maini P, Rocourt J. Ecological survey of *Listeria* in the Ferrara area (northern Italy). *Zbl Bakt-Int J Med M.* 1998;269:266-275.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. ve Whitmsn, W.B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three*. New York. pp: 244-257. 2009.
- Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S. An outbreak of foodborne listeriosis due to cheese in Japan during 2001. *Int J Food Microbiol.* 2005;104(2):189-196.
- McGowan AP, Bowker K, McLauchlin J, Bennett PM, Reeves DS. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human feces, sewage and soil from urban sources. *Int J Food Microbiol.* 1994;21:325-334.
- McLauchlin J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9:210-213.
- McLauchlin J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control.* 1996;7:187-193.
- Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Path Bacteriol.* 1926;28:407.
- Niederhauer C, Candrian U, Hofelein C, Jermini M, Buhler HP, Luthy J. Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Food. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(5):1564-1568.

- Nolla-Salas J, Anto JM, Almela M, Renkonen OV, Paavonen J, Ahonen J. Incidence of listeriosis in Barcelona, Spain, in 1990. The Collaborative Study Group of Listeriosis of Barcelona. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12:157-161.
- Norrung B, Andersen JK, Schlundt J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int J Food Microbiol*. 1999;53:195–203.
- Olarte C, Gonzalez- Fandos E, Gimenez M, Sanz S, Portu J. The growth of *Listeria monocytogenes* in fresh goat cheese (Camos cheese) packaged under modified atmospheres. *Food Microbiol*. 2002;19:75-82.
- Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. *Nature*. 1997;389:801-802.
- Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Lo Nostro A. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*. 2010;21:708-713.
- Pincus, D. H. Microbial identification using the Bioréieux VITEK 2 system. Hazelwood, MO, USA www.pda.org/bookstore 2010.
- Pirie JHH. A new disease of veld rodents, “Tiger River Disease”. *Publ S Afr Inst Med Res*. 1927;3:163.
- Pirie JHH. *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria, *Nature*. 1940;145:264.
- Poros-Golchowska J, Markiewicz Z. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Pol*. 2003;52:113-129.
- Pothuri P, Marshall DL, McMillin KW. Combined effects of packaging atmosphere and lactic acid on growth and survival of *Listeria monocytogenes* in crayfish tail meat at 4°C. *J Food Prot*. 1995;59:253-256.
- Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, Courtieu AL, Courvalin, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*. 1990;335:1422–1426.
- Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control*. 2010;21:1446-1452.
- Riedo FX, Pinner RW, Tosca ML. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J Infect Dis*. 1994;170:693–6.
- Roberts A, Nightingale K, Jeffers G, Fortes E, Kongo JM, Wiedmann, M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III.

- Microbiology. 2006;152:685-693.
- Robinson RK, Batt CA, Patel PD. Encyclopedia of Food Microbiology. San Diego, CA: Academic Pres. 2000.
- Rutherford TJ, Marshall DL, Andrews LS, Coggins PC, Schilling MW, Gerard P. Combined effect of packaging atmosphere and storage temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat shrimp. Food Microbiol. 2007;24:703–710.
- Safarik I, Safarikova M, Forsythe SJ. The application of magnetic separations in applied microbiology. J Appl Bacter. 1995;78:575-585.
- Samadpour M, Barbour MW, Nguyen T. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. J Food Prot. 2006;69:441-443.
- Schlech W.F. Foodborne listeriosis. Clin Infect Dis. 2000;31:770- 775.
- Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi AC. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. N Engl J Med. 1983;308:203–6.
- Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Met Microbiol. 1979;13:31-49.
- Seeliger HPR, Jones D. *Listeria*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. vol 2, 9th ed. Sneath PHA (ed), Williams & Wilkins, Baltimore. 1986;1235-1245.
- Skogberg K, Syrjanen J, Jähkölä M, Renkonen OV, Paavonen J, Ahonen J. Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. Clin Infect Dis. 1992;14:815-21.
- Swaminathan B. *Listeria monocytogenes*. In: Food microbiology: fundamentals and frontiers (Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., eds.). ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 383-409. 2001.
- Sivertsvik M, Jeksrud WK, Rosnes JT. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products-significance of microbial growth, activities and safety. Int J Food Sci Tech. 2002;37:107-127.
- Sivertsvik M, Rosnes JT, Jeksrud WK. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. J Food Eng. 2004;63:451-458.
- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell to cell spread. Infect Immun. 1995;63:4231-4237.

- Sofos JN, Belk, KE, Smith GC. (Processes to reduce contamination with pathogenic microorganisms in meat. Erişim:12.09.2014 http://www.prepacvpm.org/wordpress/resources/Exam_Topics/4_FoodSafety/04_Processing/Slaughter/Processes_to_reduce_contamination_with_pathogenic_microorganisms_meat.pdf1999)
- Sofos JN. Challenges to Meat Safety in the 21st Century, Symposium on Meat safety: From Abattoir to Consumer. Meat Sci. 2008;78(1-2):3-13.
- şireli T, Erol İ. Hazır kıymalarda *Listeria* türlerinin araştırılması. Turk J Vet Anim Sci. 1999;23:373-80.
- Thevenot D, Delignette-Muller ML, Christieans S, Vernozzy-Rozand C. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. Int J Food Microbiol. 2005;102:85-94.
- Tsigarida E, Skandamis P, Nychas GJE. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. J Appl Microbiol. 2000;89:901-909.
- Walsh D, Duffy G, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. Antibiotic resistance among *Listeria* including *Listeria monocytogenes* in retail foods. J Appl Microbiol. 2001;90:517-522
- Yılmaz N, Güneş G. Işınlama ve Modifiye Atmosferde Paketlemenin Pişirmeye Hazır Köftelerde *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* ve *Listeria monocytogenes* Üzerine Etkileri. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Yücel N, Çıta, S, Önder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiol. 2005;22:241-245.
- Uyttendaele M.R, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. Int J Food Microbiology. 1999;53:75-80.
- Wagner M, McLauchlin J. Biology In: Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press. 3-27. 2008.
- Wernars K, Heuvelman CJ, Chakraborty T, Notermans SHW. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J Appl Microbiol. 1991;70:121-126.
- Whitley E, Muir D, Waites WM. The growth of *Listeria monocytogenes* in cheese packed under a modified atmosphere. J Appl Microbiol. 2000;88:52-57.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Adem ÖZKİRAZ

Doğum Yeri : Artova/TOKAT

Doğum Tarihi : 23.02.1986

Medeni Hali : Evli

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu : Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2003-2010

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Aksaray İl
Müdürlüğü

E-posta : adem.ozkiraz@tarim.gov.tr