

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***LİSTERİA MONOCYTOGENES* 'İN BELİRLENMESİNDE
MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONU**

Deniz KOÇAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2007**

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN danışmanlığında, Deniz KOÇAN tarafından hazırlanan "*Listeria monocytogenes* 'in Belirlenmesinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu" adlı tez çalışması 16 Ekim 2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ayhan TEMİZ

Üye : Prof. Dr. Nezihe TUNAİL

Üye : Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Üye : Prof. Dr. M Lütfü ÇAKMAKÇI

Üye : Prof. Dr. Aykut AYTAÇ

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

LISTERIA MONOCYTOGENES 'İN BELİRLENMESİNDE MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONU

Deniz KOÇAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Bu çalışmada *Listeria monocytogenes* analizi sırasında PALCAM agar besiyerinde gelişen refakatçi flora, *L. monocytogenes* 'in gelişimi etkilenmeden inhibe edilmeye çalışılmış ve oluşturulan inhibisyon sisteminin de yer aldığı ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerleri geliştirilmiştir. Bu çalışma 4 aşamada tamamlanmıştır.

Bu amaçla çalışmanın birinci aşamasında çeşitli gıdalarda ISO 11290-1 yöntemine göre *L. monocytogenes* analizi yapılmış ve PALCAM agarda gelişen 107 mikroorganizma izole edilip tanımlanmıştır. Analizin son aşamasında katı besiyerinden izole edilen 66 mikroorganizma seçilip çalışmada kullanılmıştır. Tanımlanan 66 izolatın 14'ü *L. monocytogenes*, 27'si *Listeria* spp., 11'i *Bacillus* spp., 6'sı *Enterococcus faecalis*, 3'ü *Staphylococcus* spp., 4'ü Maya ve 1'i de tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakteridir.

Çalışmanın ikinci aşamasında refakatçi bakterinin inhibisyonu için LiCl, seftazidim, moksalaktam, amfoterisin B, nalidiksik asit, polimiksin B, akriflavin, sefiksim, sefiksim tellurit, fosfomisin, fusidik asit ve rifampisin'in etkileri belirlenmiştir. İnhibisyon sistemine LiCl, seftazidim, fosfomisin, nalidiksik asit, polimiksin B ve amfoterisin B, çeşitli aşamalarda dâhil edilmiş ve besiyeri formülleri hazırlanmıştır. Üçüncü aşamada hazırlanan yeni besiyerinde izolatların geri alımı incelenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında hazırlanan sistem ile ISO 11290-1 yöntemiyle piyasadan toplanan 100 örneğin analizinde karşılaştırılmış ve yeni sistem ile daha çok sayıda pozitif sonuç alındığı belirlenmiştir. Yeni kurulan sistemle *L. monocytogenes* gelişimi etkilenmeden ISO 11290-1 yönteminden daha fazla refakatçi flora inhibe edilmiş, % 48 daha fazla *Listeria* spp. ve % 37 daha fazla *L. monocytogenes* belirlenmiştir.

Tüm bu veriler ışığında besiyerindeki bakteri gelişim faktörleri artırılarak ve inhibisyon sistem geliştirilerek *L. monocytogenes* gelişimi etkilenmeden daha çok refakatçi floranın inhibe edilebileceği sonucuna varılmıştır.

2007, 177 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*, PALCAM agar, refakatçi flora, inhibisyon, yeni besiyeri

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

MINIMUM INHIBITION CONCENTRATION FOR DETERMINING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Deniz KOÇAN

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

Supervisor: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

The objective of this study was to investigate an inhibition of competitive flora grown on PALCAM agar plates without affecting the growth of *Listeria monocytogenes* during *L. monocytogenes* analysis. For this purpose, the inhibition system was developed by forming pre-enrichment, selective enrichment and selective solid media. This study was carried out in four steps.

In the first step of the study, naturally contaminated food samples of various types were analyzed for *L. monocytogenes* according to ISO 11290-1 and 107 microorganisms grown on PALCAM agar plate were isolated. A total of 66 microorganisms which were able to grow at last step of the analysis were selected and used in this study for identification. Of the 66 isolates, 14 were *L. monocytogenes*, 27 were *Listeria* spp., 11 were *Bacillus* spp., 6 were *Enterococcus faecalis*, 3 were *Staphylococcus* spp., 4 were yeasts and one was unidentified Gram positive rod bacterium.

In the second step of the study, in order to investigate the inhibitory effects of LiCl, ceftazidime, moxalactam, amphotericin B, nalidixic acid, polymyxin B, acriflavine, cefixim, cefixim tellurite, fosfomicin, fusidic acid and rifampisin, the components of selective medias in the inhibition system were modified by adding LiCl, ceftazidime, fosfomicin, nalidixic acid, polymyxin B and amphotericin B at different stages of the analysis, and culture media formulations were prepared. In the third step of the study, the recovery of isolates from the prepared new medium was investigated.

In the fourth step of the study, the inhibition system formed by using new formulated culture media were compared with ISO 11290-1 method by analyzing 100 various food samples obtained from local markets. The results showed that the new inhibition system inhibited more competitive flora without affecting the growth of *Listeria monocytogenes* during *L. monocytogenes* analysis than ISO 11290-1 method by detecting 48% more *Listeria* spp. and 37% more *L. monocytogenes*.

In conclusion, more competitive flora without affecting the growth of *Listeria monocytogenes* during *L. monocytogenes* analysis could be inhibited by altering bacterium growth factors and improving inhibition system in the media.

2007, 177 pages

Key Words: *Listeria monocytogenes*, PALCAM agar, competitive flora, inhibition, new medium

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde bana yardımcı olan, çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar sosyal hayatta da düşünce ve davranışlarıyla yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan, bir akademiysen olarak örnek aldığım, danışman hocam sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a, çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen, bana zaman ayıran Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri sayın Prof. Dr. Nezihe TUNAİL ve Prof. Dr. Ayhan TEMİZ'e, bilimsel çalışmaların yanında her aşamada yardımseverliği ve pratik çözümleriyle bir hoca bir arkadaş olarak destek olan Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR'a, laboratuvarında birlikte çalıştığım ve çalışmam boyunca desteklerini gördüğüm canım arkadaşlarım Araş. Gör. Gökçe POLAT, Araş. Gör. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ, Naciye YAKAR, Aylin AKOĞLU, laborant Mustafa GAYRETLİ ve Yrd. Doç. Dr. Serap COŞANSU'ya, Mikrobiyoloji Birimi öğretim üyeleri ve çalışanlarına, ilaçların temininde bana destek olan Şimşek ve Güney Eczaneleri'ne en içten sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca araştırmalarımında birçok fedakârlıklar göstererek maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bugüne gelmemi sağlayan sevgili anneciğime ve aileme en derin duygularla sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, "Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)" (05HPD011) "*Listeria monocytogenes* 'in Belirlenmesinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu" konulu proje tarafından desteklenmiştir.

Deniz KOÇAN

Ankara, Ekim 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Tarihçesi	4
2.2 Morfolojik, Biyokimyasal ve Antijenik Özellikleri	5
2.3 Kaynağı, Yayılmaması ve Enfektif Dozu	9
2.4 Gelişmesi ve Canlı Kalması	12
2.5 Çeşitli Stres Koşullarının <i>Listeria monocytogenes</i> 'e Etkisi	13
2.5.1 Sıcaklığın etkisi	13
2.5.2 pH'nın etkisi	17
2.5.3 NaCl'ün etkisi	18
2.5.4 Diğer faktörlerin etkisi	19
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Neden Olduğu Enfeksiyonlar ve Listeriozis	22
2.7 Çeşitli Antibiyotik ve İnhibitör Maddelere Karşı Dirençlilik	28
2.7.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK veya MIC)	30
2.7.2 <i>L. monocytogenes</i> 'in duyarlı olduğu antibiyotikler	31
2.7.3 <i>L. monocytogenes</i> 'in dirençli olduğu antibiyotikler	32
2.7.4 Besiyeri bileşiminde kullanılan bazı inhibitör maddelerin etkisi	35
2.8 Gıdalarda <i>Listeria monocytogenes</i> 'in Belirleme Yöntemleri	43
2.8.1 Klasik kültürel yöntemlerle <i>Listeria monocytogenes</i> 'in belirlenmesi	43
2.8.2 Ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme besiyerleri	45
2.8.3 Selektif katı besiyerleri	58
2.8.4 ISO, IDF, USDA, FDA-BAM, AOAC referans metotları	71
2.8.5 Kromojenik besiyerleri	75
2.8.6 Hızlı test yöntemleri	78
2.8.7 <i>Listeria monocytogenes</i> 'in belirlenmesindeki problemler	82
3. MATERYAL VE YÖNTEM	86

3.1 Materyal	86
3.2 Yöntem	89
3.2.1 Mikroorganizmaların izolasyonu, tanımlanması ve muhafazası	91
3.2.2 Refakatçi mikroorganizmaların inhibisyonu	92
3.3.3 Besiyeri bileşiminin oluşturulması ve geri alma denemeleri	98
3.3.4 Piyasa taraması	99
3.2.5 İstatistik analiz	99
4. BULGULAR	100
4.1 Gıdadan Gelen <i>Listeria</i> spp.'nin ve Refakatçi Floranın İzolasyonu ve Tanımlanması	100
4.2 Refakatçi Flora İnhibisyon Sonuçları	110
4.2.1 LiCl'ün <i>L. monocytogenes</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi	110
4.2.2 Amfoterisin B'nin <i>L. monocytogenes</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi	115
4.2.3 Seftazidimin <i>L. monocytogenes</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi	119
4.2.4 Fosfomisin <i>L. monocytogenes</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi	123
4.2.5 Diğer antibiyotiklerin etkisi	126
4.3 Geliştirilen besiyerinden izolatların geri alım sonuçları	134
4.4 Piyasa taraması sonuçları	137
5. TARTIŞMA	146
6. SONUÇ	153
KAYNAKLAR	155
ÖZGEÇMİŞ	176

SİMGELER DİZİNİ

ALOA	Agar <i>Listeria</i> Ottaviani and Agosti
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BSAC	The British Society for Antimicrobial Chemotherapy
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Peterson
DHHS	Department of Health and Human Services
EHA	Enhanced Haemolysis Agar
FDA	Food and Drug Administration
FSIS	Food Safety and Inspection Service
GBNTSA	Gum-Bazlı Nalidiksik Asit Tripton Soya Agar
Hi II	Hitchins Broth
IDF-FIL	International Dairy Federation
ISO	International Organization for Standardization
LA	<i>Listeria</i> Selective Agar
LiCl	Lityum Klorür
LMBA	<i>L. monocytogenes</i> Blood Agar
LPM	LiCl Feniletanol Moksalaktam
LPM	LiCl Feniletanol Moksalaktam
LSA	<i>Listeria</i> Selective Agar (Dominguez-Rodriguez)
MDA	Modifiye Despierres Agar
MIC	Minimum Inhibition Concentration
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MLA	Mc Bride <i>Listeria</i> Agar
MMLA	modifiye Mc Bride <i>Listeria</i> Agar
MOX	modifiye Oxford Agar
m-VJ	Modifiye Vogel Johnson Agar
PALCAM	Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol
Re	<i>Rhodococcus equi</i>
S100	100 mg/L seftazidim içeren selektif katı besiyeri
S60	60 mg/L seftazidim içeren selektif katı besiyeri
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
TMP/ SMZ	trimetoprim/ sulfametoksazole
TSYEA	Tryptone Soya Yeast Extract Agar
USDA	United States Department of Agriculture - ABD Tarım Dairesi
UVM II	University of Vermont Broth

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Listeria</i> türlerinin biyokimyasal test sonuçları	6
Çizelge 2.2 <i>Listeria</i> serotiplerinin türlere göre dağılımı	7
Çizelge 2.3 <i>Listeria</i> cinsinin serovaryaları	8
Çizelge 2.4 Tarihte görülen önemli <i>Listeria monocytogenes</i> salgınları	27
Çizelge 2.5 <i>L. monocytogenes</i> analizinde kullanılan zenginleştirme besiyerleri	46
Çizelge 2.6 <i>L. monocytogenes</i> analizinde kullanılan zenginleştirme besiyeri bileşimleri	47
Çizelge 2.7 <i>L. monocytogenes</i> analizinde kullanılan katı besiyerleri ve geliştiren araştırmacılar	59
Çizelge 2.8 <i>L. monocytogenes</i> analizinde kullanılan başlıca katı besiyeri bileşimleri	62
Çizelge 3.1 Mikroorganizmaların örnek çeşidine göre dağılımları	88
Çizelge 3.2 Piyasadan toplanan örneklerin dağılımı	88
Çizelge 3.3 Antimikrobiyel maddelerin hazırlanması ve depolanması	94
Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları	101
Çizelge 4.2 Farklı oranlarda LiCl kullanımının <i>E. faecalis</i> ve <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisi	111
Çizelge 4.3 Farklı oranlarda LiCl kullanımının <i>E. faecalis</i> ve <i>L. monocytogenes</i> üzerine etkisi	112
Çizelge 4.4 Farklı oranda LiCl içeren Fraser Brothta üreyen <i>L. monocytogenes</i> izolatlarının PALCAM ve TSYA besiyerindeki sayım sonuçları	113
Çizelge 4.5 Kontrol 3 g/L ve 10 g/L LiCl içeren Fraser Broth besiyerinde gelişen izolatların PALCAM Agar ve TSYE Agar besiyerindeki sayım sonuçları	114
Çizelge 4.6 Amfoterisin B'nin maya izolatlarına etkisi 24. saat makrodilüsyon sonuçları	115
Çizelge 4.7 Mayalar için MİK ve MBK değerleri	116
Çizelge 4.8 Amfoterisin B'nin mayalar üzerine etkisi	116
Çizelge 4.9 Amfoterisin B'nin etkisi	117
Çizelge 4.10 Amfoterisin B'nin <i>L. monocytogenes</i> ve diğer bakteriler üzerine etkisi	118
Çizelge 4.11 10mg/L Amfoterisin B içeren PALCAM Agar besiyerindeki sayım sonuçları	119
Çizelge 4.12 Seftazidim antibiyogram test sonuçları	120
Çizelge 4.13 Kontrol (20 mg/L), 60 mg/L ve 100 mg/L seftazidim içeren PALCAM Agar besiyerindeki sayım sonuçları	121
Çizelge 4.14 Kontrol 20 mg/L ve 100 mg/L seftazidim içeren PALCAM Agar besiyerindeki sayım sonuçları	122
Çizelge 4.15 92 nolu <i>L. monocytogenes</i> izolatının farklı oranlarda seftazidim içeren Fraser Brothtaki sayım sonuçları S 60	123
Çizelge 4.16 Fosfomisin antibiyogram test sonuçları	124
Çizelge 4.17 Kontrol, 50 mg/L ve 100 mg/L fosfomisin içeren Fraser Broth ve PALCAM Agar besiyerlerindeki sayım sonuçları	125
Çizelge 4.18 200 mg/L Fosfomisin kullanımının katı besiyerinde <i>Listeria</i> spp. üzerine etkisi	126
Çizelge 4.19 Moksalaktam antibiyogram test sonuçları	127

Çizelge 4.20 Nalidiksik asidin antibiyogram test sonuçları	128
Çizelge 4.21 Polimiksin B sülfatın antibiyogram test sonuçları	129
Çizelge 4.22 Sefiksimin antibiyogram test sonuçları	130
Çizelge 4.23 Sefiksimin telluritinin antibiyogram test sonuçları	131
Çizelge 4.24 Akriflavinin antibiyogram test sonuçları	132
Çizelge 4.25 Fusidik asidin etkisi	133
Çizelge 4.26 Bu çalışmada geliştirilen besiyerleri ve Fraser Brothun bileşenleri	134
Çizelge 4.27 Bu çalışmada geliştirilen selektif katı besiyeri (SKB) ve PALCAM Agar bileşenleri	135
Çizelge 4.28 Selektif katı besiyerindeki sayım sonuçları	136
Çizelge 4.29 Piyasadan toplanan örneklerdeki <i>Listeria</i> analiz sonuçları	138
Çizelge 4.30 <i>Listeria</i> spp.'nin tanımlama sonuçları	140

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ISO 111290-1 <i>Listeria</i> belirleme kültürel metodu	71
Şekil 2.2 IDF <i>Listeria</i> belirleme kültürel metodu	72
Şekil 2.3 USDA <i>Listeria</i> belirleme kültürel metodu	73
Şekil 2.4 FDA-BAM <i>Listeria</i> belirleme metodu	74
Şekil 2.5 AOAC Metot 993.12 Süt ve süt ürünleri	74
Şekil 3.1 Geliştirilen yeni besiyerleriyle <i>Listeria</i> belirleme yöntemi şeması	98
Şekil 4.1 25 g/L LiCl'ün bazı izolatlara olan etkisinin agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmesi	111
Şekil 4.2 63 nolu maya izolatu için makrodilüsyon yöntemiyle MİK değerinin belirlenmesi	116
Şekil 5.1 PALCAM Agarda <i>Enterococcus faecalis</i> 'in görünümü	147
Şekil 5.2 PALCAM Agarda <i>L. monocytogenes</i> 'in görünümü	147

1. GİRİŞ

Dünyada her yıl bir çok insan gıdalardaki mikroorganizmalar ya da bunların toksinleri nedeni ile hastalanmakta ve ölmektedir. Bu hastalıklar, grip ile karıştırılabilecek kadar hafif geçebildiği gibi, ölümlü sonuçlanabilen ishaller, kusma, mide bulantısı, ateş, mide krampları şeklinde de görülebilmektedir. ABD hastalık kontrol merkezi verilerine göre; her yıl gıda kaynaklı olmak üzere, 76 milyon kişi hastalanmakta, 325.000 kişi hastaneye gitmekte ve yaklaşık 5.000 kişi ölmektedir. *Listeria monocytogenes*, ABD'de her yıl yaklaşık 2500 kişinin hastalanmasına ve hastalanan 500 kişinin de ölümüne neden olmaktadır (CDC 2001, Ryan *et al.* 2002).

L. monocytogenes, çevreye geniş ölçüde yayılmış, buzdolabı sıcaklığında, soğutma, dondurma, ısıtma ve kurutma işlemleri gibi olumsuz koşullar altında bile canlılığını sürdürebilen, halk sağlığı açısından önemli bir patojendir (CFSAN 2001).

Listeriozis etmeni olarak bilinen *L. monocytogenes* 'in gıdalar aracılığı ile yayıldığı ancak son yıllarda dikkat çekmeye başlamış ve son yüzyılın en önemli gıda kaynaklı patojenleri arasında yerini almıştır. 1981 yılından itibaren çeşitli büyük listeriozis salgınları görülmüş ve salgına neden olan gıdalar olarak en çok kontamine süt ürünleri, pastörize edilmemiş peynir, az pişmiş tavuk, sosisli sandviç, şarküteri etleri ve sebzeler olarak belirlenmiştir (Beumer and Hazelger 2003).

L. monocytogenes, gelişmiş ülkelerde nadiren gıda kaynaklı hastalıklara neden olmakla birlikte enfekte olan kişilerin % 20-30'u bu nedenle ölmektedir. Bu, diğer gıda kaynaklı hastalıklara göre yüksek bir rakamdır. Hastalık genellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kişileri (kanser, şeker, böbrek ve AIDS hastaları) hamileleri, yeni doğan bebekleri ve yaşlıları tehdit etmektedir. Ölüm vakalarının yüksek olması tüketici, gıda üreticileri ile bilim adamlarının konuya ciddi olarak eğilmelerine neden olmuştur (Tunail 2000, Reissbrodt 2004, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004).

L. monocytogenes 'in buzdolabı sıcaklığında gelişmesi, dondurma işlemine ve donmuş muhafaza koşullarına direnci, orta ve yüksek tuz ile nitrit konsantrasyonuna karşı

dayanıklılığı ve çoğu dezenfektanlara karşı direnci, *L. monocytogenes* 'in gıdalardan uzaklaştırılmasını ve gıda kaynaklı listeriozis enfeksiyonlarının önlenmesini güçleştirmektedir (Erol ve Şireli 1999).

Mikroorganizmalar, gıdalarda genellikle hasar görmüş olarak bulunmaktadır. Onların duyarlılığı izolasyon amacıyla kullanılan besiyerlerinde bulunan selektif maddelerin varlığıyla daha da artmaktadır. Az sayıdaki *L. monocytogenes* 'in gıda ve çevresel örneklerde belirlenmesi için ön zenginleştirme besiyeri, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerinin kullanılması gerekmektedir. Yapılan bir çok çalışmada *L. monocytogenes* 'in çeşitli çevre faktörlerine karşı direnci ve stres koşulları altında canlılığını ne kadar sürdürdüğü belirlenmiştir. Herhangi bir strese maruz kalan *L. monocytogenes*, canlılığını sürdürmekte ve bir süre sonra, onarım mekanizması sonucunda tekrar aktivite kazanıp sağlık için tehdit oluşturmaktadır. Bu yüzden teşhis metotlarında, gıdada hasarlı olan hücrelerin canlandırılması sağlanmalıdır. Bu işlem ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme aşamalarında yapılmaktadır. Ancak gıdada hasarlı olan *L. monocytogenes* 'in canlandırılıp, gelişmesi sağlanırken refakatçi flora da çoğalmaktadır.

Katı besiyerinde gelişebilen koloni sayısı, hedef mikroorganizma : refakatçi flora oranı açısından kritiktir. Hedef mikroorganizma sayısı 1:100 'den daha az ise sahte negatif sonuçlar kolaylıkla alınabilir. Bir diğer deyiş ile refakatçi floranın yoğun gelişimi sonunda hedef mikroorganizma kolonisinin fark edilerek saf halde izole etmek mümkün olmayabilir. Artan refakatçi flora inhibitör maddeler ile inhibe edilmeye çalışılmaktadır. Bu yüzden besiyeri bileşimindeki inhibitör maddelerin çeşitleri, etki spektrumları ve kullanım oranları çok önemli olmakta ve *L. monocytogenes* 'in gelişimine olan etkisinin bilinmesi gerekmektedir.

Bu araştırmada 80 adet gıdadan ISO 11290-1 yöntemine göre *L. monocytogenes* analizi yapılmış ve 107 mikroorganizma izole edilmiştir. Tam konsantre Fraser Broth besiyerinde 48. saat inkübasyonda bile canlı kalıp, Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol (PALCAM) agarda gelişebilen 66 mikroorganizmadan 14'ünün *L. monocytogenes*, 27'sinin diğer *Listeria* türleri ve 25'inin

de refakatçi mikroorganizmalardan oluştuğu belirlenmiş ve çalışmaya *L. monocytogenes* 'in 4 adet standart suşu da eklenerek izolat sayısı 70'e çıkarılmıştır. Araştırmanın devamında refakatçi flora ve *L. monocytogenes* dışındaki diğer *Listeria* türleri çeşitli antibiyotik ve inhibitör maddelerle inhibe edilmeye çalışılmış ve *L. monocytogenes* için gelişme faktörleri belirlenerek farklı bir besiyeri bileşimi düzenlenmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen veriler ışığında ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyeri bileşimleri (temel bileşenler + inhibitör sistem) düzenlenerek önce 70 izolat üzerinde daha sonra da piyasadan toplanan 100 örnek üzerinde denenmiş ve kurulan sistemin hassasiyeti Fraser-PALCAM kombinasyonu ile karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Listeria monocytogenes* 'in Tarihçesi

Mikroorganizmaya ilk olarak 1891 yılında Alman hastalardan alınan örneklerde rastlanmıştır. Daha sonra 1911'de İsveç'te tavşan ciğerinden izole edilmiş ve hastalığa 1925 yılında Almanya'da koyunlarda rastlanmıştır. Hastalık 1917'de Pirie tarafından Güney Afrika bozkırlarındaki kemiricilerde Tiger River adı ile tanımlanmıştır. 1926 yılında Murray ve çalışma arkadaşları Cambridge'deki laboratuvar tavşanlarında septik bir hastalık tarif etmişler ve hastalık monositozla karakterize olduğu için etken bakteriyeye *Bacterium monocytogenes* adını vermişlerdir. Daha sonra bir cerrah olan Lord Lister'in anısına *Listerella hepatolytica* ve *Listerella hominis* gibi isimler verilen organizmaya 1940 yılında Pirie tarafından *Listeria monocytogenes* adı verilmiştir. Mikroorganizmada monositoz üretici bir antijen tanımlanmasına rağmen, insanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda monositoz belirleyici bir unsur değildir. Monositoz, vücuttaki kanda, normalde alyuvarların % 2-6'sını oluşturan bir hücre türü olan monositlerin sayıca artmasıdır. Pek çok hastalıkta görülen önemli bir laboratuvar bulgusudur (Farber and Peterkin 1991, Beumer and Hazeleger 2003, Beverly 2004).

İnsanlarda listeriozis vakası ilk kez 1929'da bildirilmiş ancak Amerika ve Avrupa'daki salgınlara kadar bu hastalığın gıda kaynaklı olabileceği kanıtlanmamıştır. 1980'li yıllarda özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri başta olmak üzere pek çok ülkede bu hastalığın neden olduğu salgınlar görülmüş ve gıdalar aracılığı ile taşınan bu mikroorganizma dikkat çekmeye başlamıştır. Özellikle 1985'e kadar listeriozisin, çoğunlukla inek, koyun gibi hayvanlarla ilişkili olduğu düşünülmüş ve sadece bir meslek hastalığı (veteriner cerrah) olarak görülmüştür. Bu nedenle gıdalarda ve klinik olmayan materyallerden *L. monocytogenes* 'in izolasyonu için yöntem geliştirme çalışmaları büyük hız kazanmıştır. Büyük listeriozis salgınlarında enfeksiyon kaynağı olarak yumuşak peynir (Meksika tipi), çiğ lahana, ciğer ezmesi ve jöleli domuz dili bulunmuştur (Beumer *et al.* 1996, White *et al.* 2002, McLauchlin *et al.* 2004, Reissbrodt 2004).

2.2 Morfolojik, Biyokimyasal ve Antijenik Özellikleri

Listeria monocytogenes, Gram pozitif, mezofilik, fakültatif anaerob, sporsuz bir bakteridir. Mikroskopta kısa (0,4-0,5 µm eninde ve 0,5-2 µm boyunda) yuvarlak uçlu çubuklar veya kokobasil şeklinde görünür. Genç kültürlerde kısa zincirler halinde, Çin alfabesindeki harfler gibi birbirine paralel olarak, "V" veya "Y" şeklinde gözükür (Holt *et al.* 1994).

Optimum gelişme sıcaklığı 30-35 °C olup, 0-45 °C gibi geniş bir aralıkta gelişebilir. Sayısı bir ile beş arasında değişen peritrik flagellaları sayesinde 25 °C'de hareketli olmasına karşın 37 °C'de hareketsizdir. Halotoleranttır ve buna bağlı olarak yüksek konsantrasyonda NaCl (% 10-12) varlığında bile çoğalır. % 25,5 NaCl içeriğinde ve 4 °C'de aylarca canlı kalabildiği saptanmıştır. Minimum A_S değeri 0,92 (mutfak tuzu) olarak belirlenmiştir. *L. monocytogenes*, pH 4,1-9,6 aralığında gelişebilmektedir. Optimum olarak pH 6,0-8,0'de gelişir. Katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir (Rosenow and Marth 1987, Besse 2002, Hitchins 2003).

L. monocytogenes 'in biyokimyasal aktivitesi oldukça değişik ve aynı zamanda zayıftır. Bazı karbohidratlardan (glikoz, ramnoz, maltoz, mannoz, salisin, fruktoz, dekstrin, nişasta) asit oluşturur, ancak gaz meydana getirmez. Buna karşın ksiloz, mannitol, dulsitol, inulin, inositol, adonitol ve rafinozu fermente edemez. İndol, üre, jelatin ve nitrat indirgemesi negatif, metil red ve Voges-Proskauer testleri pozitifdir. H₂S üretmez. Eskulini hidrolize eder ve kanlı agarda β-hemoliz yapar (Rosenow and Marth 1987, Arda vd. 1999, Besse 2002, Hitchins 2003).

Önceden *Corynebacteriaceae* familyası içinde yer alan *Listeria* cinsi, şimdi Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de "Düzgün Spor Oluşturmayan Gram Pozitif Çubuk Bakteriler (Regular Nonsporing Gram-Positive Rods)" grubunda *Clostridium-Lactobacillus- Bacillus* ile birlikte yer almaktadır. Bu grubun özellikleri DNA'daki düşük G+C oranı (< % 50), mikolik asit yokluğu ve lipoteikoik asit varlığıdır (Farber and Peterkin 1991, Holt *et al.* 1994).

Listeria cinsi 6 tür içerir. Bu türler; *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* *L. ivanovii* ve *L. grayi* 'dir. *L. grayi* ve *L. ivanovii* 'nin her ikisi ikişer alt tür içermektedir. Gıda mikrobiyolojisinde *L. ivanovii* 'nin alt türleri çoğu defa önemsenmez ve sadece *L. ivanovii* olarak değerlendirilir. 1961'de *L. denitrificans*, 1966'da *L. grayi* ve 1971'de *L. murrayi* *Listeria* cinsine eklenmiştir. 1983'te *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* eklenmiş, ardından 1984'te de *L. ivanovii* bu cinsine dahil edilmiştir. Daha sonraları *L. denitrificans* 'ın diğer *Listeria* türlerinden oldukça farklı olduğu görülmüş ve bu cinsten alınarak *Jonesia* cinsine dahil edilmiştir (Farber and Peterkin 1991). Çizelge 2.1'de *Listeria* türleri için ayırt edici biyokimyasal test sonuçları verilmiştir. *L. ivanovii* ve *L. monocytogenes*, fareler ve diğer hayvanlar için patojendir. *Listeria* türleri içinde sadece *L. monocytogenes*, genel olarak insan listeriozisi ile ilişkilendirilmiştir. İnsan listeriozisinde seyrek de olsa *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* varlığı da saptanmıştır. Hitchins 2002 yılında *Listeria* türleri içinde *L. ivanovii* 'nin insanlarda neden olduğu 7 listeriozis vakası bildirmiştir (Schönberg 1989, Hitchins 2003, Reisbrodt 2004).

Çizelge 2.1. *Listeria* türlerinin biyokimyasal test sonuçları (Hitchins 2003)

Türler	β - Hemoliz	Mannitol	Ramnoz	Ksiloz	CAMP <i>S. aureus</i>	CAMP <i>R. equi</i>	V ^b
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-*	+
<i>L. ivanovii</i> ^c	+	-	-	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	v ^d	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	v ^d	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. grayi</i> ^e	-	+	v ^d	-	-	-	-

^a Koyun kanlı agar

^b V Virülens-fare testi

^c Riboz fermente eden suşlar *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ve riboz fermente edemeyen suşlar *L. ivanovii* subsp. *londiniensis* olarak sınıflandırılmıştır.

^d v, değişken biyotipler

^e İki alt tür içerir, *L. grayi* subsp. *murrayi* nitrati indirgerken *L. grayi* subsp. *grayi* nitrati indirgemez.

* Nadiren suşlar S+ ve R+. R+ reaksiyon *L. ivanovii* 'ye göre daha seyrek görülmektedir.

Listeria türleri içerisinde yalnızca *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* kırmızı kan hücrelerini (eritrositleri) parçalayan bir hemolisin üretmektedir. β -hemolitik olan bu türlerin Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) testinde verdikleri pozitif ve negatif sonuç ile tanımlanmaları mümkün olmaktadır. CAMP testi, *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* için *S. aureus* 'la, *L. ivanovii* için *Rhodococcus equi* ile yapılır. *L.*

monocytogenes ve *L. seeligeri* 'nin hemolizi *S. aureus* kolonilerinin yakınında; *L. ivanovii* 'nin hemolizi ise *R. equi* kolonilerinin yakınında artar ve ok başı şeklinde tipik bir zon oluşturur (Hitchins, 2003).

İnsanlardan izole edilen *L. monocytogenes* 'lerin % 95'i 1/2a, 1/2b ve 4b olmak üzere 3 serovarda toplanmıştır. Bunlardan 4b suşları 1981 yılından bu yana yeryüzünde görülen pek çok bireysel hastalanma ve salgınların % 33-50'sinden sorumlu tutulurken, tersine olarak çoğu ülkede gıdalardan izole edilenlerin büyük çoğunluğu 1/2 serogrubuna girmektedir. Avrupa'daki listeriozis salgınlarında en çok rastlanan 4b serotipidir (Beumer and Hazelger 2003, Hitchins 2003). Diğer bakterilerden farklı olarak *Listeria* 'da, aynı serotipin farklı türlerde de olması nedeni ile serotiplendirme identifikasyon değil, daha ziyade hastalık etmeninin hangi serotipte olduğunun belirlenmesi için uygulanır. Son yıllarda salgınlardan sorumlu tutulan suşların karşılaştırmalı genom analizleri yapılmaktadır. Çizelge 2.2'de *Listeria* cinsinin serovarıları verilmiştir (Doğan 2000, Hitchins 2003, Lunden *et al.* 2004, Nelson *et al.* 2004).

Çizelge 2.2. *Listeria* serotiplerinin türlere göre dağılımı (Hitchins 2003)

Türler	Serotipler
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, B*
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, B*

B* belirlenemeyen

Diğer türlerle ortak serolojik komponentleri olmayan *L. grayi* ve *L. murrayi* 'nin haricinde 16 adet serovarı vardır. Sadece *L. ivanovii* 'nin bulunduğu "serovar 5" hariç, diğer serovarlar türe spesifik değildir (Hitchins 2003). *L. monocytogenes* 'in serovarıları Paterson tarafından sınıflandırılmış ve daha sonra Seeliger and Donker-Voet tarafından modifiye edilmiştir. 1990'lı yıllarda Garcia *et al.* tarafından revize edilmiş ve 4b serovarındaki IX faktörü bulunmuştur (Farber and Peterkin 1991). *Listeria* spp.'nin 4 adet ısıya duyarlı flagella antijeni (H) ve 15 adet ısıya dayanıklı somatik (O) antijeni vardır. *Listeria* türlerinde bulunan A, B, C ve D flagellar antijenlerinden en yaygın olarak bulunan B antijenidir. Patojen olmayan bütün türler *L. welshimeri* hariç *L.*

monocytogenes ile bir veya daha fazla somatik antijeni paylaşırlar. *Listeria* serotiplerinin türlere göre dağılımı Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. *Listeria* cinsinin serovarları (Farber and Peterkin 1991, Beverly 2004)

Seroavarlar	O antijenleri (Somatik)	H antijenleri (Flagella)
1/2 a	I, II, (III)	A B
1/2 b	I, II, (III)	A B C
1/2 c	II, (III)	B D
3a	II, (III), IV	A B
3b	(III), IV, (XII), (XIII)	A B C
3c	(III), IV, (XII), (XIII)	B D
4a	(III), (V), VI, VII, IX, X, XI, XV	A B C
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	A B C
4b	(III), V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XV	A B C
4c	(III), V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XV	A B C
4d	(III), V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XV	A B C
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	A B C
5	(III), V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XV	A B C
6a	(III), V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XV	A B C
6b	(III), V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XV	A B C
7	(III), XII, XIII	A B C

(): Antijen her zaman bulunmaz

Listeria suşları; *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *B. subtilis*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* ve *Salmonella* türleri gibi bazı bakterilerle bir takım küçük antijenik fraksiyonları paylaşırlar. Bunların dışında *L. monocytogenes* 'de çoğu Gram pozitif bakteride ortak olarak bulunan Rantz tipi bir antijen olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle listeriozis semptomu göstermemiş ama daha önce bu bakterilerle karşılaşmış kişilerin serumlarında yüksek oranda yalancı *L. monocytogenes* antikor titreleri görülebilmektedir. Bu durum, hastalığın aglütinasyonla tanısında yanılgılara neden olmaktadır. Hasta serumunun *S. aureus* veya *S. epidermidis* ile absorbe edilmesi bazı çapraz reaksiyonların önlenmesine yardımcı olmaktadır. Tripsin ile hazırlanan antijenlerle de çapraz reaksiyonların azaldığı gösterilmiştir (Us 2005).

Çeşitli faktörlerin 4b ve 1/2a serovarları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 1/2a serovarının 4 °C'de iki antilisterial bakterosine karşı 4b'den daha dayanıklı olduğu ve bunun tersi olarak da 4b serovarının 4 °C'deki depolama sonrası 60 °C'deki ısı işleme 1/2a serovarından daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Buna ilaveten 4b serovarının 4 °C'deki depolamadan sonra vücut sıcaklığı olan 37 °C'ye transferinde 1/2a serovarından daha kısa lag fazına ve daha yüksek patojeniteye sahip olduğu bildirilmiştir (Buncic *et al.* 2001).

2.3 Kaynağı, Yayılması ve Enfektif Dozu

L. monocytogenes, doğada çok yaygın olarak her yerde bulunabilir. Toprak, su, çürümüş bitkiler, gübre ve yeşil sebzelerden izole edilebilir. Süt ürünleri, et, sebze, deniz ürünleri gibi çiğ ve hazır gıdalardan ve gıdaların hazırlandığı ortamlardan izole edilmiştir (White *et al.* 2002).

Hastalığa neden olan gıdalar arasında; çiğ ya da pastörize süt, dondurma, çiğ sebze ve meyveler, fermente et ürünleri, çiğ veya pişmiş her çeşit et, çiğ veya tütsülenmiş balık, kabuklu deniz ürünleri, starter kullanılmadan üretilen taze peynirler, yumuşak peynirler, kanatlı ve hindi etleri, tüketime hazır yiyecekler, ısı işlem görmüş jambon, çeşitli sosis ve salamlar sayılabilir. *L. monocytogenes* açısından en riskli gıdalar tüketime hazır ve soğukta uzun süre depolanmış, dolayısı ile *L. monocytogenes* 'in gelişebildiği ve 100 kob/g'dan fazla sayıda *L. monocytogenes* içeren gıdalardır (Farber and Peterkin 1991).

Kampelmacher ve Jansen'in çalışmalarına göre; 1957-1976 yılları arasında Hollanda'daki çiftlik hayvanlarında listeriozis incelenmiş, hastalığın belirli coğrafi bölgelerde yaygın olduğu ve bu bölgelerde düşük kalitede yem kullanıldığı belirlenmiştir. Yem hazırlama standardı geliştirildiği zaman hastalığın azaldığı görülmüştür. Enfekte olan koyun beyninden izole edilen *Listeria* 'nın koyunun beslenmesinde kullanılan yulaf yeminden izole edilenlerle aynı serotipte olması aralarındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (Tunçel ve Gökten 1989).

L. monocytogenes süt sığırı, keçi, koyun, balık gibi birçok omurgalı ve omurgasız hayvanlarda parazit olarak yaşamaktadır. Evcil hayvanlar, kuşlar, balıklar, memeli hayvanlar ve taşıyıcı insanların dışkılarından izole edilebildiği için bitkisel ve hayvansal gıdalarda *Listeria* bulunması bir anlamda kaçınılmazdır. Burada bir döngü söz konusudur. Enfekte olmuş hayvanlardan *Listeria* 'nın etrafa yayılması; toprak ve tarla kontaminasyonuna ve tarladan elde edilen yeşil yemlerin kontaminasyonuna, buradan da et ve süt hayvanlarına tekrar geçmesine neden olmaktadır. Balık ve kabuklu deniz ürünleri sudan, sebzeler toprak ve sudan, süt sağım sırasındaki zayıf hijyen koşullarından ve et, av eti, kanatlı etin ise kesim sırasındaki karkasın dışkıyla direkt temasından kontamine olmaktadır. Döngü devam ederken kontamine sebze, meyve, süt ve etten bakterilerin insanlara geçişi gerçekleşmektedir (White *et al.* 2002, Beumer and Hazeleger 2003). *L. monocytogenes* 'in çiğ ette, sütte ve sebzede bulunması diğer gıdalarla çapraz kontaminasyonu için de risk oluşturmaktadır (Skovgaard and Morgen 1988).

Türkiye'de çiğ ve pastörize sütlerde yapılan bir araştırmada 77 çiğ süt örneğinin 14'ünde (% 18,2) *L. monocytogenes* bulunmuştur (Sharif 1991). Erzurum piyasasından temin edilen 34 Beyaz peynir ve 16 Civil peynirinde *Listeria* analizi yapılmış ve beyaz peynir ve civil peynir örneklerinin sadece 1'inde *L. monocytogenes* ve *L. innocua* izole edilmiştir (Kara vd. 1999).

Kahramanmaraş ve Adana'dan toplanan dondurma örneklerinin % 41,3'ünde *Listeria* türüne rastlanmıştır. Dondurmadan en çok izole edilen türün *L. grayi* (%37,9) olduğu bulunmuştur (Akman vd. 2004). Van ilinde tüketime sunulan kremalı pastalarda *Listeria* analizi yapılmış ve % 16,0 oranında *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Sancak vd 2002). Afyonkarahisar ilinde piyasadan toplanan kremalı pasta örneklerinin % 7'sinde *L. monocytogenes* belirlenmiştir. Tüketime sunulan pastalarda patojen olan *L. monocytogenes* 'in bulunması halk sağlığı açısından risk oluşturacağı belirtilmiştir (Akkaya vd. 2006).

Ankara ilinde yapılan bir çalışmada çiğ ve pişmiş et ürünlerinin % 54,1'inde *Listeria* spp. belirlenmiş ve pozitif sonucun % 6,16'sında *L. monocytogenes* % 46,57'sinde *L. innocua* belirlenmiştir (Yücel vd. 2005).

Erzurum ilinden toplanan pişmiş döner örneklerinin % 20'sinde *Listeria* spp. tespit edilmiş ve dönerden izole edilen *Listeria* türlerinin % 18,75'inin *L. monocytogenes*, % 21,88'inin ise *L. innocua* olduğu belirlenmiştir (Gençer ve Kaya 2004). Ülkemizde et ürünleri üzerine yapılan bir çalışmada, toplanan et ürünlerinin % 35,5'inde *L. monocytogenes* varlığı gösterilmiş ve özellikle kokoreç, ızgara şiş köfte, ızgara köfte ve ızgara balığın çok rizikolu gıdalar olduğu bildirilmiştir (Sharif 1993).

Ankara ilinde satılan tavuk eti ürünlerinde *Listeria* varlığı araştırılmış ve tavuk etinden yapılmış burger örneklerinin *Listeria* spp. ile kontaminasyon düzeyinin kıyma ve köftelerden daha düşük olduğu bulunmuştur (Şireli vd. 2002). Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve et ürünlerinde *Listeria* türleri araştırılmış ve % 33,8 oranında *L. monocytogenes* belirlenmiştir (Güven ve Patır 1998). Van ilinde satışa sunulan 250 adet et ve et ürünlerinde % 12,8 oranında *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Berktaş vd. 2006). Değişik firmalara ait paketlenmiş şekilde 50 adet donmuş broiler karkas örneğinin % 30'unda *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir (Erol ve Şireli 1999).

L. monocytogenes 'in en düşük enfektif dozu bulunamamıştır. Gıdaların çoğunda *Listeria* sayısı 10^2 kob/g bulunmuştur. Ancak tüketime hazır gıdaların buzdolabındaki raf ömürleri süresince bu sayı yükselmekte ve 10^6 - 10^8 kob/g'a ulaşmaktadır (Beumer and Hazeleger 2003).

Çeşitli sebzelerde *L. monocytogenes* 'in belirlendiği bir çalışmada, *L. monocytogenes* lahana, salatalık, patates ve turptan izole edilirken, *L. innocua* salatalık, marul, mantar, patates ve turptan, *L. seeligeri* lahana ve turptan *L. welshimeri* ise salatalık, patates ve turptan izole edilmiştir. Sadece patateslerde % 25,8 ve turpta % 30,3 pozitif sonuç alınması önemli miktarda *L. monocytogenes* kontaminasyonunun göstergesi olarak bulunmuştur (Heisick et al. 1989a).

2.4 Gelişmesi ve Canlı Kalması

L. monocytogenes 'in toprakta 2-6 ay, sütte 12 ay, koyun dışkısında 3 ay, sığır dışkısında 16 ay ve çeşitli gıda maddelerinde 5-26 ay kadar canlı kaldığı belirlenmiştir (Arda 1999, CFSSAN 2001).

L. monocytogenes 'in ısıtma, dondurma, kurutma, asitle muamele, dezenfektanlar ve yüksek ozmotik basınç gibi uygulanan çeşitli işlemlerden nasıl etkilendiği ve zarar görmüş bakterilerin nasıl saptanabileceği konusunda pek çok çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların tamamında hedef, sahte negatif bulunan sonuçların en aza indirilmesidir. Özellikle kombine stres faktörleri generasyon süresini 24 saat ve daha üzerine çıkarabilmektedir (Francois *et al.* 2006).

L. monocytogenes 'in çevresel streslere adaptasyonundan sonra stresin cinsine bağlı olarak koruma faktörü oluşmaktadır. Isıl işlem şoku, etanol ve tuza olan direnci arttırmıştır (Lou and Yousef 1997).

Yapılan bir çalışmada *L. monocytogenes* 'in taze dilimlenmiş turpun yıkanmasıyla uzaklaşmadığı ve bakterinin turp dokusuna bağlandığı görülmüştür. İncelemeler sonucunda bakterinin 3 geninde mutasyon saptanmış ve bu genlerden ikisinin hangi fonksiyonlarla ilgili olduğu bilinmemektedir. Sonuçta *L. monocytogenes* 'in farklı sıcaklıklarda farklı bağlanma faktörleri içerdiği belirlenmiştir (Gorski *et al.* 2003).

10^4 - 10^5 kob/mL düzeyinde *L. monocytogenes* içeren çiğ süt 63 °C'de 30 dakika pastörize edilip salamura beyaz peynir yapımında kullanılmış ve olgunlaşmanın 15. gününe kadar *L. monocytogenes* sayısı artmış daha sonra azalma görülmüş ancak 90. günde bile *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Sarımehmetoğlu 1995).

Vakumla paketlenme, 0 °C ve 4 °C'de muhafaza işlemlerinin İnegöl köftelerde *L. monocytogenes* riskini ortadan kaldırmadığı ve tüketilmeden önce köftelere yeterli ızgara işlemi uygulanmasının önem kazandığı belirtilmiştir (Soyutemiz 2000).

2.5. Çeşitli Stres Koşullarının *Listeria monocytogenes* 'e Etkisi

2.5.1. Sıcaklığın etkisi

L. monocytogenes, geniş bir sıcaklık aralığında canlılığını sürdürme ve gelişme kabiliyetindedir. Optimum gelişim sıcaklığı 30-37 °C olmakla birlikte 1-45 °C gibi daha düşük ve daha yüksek gelişim limitleri vardır (Doyle 1988, Meadows 2004).

Sıcaklığın *L. monocytogenes* üzerine etkisi yıllar boyunca pek çok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Bunlar içinde çiğ süt ve süt ürünlerinde Donnelly ve Brigs, 1986; Bunning ve ark., 1986-1988; Beckers ve ark., 1987; Bradshaw ve ark., 1985-1987; Garayzabal ve ark., 1987; Doyle ve ark., 1987; Lovett ve ark., 1988; Farber ve ark., 1988-1989; tavuk etinde Murphy ve ark., 2000; sebze de Mazzotta, 2001; sosisli sandviçte Mazzotta ve Gombas, 2001 bilinmektedir (Beckers *et al.* 1987, Farber 1989).

L. monocytogenes 'in ısıl direnci suş farklılığı, kültürün yaşı, gelişme koşulları, geri alma besiyeri, gıdanın özellikleri, tuz içeriği, su aktivitesi, asitlik ve diğer inhibitörlerin varlığı gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Benzer deneme koşullarında bazı suşların laboratuvar kültür ortamında oldukları zaman 2,5-3 kat daha dirençli oldukları belirlenmiştir. *L. monocytogenes* hücreleri yavaş ısıtıldıkları zaman hızlı ısıtmaya göre daha büyük ısıl direnç gösterirler (Doyle *et al.* 2001).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 71,7 °C'de 15 saniye süreyle yapılan pastörizasyonun çiğ sütlerdeki *L. monocytogenes* düzeyini insan sağlığı açısından risk oluşturmayacak bir düzeye indirdiğini bildirmiştir. Ancak yüksek sıcaklık ve kısa zaman (HTST) pastörizasyonu (71,7-73,9 °C'de 16,4 saniye) kullanılarak yapılan bir çalışmada pastörize edilen 9 örneğin 6'sından *L. monocytogenes* izole edilerek çok nadir de olsa bu bakterinin canlı kalabildiği belirlenmiştir. Massachusetts'daki listeriozis salgınındaki kaynağın pastörize içme sütü oluşu ve pastörizasyon hattında hiçbir hata bulunamayışı bu sonucu doğrulamaktadır (Doyle *et al.* 1987). Scott A suşu 1983'teki bu listeriozis salgınıyla ilişkilendirilmiştir (Bradshaw *et al.* 1987). Ayrıca İspanyadaki bir fabrikada

78 °C'de 15 saniye pastörize edilmiş süt örneklerinin % 21'inden *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Rosenow and Marth 1987).

L. monocytogenes 'in sıcaklığa karşı direnci konusunda değişik görüşler bulunmaktadır. *L. monocytogenes* 80 °C'de 1 dk., 75 °C'de 5 dk., 70 °C'de 15 dk., 65 °C'de 30 dk., 60 °C'de 30 dk. ısı işlemi sonucunda canlı kalabilmektedir (Beckers *et al.* 1987). Buna benzer olarak yapılan bir çalışmada 61,7 °C'de 35 dakikalık pastörizasyon sonunda organizmanın 5×10^3 kob/mL düzeyinde canlı kalabildiği görülmüştür. Bu durum salgınların nedenini açıklamaktadır. Bu nedenle peynir yapılacak çiğ süte uygulanacak pastörizasyon işleminde sıcaklığın 72 °C'nin altına düşürülmemesine dikkat edilmelidir. Olgunlaştırılmış Cheddar peynirinde *L. monocytogenes* 'in 400 günden fazla canlı kaldığı belirlenmiştir (Doyle 1988). 60 °C'de 30 dakika ısı işleminden sonra bile canlı kalabilen suşlar olduğu gibi 69 °C'de 80 sn.'de inhibe olan suşların da olması ısı işlemin etkinliğinde suş farklılığının önemli rol oynadığını göstermektedir (Golden *et al.* 1988b, Farber *et al.* 1988).

L. monocytogenes 'in sütte ısı dirençlerinin belirlenmesinde kullanılan onaylanmış tüp termal inaktivasyon yöntemi, test tüp yöntemi karşılaştırılmış ve tüp termal inaktivasyon yöntemiyle sütte bütün suşlar hızlı bir şekilde inaktive olmuştur. D_{62} değeri 0,1-0,4 dakika arasındadır. Bunun tersine, test tüp yönteminde 62 °C'de 30 dakikada bile inaktivasyon gerçekleşmemiştir. Sonuçta test tüp yönteminin termal direnci ölçmede yetersiz kaldığı ve yanlış sonuçlara neden olduğu anlaşılmıştır. Bu durum termal inaktivasyon çalışmalarındaki farklı sonuçların nedeni olarak görülebilir (Donnelly *et al.* 1987).

Süt kompozisyonunun hücre gelişimini etkilediği ancak termal direnci etkilemediği bulunmuştur. Tam yağlı sütte *L. monocytogenes* serotip 4b'nin psikotropik gelişimi yağsız süte göre daha yüksek olmaktadır (Donnelly and Brigs 1986). Eğer ürünün yağ oranı % 10 veya daha fazla ise ısı işlem sıcaklığı 2,9 °C arttırılmalıdır (Bradshaw *et al.* 1987). Çikolatalı sütte *L. monocytogenes* tam yağlı, yağsız süt ve süt kremasına göre 10 kat daha fazla gelişmiştir (Rosenow and Marth 1987).

Isıl işleme hasar görmüş (55 °C 20 dakika) *L. monocytogenes* 'in pastörize sütte 4 °C'de 19 gün, 10 °C'de 4 gün, 26 °C'de 13 saat ve 37 °C'de 9 saatte tamamen canlılıkların geri kazandıkları bulunmuştur (Besse 2002).

L. monocytogenes intraselüler bir patojen olması nedeniyle, kontamine olduğu sütte lökositlerin içinde bulunmaktadır. Lökositlerin bakteriyi ısıl işleme karşı koruduğu ancak pastörize edilmeden 4 °C'de 4 gün ve daha fazla depolanan sütte lökositlerin koruyucu etkisi yok olduğu ve *L. monocytogenes* 'in ısıl direncinin azaldığı belirlenmiştir (Doyle *et al.* 1987). Bazı patojenlerde hücrenin kısa bir süre optimum gelişme sıcaklığının üzerinde bir sıcaklığa (termal şok) maruz kalmaları durumunda da sıcaklığa tolerans kazandığı bilinmektedir. Termal şok sırasında sentezlenen termal şok proteinleri öldürücü sıcaklıklarda bakterinin sıcaklığa direncini artırır. Termal şokun dışında termal şok proteinlerinin hücrenin pH, ozmotik basıncın değişmesi, UV radyasyonu, etanol, antibiyotikler, aromatik bileşikler veya ağır metaller gibi toksik bileşiklere maruz kalması durumunda da sentezlendiği bilinmektedir (Doyle *et al.* 2001, Tosun ve Gönül 2002).

Brokoli, tatlı yeşil biber, soğan, mantar ve bezelyede 1/2 a, 1/2 b ve 4b serotiplerinin ısıl direnci belirlenmiş ve en yüksek değer bezelyeden elde edilmiştir. Brokoli, havuç, karnabahar gibi sert sebzeler ısıl işleme karşı daha dayanıklıdır ve bakteri yüksek sıcaklıktan uzun zaman etkilenmez (Mazzotta 2001).

Mikrodalga fırında etin tavsiye edilen sürede pişirilmesinde *L. monocytogenes* canlı kalabilmektedir. Puding ve krema sos 60 °C'de mikrodalga fırında ısıtıldığı zaman *L. monocytogenes* popülasyonu yaklaşık sırasıyla 2,4 ve 1,6 log indirgenmiştir (Doyle *et al.* 2001). *L. innocua* 'nın D değerleri *L. monocytogenes* 'ten yaklaşık 1,5-3 kat daha fazladır. *L. innocua* inoküle edilmiş tavuk etli börek düşük nemde pişirildiğinde örnekte yaklaşık >2 log birimlik indirgenme elde edilmiştir (Murphy *et al.* 1989, 2000).

L. innocua, bazı *L. monocytogenes* suşlarından daha fazla ısıl direnç göstermektedir (Doyle *et al.* 2001). *L. innocua*, *L. monocytogenes* 'ten 42 °C'de daha hızlı gelişir ancak bundan daha yüksek sıcaklıklarda *L. innocua* gelişimi *L. monocytogenes* 'ten daha yavaş

olur. Sıcaklığın gelişim oranına ve lag zamanına etkisi üzerine bir model oluşturulmaya çalışılmıştır (Duh and Schaffner 1993).

L. monocytogenes 'in soğutmaya karşı olan direnci sütte Doyle (1988), lahanada Beuchat and Bracket (1990), tavuk suyunda Murphy *et al.* (2001) ve Meadows (2004), et ürünlerinde Beverly (2004), dumanlanmış somon balığında Yoon *et al.* (2004) tarafından belirlenmiştir. Süt, et ve deniz ürünlerinde *L. monocytogenes* 'in gelişim oranı ve gelişim ihtimaline çevre faktörlerinin etkisi araştırılmış ve tahminleyici matematiksel modeller oluşturulmuştur (Augustin *et al.* 2005).

Sütlerin 0 °C'de depolanmasında ve tavuk suyunda -0,4 °C kadar düşük sıcaklıkta bile bakterinin canlı kalması yanında gelişmesini de sürdürdüğü görülmüş, buna dayanarak soğutmanın *L. monocytogenes* 'e karşı yeterli bir koruma yöntemi olmadığı sonucuna varılmıştır. Yöntem karşılaştırmaları üzerine yapılan bir çalışmada pastörize edilmiş sütün soğuk depolanması sırasında hasarlı hücrelerin çoğalarak pastörize süttten bakterinin geri alınmasına izin verdiği anlaşılmıştır (Crawford *et al.* 1989). 1948 yılında Gray vd. 4 °C'de soğukta ön zenginleştirme işlemiyle bakteri sayısını arttırmayı başarmıştır. Süt içerisinde +4 °C'de gelişen bakterinin generasyon süresi 1,2-1,7 gün olarak belirlenmiştir. 8 °C'de generasyon süresi kısalarak 8,7-14,6 saate düşmüştür. Hindi eti ve sosislerde -18 °C'de 8 hafta depolamadan sonra bu patojenin sayısında sadece 1-3 log birimlik azalma olduğu bildirilmiştir (Doyle 1988, Murphy *et al.* 2001, Meadows 2004).

L. monocytogenes gibi psikrotrofik bakteriler, soğuk stresine karşı koyabilmek için soğuk şoku proteinleri adı verilen özel proteinler sentezlerler. Bu proteinlerin işlevleri tam olarak bilinmemekle birlikte mikroorganizmayı donmaya karşı koruduğu, soğukta depolama sırasında buz kristallerinin oluşmasını engellediği ve donma sıcaklığını düşürdüğü bilinmektedir. Soğuk şoku proteinleri, bakterinin gelişmesi ani sıcaklık düşüşü ile (soğuk şoku) kesilirse sentezlenmektedir (Besse 2002, Tosun ve Gönül 2002, Beumer and Hazelger 2003).

2.5.2. pH'nın etkisi

L. monocytogenes, pH 4,1-9,6 aralığında gelişebilmektedir. Yapılan bir çalışmada pH 5,2'nin altına düştüğü zaman *L. monocytogenes* geri alınamamıştır (Bailey *et al.* 1990a). Parish and Higgins (1989) 4 farklı *L. monocytogenes* suşunun 30 °C'de pH 4,5 ve üzerinde TSB+YE besiyerinde ve pH 4,8 ve üzerinde portakal suyunda gelişebilme özelliğinde olduğunu bildirmiştir. En düşük pH değeri olarak pH 4,4'te 30 °C'de, selektif olmayan besiyerinde *L. monocytogenes* 'in geliştiği bulunmuştur (George *et al.* 1988).

Bakteri alkali pH'ya karşı oldukça dirençlidir ve pH 9,6 da gelişebilmektedir. pH 2,5'da 2 saat asit stres altında bekletilen suşlardan gıda kaynaklı olanların klinik kaynaklı olanlara göre aside karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur. *L. monocytogenes* 'in 4 °C'de lag fazında olmasına rağmen düşük pH'da canlılığını yitirdiği bulunmuştur. Ancak düşük pH'lı ürünlerin de salgınlarla ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Doyle 1988, Meadows 2004).

ATR (Acid Tolerance Response); "bir bakterinin orta derecede asitliğe maruz kaldıktan sonra, yüksek asitliğe karşı kazandığı direnç" olarak tanımlanır ve organizmayı öldürücü pH değerlerinde korur. Aside duyarlılık logaritmik üreme döneminde görülür. Bu dönemde bakteri asit stresine maruz kalırsa (pH 5-5,5) ATR indüklenir. ATR'nin indüklenmesi *L. monocytogenes* 'te protein sentezi ile gerçekleşir (Gahan and Hill 1999, Faleiro *et al.* 2003, Tosun ve Gönül 2004). Ayrıca ATR ve nisin üreten bakterilerle fermantasyon sonunda oluşan çapraz direncin oluştuğu ve bunun en az 30 gün sürdüğü belirlenmiştir (Bonnet and Montville 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, patojen bakterilerde asidik ortamlara uyum sağlamalarına yarayan mekanizmaların olduğu ortaya çıkmıştır. *L. monocytogenes* orta derecede asitli (pH 4,5-5,0) ortamlara belirli bir süre maruz kalırsa spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri sentezleyerek yüksek asitli ortamlarda canlılıklarını sürdürebilmektedir. Bu mekanizma sonucunda, aside adapte olmuş hücrelerde termal strese, ozmotik strese, kristal viyoleye ve etanole olan direncin arttığı bilinmektedir. pH 2,5'de 2 saat süreli asit stresi altında bekletilen suşlardan gıda

kaynaklı olanların, klinik kaynaklı olanlara göre aside karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Ancak düşük pH'lı ürünlerin de salgınlarla ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Gahan and Hill 1999, Besse 2002, Tosun ve Gönül 2002, 2004).

Elma, portakal ve beyaz üzüm suyunda asit adaptasyondan sonra *L. monocytogenes* 'in ısıl direnci daha yüksek olmuştur (Mazzotta 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes* gibi düşük pH'lı ortamlara adapte olabilen patojen bakterilerin hastalık yapma yetenekleri ile aside adaptasyonları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Gahan and Hill 1999). Çilek suyunda pH 4,7'nin altında 4 °C'de 2 saatte *L. monocytogenes* hızlı bir şekilde hasar görmektedir (Han and Linton 2004). Suşların duyarlılığı düşük pH ve yüksek NaCl konsantrasyonunda değişkendir. *L. monocytogenes* pH 5,5'e tolerans göstermiştir (Faleiro *et al.* 2003). Başka bir çalışmada ise pH 5,2'nin altına düştüğü zaman *L. monocytogenes* geri alınamamıştır (Bailey *et al.* 1990a).

Çalışmada soğuktan etkilenmiş *L. monocytogenes* 'in özellikle CO₂'ce zengin atmosfer altında, yüksek asitli, proteolitik enzim içeren bir ortamda ve safra tuzlarının aktivitesinde canlı kalma kabiliyeti laboratuvar denemeleriyle incelenmiş; bakterinin mide ve bağırsak geçişi sırasında mikrobiyel enfeksiyonlara karşı insan vücudundaki savunma mekanizmasının bazı önemli özellikleri canlandırılmıştır. Çalışma sonucunda *L. monocytogenes* 'in kuvvetli asit ve safra tuzları ortamında canlı kalmasının mümkün olduğu görülmüştür. % 40 CO₂: % 60 N₂ ortamı ve % 100 CO₂ ortamında safra tuzlarıyla temas ettiği anda canlılık kaybı hızlanmıştır (King *et al.* 2003).

2.5.3. NaCl'ün etkisi

L. monocytogenes tuza oldukça toleranslı bir mikroorganizmadır. Bakteri NaCl'ün inhibitör etkisine dirençlidir. %16 NaCl varlığında pH 6,0'da 1 yıl canlı kalabilmektedir. Organizmanın % 10 tuz içeriğinde 25 °C'de 72 saatte geliştiği bildirilirken, % 30,5 gibi oldukça yüksek tuz konsantrasyonlarında 100 gün canlı kaldığı ancak sıcaklık 37 °C'ye yükseldiğinde bu sürenin 5 güne indiği bildirilmiştir. *L. monocytogenes*, % 25,5 NaCl

içeriğinde 37 °C'de 4 gün, 22 °C'de 24 gün, 4 °C'de ise 132 gün canlı kalmaktadır (Rosenow and Marth 1987, Faleiro *et al.* 2003).

Yapılan bir çalışmada % 6, 16 ve 26 oranında NaCl içeren çözeltilerde *L. monocytogenes* 'in 10 °C'de 6 saat canlılığını koruduğu bulunmuştur. Ortamda tuzun bulunması *L. monocytogenes* 'i sıcaklık, pH gibi olumsuz etkilerden kısmen korumaktadır. Düşük seviyelerdeki NaCl'ün bakteriyi pH 3,5'da oluşan asit şokuna karşı koruduğu bulunmuştur. % 2,5-3,0 oranında NaCl konsantrasyonunun düşük sıcaklıklarda bakteriyi koruyucu bir etkisi olduğu gözlenmiştir (Meadows 2004). Isıl işleme hasar görmüş hücrelere karşı NaCl'ün etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 5, 10 ve 20 g/L NaCl LEB ve UVM besiyerlerine eklenmiş ve *L. monocytogenes* 'in geri alım seviyesinde çok az bir farklılık olduğu saptanmıştır (Bailey *et al.* 1990a). Çalışmalarda gıda ve klinik izolatlarında % 8 NaCl varlığında *L. monocytogenes* 'in lag fazının daha uzun sürdüğünü ve kontrole karşılaştırıldığında generasyon süresinin ortalama 2,5 kat arttığı bildirilmiştir (Meadows 2004).

Stres altındaki bakterinin geri alımında NaCl önemli bir inhibitördür. *L. monocytogenes* 'in canlandırılmasında % 0,5 NaCl, 37 °C'de ve pH 8,0'de 5,5 saat sürmektedir. Hasarlı hücreler % 10 tuz konsantrasyonunda 22-43 °C arasında ve pH 5,0'den-8,0'e onarım zamanı 49 ile 94 gün arasında değişmektedir. Ayrıca analiz sırasında kullanılan seyreltme çözeltilerindeki tuzun hasarlı hücrenin onarımına engel olduğu ve hücreye zarar verdiği belirtilmiştir (Besse 2002).

2.5.4. Diğer faktörlerin etkisi

L. monocytogenes, bir çok gıda maddesinde çoğalabilmektedir. Çünkü düşük su aktivitesinde bile hayatta kalıp gelişebilmektedir. Minimum A_s değeri 0.92 (mutfak tuzunda) olarak belirlenmiştir (Rosenow and Marth 1987). Süttozlarının püskürtülerek kurutma işleminin *L. monocytogenes* sayısında 1-1,5 log kadar bir azalmaya neden olduğu ve süttozlarının oda sıcaklığında depolanması sırasında *L. monocytogenes* 'in en az 12 hafta süre ile 10^5 kob/mL düzeyinde canlı kalabildikleri bulunmuştur (Doyle

1988). *L. monocytogenes* Scott A suşu modifiye BHI'da 0,99-0,80 A_S'de gelişmiştir. Çözeltinin çeşidine bağlı olarak A_S değeri de değişmektedir. Örneğin gliserolde A_S değeri 0,90, NaCl'de 0,92, sakkarozda 0,92 ve propilen glikolde 0,97'dir (Meadows 2004).

Laktik, asetik, tartarik veya sitrik asit % 1 oranında eklendiğinde bakteri sayısında 1-2 log indirgenme sağlanmakta ancak, buzdolabı şartlarında depolanan üründe canlı kalan *Listeria* tekrar gelişmektedir. Ancak % 5 oranında asetik veya sitrik asit eklenirse 90 gün depolama boyunca *L. monocytogenes* yeniden gelişemez. Frankfurter tipi sosislerde sodyum laktat, sodyum diasetat, laktik asit ve asetik asit ilavesinin *L. monocytogenes* 'e etkisi araştırılmış ve hepsinin 10 °C'de depolamada *L. monocytogenes* 'in kontrolünde etkili olduğu bulunmuştur (Doyle 1999, Barmpalia *et al.* 2004).

Nisin ve pediosin gibi bakteriyosinler *L. monocytogenes* 'in gelişimini engellemektedir ancak bazı çalışmalarda bunun aksine bakterinin bu bakteriyosinlere karşı direnç geliştirdiği de gösterilmiştir (Gandhi and Chikindas 2007). 125 IU nisin kullanımı 4-6 saat gibi kısa bir sürede patojenin sayısında yaklaşık 4 log birimlik bir düşüşe neden olmuştur (Bhatti *et al.* 2004). *L. monocytogenes* Scott A suşunda nisin 32 IU /mL'de 72 saat inhibitör etkiliyken, diğer suşlar daha az dirençli olabilmekte ve 500 IU/mL nisinde gelişebilmektedir (Doyle 1988). Nisin, asetik asit, sodyum diasetat ve potasyum benzoat kombinasyonları laktik asit, sodyum asetat ve potasyum sorbat'tan daha etkilidir. Nisinin, 3-5 g/100 mL asetik asit veya sodyum asetatla veya 3 g/100 mL potasyum benzoatla kombinasyonları *L. monocytogenes* 'in gelişimini 90 gün önlediği belirlenmiştir (Doyle 1988, Samelis *et al.* 2005). Gıdanın kimyasal kompozisyonu ve işlenme şekli nisinin antilisteriyal etkisinde önemli rol oynamaktadır (Bhatti *et al.* 2004).

Sorbat ve benzoat 60 °C'nin altındaki sıcaklıklarda *L. monocytogenes* 'e etkili olmakta ve D değerinde 100 kat kadar indirgenmeye neden olmaktadır (Doyle *et al.* 2001). Potasyum sorbat (% 0,2) ve sodyum benzoat (% 0,1), 13 °C'de ve pH 5,0'te bakterinin gelişimini inhibe etmektedir. Nitritin *L. monocytogenes* 'e karşı antimikrobiyel etkisi

gıdalarda bulunmasına izin verilen seviyelerde yoktur. Nitrit ancak 5 °C'de pH < 5,5 ve % 3'lük NaCl varlığında etkili olmaktadır (Doyle 1988, Samelis et al. 2005).

Yapılan çalışmalarda *Listeria monocytogenes* 'in *Staph. aureus* ve *Enterococcus faecalis* 'e kıyasla ozona karşı daha duyarlı olduğu belirlenmiş ve 0,4 ppm ozon uygulamasının 13 saniyede *L. monocytogenes* sayısında yaklaşık 7 log birimlik azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca temas süresinin artmasıyla indirgenme oranının da arttığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar ozon uygulamasında Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin ölüm oranları arasında önemli düzeyde fark olmadığını, ancak Gram pozitif bakteriler arasında *Listeria monocytogenes* 'in *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* 'e kıyasla ozona karşı daha duyarlı olduğunu ortaya koymuştur (Kim and Yousef 2000, Turantaş 2001).

Tavuk etinde *L. monocytogenes*, ışınlamaya karşı direnci konusunda değişik yorumlar vardır. Farklı etlerde bakterinin ışınlama direncinin önemli oranda değişmediği belirlenmiştir. 5 °C'de D₁₀ değeri 0,5 kGy'dir (Griffiths 2003). *L. monocytogenes* 'in orta dozdaki radyasyon uygulamalarına duyarlı olduğu, kırmızı ete soğutma öncesi uygulanan 2,0 kGy'lik ışınlamanın, 5,0 log düzeyinde indirgeme sağladığı ve 7 günlük vakum veya hava atmosferinde depolama sırasında bakteri sayısında değişiklik gözlenmemiştir. Işınlamanın *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş et ürünlerinin korunması için etkili bir yol olduğunu ancak ışınlama ile hasara uğratılmış hücrelerin 4 °C'de açıkta muhafazası sırasında kendilerini yenileyebileceği ve risk oluşturabileceği de belirtilmiştir (Fu et al. 1995).

Yüksek voltajlı elektrik alan darbesinde hücre membranı geri dönüşümsüz olarak zarar görmekte, önemli hücre bileşenleri dışarı çıkmakta ve hücre ölmektedir. Bakteri sporları, Gram pozitif hücreler ve gelişimin durağan fazındaki hücreler PEF etkilerine daha dirençlidirler. *L. monocytogenes* için sütte, sürekli sistemde PEF uygulandığı zaman bakterinin inaktivasyonu 25 °C'de 3 log iken 50 °C'de 4 log olmaktadır (Doyle 1999).

Çeşitli gıdalarda (süt, peynir, dondurma miksi, sığır eti ve domuz eti) yüksek basınç uygulaması sonucunda bakterinin canlı kalabildiği bulunmuştur. Çiğ sütte 350 MPa basıncın *L. monocytogenes* 'i inhibe ettiği belirlenmiştir (Griffiths 2003). 300, 500 700 MPa basınç uygulanmış vakum paketli frankfurter tipi sosislerde *L. monocytogenes* sayısında sırasıyla 1; >3; >5 log birimlik azalma elde edilmiştir (Lucore *et al.* 2000).

Baharatın *L. monocytogenes* 'in gelişimi üzerine yapılan araştırmalarda en etkili baharatın karanfil, yabani mercan köşk, tarçın ve adaçayı olduğu belirlenmiştir. Kara biber, kırmızı biber, sarımsak ve soğandan beklenen etki alınamamıştır (Üner vd. www.istanbul.edu.tr/fakulteler/veteriner/vetfakdergi/yayinlar/2000-1/Makale%201.pdf, 2007). *L. monocytogenes* Gram pozitif bakteriler içinde sumağa en dirençli bakteridir. MİK değeri % 0,67 olarak bulunmuştur (Abbas and Halkman 2004).

2.6. *Listeria monocytogenes* 'in Neden Olduğu Enfeksiyonlar ve Listeriozis

Listeriozis, *L. monocytogenes* 'in neden olduğu çeşitli sendromlara verilen isimdir. Menenjit, septisemi, beyin iltihabı, karaciğer apsesi, endokardit, gebelerde düşük veya ölü doğumlara neden olmaktadır. En sık görülen bulaşma yolu kontamine gıdaların tüketilmesidir. Anneden bebeğe geçişin de mümkün olduğu, bunun dışında insandan insana geçmesinin çok nadir olduğu belirtilmiştir. Hastalık genellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kişileri (kanser, şeker, böbrek ve AIDS hastaları) hamileleri, yeni doğan bebekleri ve yaşlıları tehdit etmektedir (Hof *et al.* 1997, McLauchlin *et al.* 2004, <http://www.mikrobiyoloji.org> , 2004). Ancak bağışıklık sistemi sağlam yetişkinlerde de menenjit vaka bildirimi olmuştur (Turunç vd. 2004).

L. monocytogenes 'in neden olduğu listeriozisin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır ancak, *L. monocytogenes* 'in β -Listeriolizin adı verilen bir hemolisin üretimine bağlı olarak patojenite gösterdiği bilinmektedir. Listeriolizin, hücrelerin sitoplazmik membranlarında porlar açarak hücrenin geçirgenliğini bozan ve parçalanmasına neden olan toksik bir maddedir. *L. monocytogenes*, kültürlerde tripsine duyarlı, diyalize olmayan, termolabil ve antijenik karakterde hemolisin sentezler. Bu

hemolisinin üretimi ile lipaz üretimi arasında bir ilişki olduğu ve sadece virüent suşların lipolitik olduğu gösterilmiştir (McCarthy 1991, Arda vd. 1999).

Listeriozis görülen kişilerde ölüm oranı % 20-50 arasında değişirken yeni doğanlarda bu oran % 80'e kadar çıkmaktadır. Hastalık yapıcı doz, 100 canlı hücrenin üzerinde gibi görünmesine rağmen henüz kesin olarak bilinmemektedir. Ancak, epidemiyeye neden olan bir peynirde *Listeria* 'nın 10^3 - 10^4 kob/g düzeyinde bulunması bir fikir vermektedir (CFSSAN 2001, CDC 2001).

Gıda tüketildikten 12 saat sonra ateş, karın krampları, diyare, yorgunluk, baş ağrısı ve kusma ile seyredilebilen gastrointestinal bir sendrom ortaya çıkar. Listeriyal menenjit ve bakteriyemi gibi daha ciddi durumlar ancak günler veya haftalar sonra ortaya çıkar. Bu sendromların başlama süresi 11-70 gün arasında (ortalama 21 gün) değişmektedir. Bu süre enfektif doza ve hastanın durumuna bağlıdır (CFSSAN 2001, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004).

Süt ürünleri invasiv ve invasiv olmayan listeriozis salgınlarının her ikisiyle de ilişkilidir. İnvaziv listeriozis salgınları, meningoensefalitis, ensefalitis, sepsis ve düşüğe neden olmakta ve % 20-30 gibi oldukça yüksek ölüm oranına sahiptir. İnvaziv olmayan listeriozis salgınları ise hamile ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan spesifik risk grubundaki kişileri etkilemektedir. İnvaziv olmayan listeriozis sağlıklı insanlarda ishal, kas ağrısı, baş ağrısı, bulantı, kusma ve abdominal ağrı gibi daha az hastalığa neden olmaktadır. Aşağıda yetişkinlerdeki listeriozis ile ilişkili invasiv ve invasiv olmayan sendromların özellikleri verilmiştir (Lunden *et al.* 2004, Beverly 2004).

-İnvaziv; 30 gün inkübasyon süresi

-Gebe değil: Pnömani, konjunktivit, endokarditis, menenjit, meningoensafalit, santral sinir sistemi enfeksiyonu, septisemi

-Gebe: Grip benzeri semptomlar, ateş, baş ağrısı, miyalji, sırt ağrısı, erken doğum, düşük, amnionitis, ölü doğum, Erken yenidoğan enfeksiyonları: Sepsis, granulomatosis 1,5 gün, Geç yenidoğan enfeksiyonları: Menenjit-14,3 gün

-İnvasiv Olmayan; 18-20 saat inkübasyon süresi

Ateşli gastroenterititis, ateş, bitkinlik, sıkıntı, başağrısı, bulantı, kramp, kusma, ishal

Yapılan bir çalışmada bir kişinin, her yıl ortalama 3,8 kez gıda yoluyla 5,0 log birimlik ve 0,8 kez de < 6,0 log birimlik *L. monocytogenes* 'e maruz kaldığı ve bunun sonucunda her yıl 5-7 listeriozis vakası görüldüğü bildirilmiştir (Notermans *et al.* 1998).

Bakteriyemi ise grip benzeri bir hastalık şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde listeriozisin en sık (% 54) rastlanılan çeşididir. Daha çok gebeleri etkilemekte, ölü doğumlara ve düşüklerle neden olmaktadır. Ölü doğum oranı % 40'ı bulmaktadır. Eğer teşhis edilirse anneyi başarıyla tedavi etmek ve sağlıklı bir bebeğin doğmasını sağlamak mümkündür (Doğanay 2003, Lunden *et al.* 2004).

Listeriyal endokardit nadirdir ve genellikle bağışıklık sistemi sağlam kişilerde görülür. Enfekte yetişkinlerin % 8'inde rastlanılmaktadır. Diğer nedenlerle meydana gelen endokardite göre, listeriyal endokarditin ölüm oranı % 48 ile daha yüksektir. Bu yüksek oranın, *Listeria* için bakterisidal olan antibiyotiklerin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Doğanay 2003, <http://www.mikrobiyoloji.org> , 2004).

Gastroenteritis genellikle sağlıklı insanlarda görülmekte ishal, bulantı ve kusmayla kendini göstermektedir. Hastalar kontamine gıdayı tükettikten 24-48 saat sonra belirtiler görülmeye başlanmaktadır. Salgınlarda araç olarak pirinç salatası, karides, çikolatalı süt, mısır salatası gösterilmiştir (Doğanay 2003).

Önemli Listeriozis salgınları

ABD hastalık kontrol merkezi verilerine göre; her yıl gıda kaynaklı olmak üzere, 76 milyon kişi hastalanmakta, 325.000 kişi hastaneye yatmakta ve 5.000 kişi ölmektedir. *L. monocytogenes*, ABD'de her yıl yaklaşık 2500 kişinin hastalanmasına ve hastalanan 500 kişinin de ölümüne neden olmaktadır (CDC 2001, Ryan *et al.* 2002).

Avrupa'da ise her yıl 1600-8400 listeriozis vakası olmakta, 320-2500 ölüme neden olmaktadır. 1991-2001 yılları arasına Avrupa'da 2065 vaka bildirilmiştir (Lunden *et al.* 2004).

Avrupa'daki listeriozis salgınlarının yaklaşık yarısı süt ürünleriyle ilişkilidir. Özellikle çiğ süt ve çiğ süttten yapılan süt ürünleri önemli salgınlara neden olmuştur. 1983-1987 yılları arasında İsviçre'de pastörize edilmemiş yumuşak peynir, 1986'da Avusturya'da pastörize edilmemiş sütte ve 1995'te Fransa'da süttün pastörize edilmeden yapıldığı Brie tipi peynir salgınlara neden olmuştur. Avusturya'da 1986'da 39 vaka bildirilmiş, çiğ süt ve organik sebze enfeksiyon kaynağı olarak belirlenmiştir. Danimarka'da 1989-1990 yılları arasında 26 vaka ve kaynağının mavi küflü peynir olduğu bildirilmiştir. İsveç'te 2001'de 48 kişi çiğ süttten üretilen peynirden gastroenteritis olmuş ve epidemiyolojik araştırma sonucunda kontaminasyonun peynirin üretildiği yerden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Finlandiya'da 1998-1999 yılları arasında 33 vaka bildirilmiş ve kaynağının pastörize süttten üretilen tereyağı olduğu belirlenmiştir (Lunden *et al.* 2004).

1994-2003 yılları arasında Danimarka'da görülen 299 listeriozis vakası incelenmiş ve % 21 ölüm oranı olduğu, 10 yıllık dönemde ölüm oranlarının değişmediği bulunmuştur. 4 b serotipinin 1/2 serotipinden ölümlerden daha çok sorumlu olduğu belirlenmiştir (Gerner-Smidt *et al.* 2005).

Tarihte en büyük et imhası Ekim 2002'de olmuştur. ABD'nin bir çok eyaletinde görülen listeriozis salgınından sonra 12.400 ton taze ve dondurulmuş, tüketime hazır hindi ve tavuk ürünleri imha edilmiştir. Bu salgında 8 eyalette toplam 53 vaka bildirilmiştir. Bunlardan tümünün bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler olduğu ve salgında 8 kişinin öldüğü, 3 ölü doğum veya düşük olduğu bildirilmiştir. 2002 yılında ABD'de toplam 665 vaka, 2001 yılında ise 613 vaka bildirilmiştir (CDC 2002, CDC 2006).

ABD'de 2000 yılında Mayıs'tan Kasım'a kadar 10 eyaletten 29 listeriozis vakası bildirilmiş, salgının kaynağı hindi eti olarak belirlenmiş ve 4 ölüm, 3 ölü doğum veya düşük ile sonuçlandırıldığı bildirilmiştir (CDC 2001). Kasım 2000'de Kuzey Carolina'da ev yapımı Meksika tipi yumuşak peynirlerin tüketilmesi sonucunda 12 listeriozis vakası

bildirilmiştir. Bu vakaların 10'u gebelerde görülmüş olup 5 ölü doğum, 3 erken doğum ve 2 yeni doğan bebeğin enfekte olduğu görülmüştür (CDC 2000).

1998'in sonlarında 50'den fazla hastalık *L. monocytogenes* ile ilişkilendirilmiş ve hastalığın kaynağının frankfurter tipi sosis ve et ürünleri olduğu belirlenmiştir. Salgında 6 kişi ölmüş, iki düşük vakası görülmüştür. Salgından 10 eyalet etkilenmiştir (CDC 1998).

ABD ve Kanada'da 1979-1985 yılları arasında 4 listeriozis salgını görülmüştür. Tarihte görülen önemli *L. monocytogenes* salgınları Çizelge 2.4'te verilmiştir. Yapılan araştırmalar 4 olayda da mikroorganizmanın gıdalara hayvanlar aracılığıyla geçtiğini göstermiştir. İlk salgın, Eylül-Ekim 1979'da Boston bölgesinde görülmüş, çiğ sebze, kereviz, marul salatası, domates ve çiğ sütün *L. monocytogenes* 'i taşıdığı belirlenmiştir.

2. olay Kanada'da Mart-Eylül 1981 döneminde ortaya çıkmış ve salgının lahanalarından (coleslaw) kaynaklandığı belirlenmiştir. Lahana salatasından *L. monocytogenes* 4b serotipi izole edilmiştir. Burada bulaşma, lahanaların yetiştirilmesi sırasında, listeriozisten ölen koyunların dışkısının gübre olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Hasat edilen lahanalar kış boyunca soğukta (5 °C'de) depolanmış ve salata hazırlayan işletmeye verilmiştir.

3. salgın Haziran-Ağustos 1983'de Massachusetts'te ortaya çıkmış ve 49 kişi hastalanmıştır. Hastanelere başvuran bu kişilere menenjit ve septisemi teşhisi konmuştur. Bunlardan 42'sini bağışıklık sistemi zayıf yetişkinler, 7'sini yeni doğmuş bebekler oluşturmuştur. Hastaların 14'ü ölmüştür. Kaynağı pastörize süt olarak belirlenmiş ancak yapılan incelemelerde pastörizasyonun hatalı yapıldığına dair bir kanıt bulunamamıştır. Hastalığın çıkışından sonra çiftliklerden alınan 124 çiğ süt örneğinin 15'inden *L. monocytogenes* 'in değişik serotiplerinin izole edildiği bildirilmiştir. Bu bulgular kontamine inek sütünde bu bakteriyi öldürmek için uygulanacak etkili pastörizasyon sıcaklık ve süresinin belirlenmesi konusunu ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 2.4 Tarihte görülen önemli *Listeria monocytogenes* salgınları (Farber and Peterkin 1991, Mc Lauchlin *et al.* 2004, Griffiths 2004, Koçan ve Halkman 2006)

Yıl	Yer	Vaka sayısı	Ölüm (%)	Kaynak
1966	Almanya	279	39	Süt ürünleri
1976	ABD	20	25	Çiğ salata
1980	Yeni Zelanda	22	32	Midye veya çiğ balık
1980-81	ABD	41	34	Lahana salatası (coleslaw)
1983	ABD	49	29	Pastörize süt
1983-87	İsviçre	122	28	Yumuşak peynir
1985	ABD	142	34	Meksika tipi peynir
1986-87	ABD	36	44	Bilinmiyor
1987-89	İngiltere	355	26	Çiğer ezmesi
1989	Connecticut	10	10	Karides
1990	Avustralya	9	0	Çiğer ezmesi
1992	Fransa	279	32	Domuz eti
1992	Yeni Zelanda	4	25	Tütsülenmiş midye
1993	Fransa	279	0	Jöleli domuz dili
1993	Fransa	38	26	Domuz ezmesi
1994	ABD	45	0	Çikolatalı süt
1994-95	İsveç	9	22	Soğuk tütsülenmiş alabalık
1995	Fransa	17	24	Yumuşak peynir
1996	Kanada	2	0	Yengeç eti
1997	İtalya	1566	0	Mısır salatası
1998-99	ABD	101	21	Sosisli sandviç, şarküteri et
1998-99	Finlandiya	25	24	Tereyağı
1999	Fransa	32	31	Jöleli domuz dili
1999	Fransa	10	20	Domuz ezmesi
2000	ABD	29	24	Hindi eti
2000	ABD	12	42	Meksika tipi peynir
2002	ABD	53	21	Tavuk ve hindi eti

Diğer önemli listeriozis salgını Los Angeles, California'da 1985 Ocak-Ağustos aylarında görülmüştür. Kaynağı belirli bir firmaya ait Meksika tipi taze, yumuşak bir peynirin tüketilmesiyle ortaya çıkmıştır. pH'sı 6,6 olan peynirden *L. monocytogenes* 4b serotipi izole edilmiştir. Salgında 142 kişi hastalanmış, bu vakaların 93'ü perinatal (gebeliğin 20. haftasından itibaren doğuma kadar geçen sürede fetüse verilen ad), 49'u ise yetişkinlerde görülmüştür. Bu salgında 48 ölüm olmuş, bunlardan 30'unun fetüs ve neonatal (yenidoğan - doğumdan 20. güne kadar olan dönem) olduğu belirlenmiştir.

Yapılan incelemelerde peynir üretiminde % 10 kadar çiğ süt kullanıldığı ve işletmede çok sayıda *L. monocytogenes* bulunduğu ortaya çıkmıştır. Görülen bütün listeriozis salgınlarındaki ortak nokta *L. monocytogenes* 'in hayvanların yetiştirildiği çiftlikten kaynaklanmış olmasıdır (CDC 1985, Doyle 1988, Tunçel ve Gökten 1989, Griffiths 2004).

2000 yılında Mayıs ve kasım ayları arasında ABD'de 10 eyalette işlenmiş et ürünlerinde 29 listeriozis vakası görülmüştür. 2003 yılında ABD'de 46 eyalette toplam 696 listeriozis vakası bildirilmiştir. Columbia bölgesinde görülen vakaların % 57'sini 60 yaş üstü insanlar oluşturmaktadır. 2004 yılında ABD'de toplam 753 vaka bildirilirken bu rakam 2005 yılında 842'ye yükselmiştir (Griffiths 2004, CDC 2005, CDC 2006).

Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes* izolasyon oranının en yüksek kış aylarında (% 14,3) olduğu, bunu ilkbahar (% 10,4) ve sonbaharın (% 5,3) takip ettiği ancak en düşük oranın ise yaz aylarında (% 0,9) olduğu belirtilmiştir (Eleinin *et al.* 2000).

Listeriozisin tedavisinde genellikle yüksek dozda amoksisilin verilir. Bunun amfisilinden daha iyi olduğu bildirilmiştir. Başarılı bir tedavi için amoksisilinin gentamisinle birlikte kullanılmasının hatta bazı durumlarda buna rifampisin de eklenmesinin yararlı olacağı ve tedavinin bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde 14 günden daha uzun tutulmasının antibiyotiğin bakterisidal aktivitesi için önemli olduğu bildirilmiştir (Hof 2003).

2.7. Çeşitli Antibiyotik ve İnhibitör Maddelere Karşı Dirençlilik

Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çok değişik şekilde duyarlılık gösterirler. Bu durum antibiyotiklerin yapısına ve mikroorganizma türüne göre değişmektedir. Aynı cinste yer alan mikroorganizmaların selektif ön zenginleştirme besiyerlerinde kullanılan inhibitörlerden eşit derecede etkilenmediği bilinmektedir (Beumer *et al.* 1996). Stres altındaki bakteri membranlarına zarar verdiği için pek çok selektif bileşiğe karşı daha duyarlı olur ve selektif besiyerinde gelişme kabiliyetini kaybedebilir (Besse 2002).

Pek çok besiyeri sıcaklıkla hasar görmüş hücrelerin geri alımında güvenli olmayan bileşikler içermektedir. Karşılaştırmalı bir çalışmada besiyerinin içerdiği feniletanol, akriflavin, potasyum tellurit, Polimiksin B sülfat veya % 5 NaCl'ün bu hücrelerin geri alımına zarar verdiği bulunmuştur (Doyle *et al.* 2001).

Antibiyotikler, genellikle mikroorganizmaların üzerinde hücre duvarı, sitoplazmik membran, protein veya nükleik asit sentezlerine engel olarak veya bozarak etki etmektedirler. Bazı mikroorganizmalarda bulunan R-plasmitlerinin kodladıkları β -laktamaz enzimi β -laktam grubu antibiyotiklerin yapısında bulunan C-N bağıını hidrolize ederek antibiyotikleri inaktive ederler (Arda 2000).

Antibiyotik dirençli *L. monocytogenes* ilk kez 1988'de tanımlanmış ve aynı yıl gıdadan ve listeriozis vakalarından pek çok dirençli suş belirlenmiştir (Teuber 1999). Klinik kaynaklı *Listeria* izolatları gıda ve çevre kaynaklı izolatlar kadar Gram pozitif bakterilere karşı etkili olan antibiyotiklere duyarlıdır (White *et al.* 2002).

Antibiyotik içeren zenginleştirme besiyerleriyle izolasyon daha kolay olmaktadır. Ancak serotipler arasındaki genotipik ve fenotipik farklılıklar olduğu belirlenmiş ve bu farklılıkların; zenginleştirme yöntemi, çevresel stres koşulları, antibiyotikli ortamda gelişebilme ve gıda doğal florasındaki refakatçi mikroorganizma varlığına kadar uzanabileceği düşünülmektedir (Gorski *et al.* 2006).

Nisin dirençli *L. monocytogenes* suşlarının antibiyotiklere karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur. İçinde polimiksin B'nin de bulunduğu, membrana zarar veren birkaç antibiyotik için MİK değerlerinde çok az bir artış gözlenmiştir (Martinez and Rodriguez 2005).

Lantibiyotikler büyük ölçüde Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyel peptidlerdir. *L. monocytogenes* in vitro koşullarda lantibiyotiklere karşı duyarlıdır ancak ökaryotik hücrenin içinde oldukları zaman etkilenmezler (Hoffman *et al.* 2001).

2.7.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK veya MIC)

Antibakteriyel maddelerin in vitro etkinliğini belirlemede başlıca iki kriter esas alınmaktadır. Bunlar Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK veya MIC) ve diğeri de Minimum Letal Konsantrasyon'dur (MLK veya MLC).

MİK; antibakteriyel maddenin patojenin gelişmesine engel olan en düşük yoğunluğudur. MİK değeri, antimikrobiyel maddenin statik etkisini gösterir.

MLK; antibakteriyel maddenin patojeni öldüren en düşük yoğunluğudur. MLK değeri, antibakteriyel maddenin sidal etkisini gösterir. MLK değeri genellikle MİK değerinden 2-4 kat fazladır (Arda 2000).

Mikroorganizmalar, antibiyotiklere karşı çok değişik şekilde duyarlılık gösterirler. Bu durum, hem antibiyotiklerin yapısına ve hem de mikroorganizmaların türüne göre değişebilir. Bu nedenle kullanılacak olan antibiyotiğin statik ve/ veya sidal etkisinin çok iyi belirlenmesi gereklidir. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılığının saptanmasında yaygın olarak kullanılan, Tüp dilüsyon tekniği ve disk difüzyon tekniği olmak üzere başlıca 2 yöntem vardır.

Tüp dilüsyon tekniği antimikrobiyel maddelerin MİK ve MLK değerlerini belirlemede kullanılmaktadır. Bu amaçla Mueller-Hinton Broth besiyerinde antimikrobiyel maddenin 2 veya 10 katlı dilüsyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta antibiyotik içeren dilüsyonlar elde edilir. Üzerlerine 24-48 saatlik aktif kültürden 0,1 mL aktarılır ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilir. Tüplerdeki gelişme gözle değerlendirilir. Böylece gelişmenin olmadığı son dilüsyon MİK değeri olarak kabul edilir. Test iki paralelli yapılmalıdır. Gelişmenin olmadığı bu son dilüsyondan alınan 0,1 mL miktarındaki inokulum 10 mL sıvı besiyerine ekilerek inkübe edilir. Tüpte gelişmenin olmaması MLK değerini, eğer tüpte gelişme varsa MİK değerini yansıtır.

Disk difüzyon tekniği, Kirby-Bauer yöntemi olarak da bilinen bu teknikte, test mikroorganizmanın 6-8 saatlik kültüründen (hafif bulanık) Mueller- Hinton agar

besiyerine 0,1-0,2 mL miktarında ekilir ve yüzeye iyice yayılır (steril swab bu amaçla kullanılabilir). Agarın yüzeyi oda sıcaklığında 5-10 dakika kuruduktan sonra yüzeye çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler yerleştirilir ve 24-48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülür ve Standard zon tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı/orta duyarlı/duyarsız olarak değerlendirme yapılır. Belirlenen zon çapına göre MİK değerini de bulmak mümkündür (Andrews 2002, Lalitha 2004). Bu yöntemde en önemli nokta, ilk 24 saat içinde inhibisyon zonu içinde hiçbir koloni görülmezken, inhibisyon 48 saate çıkarıldığında, bu zon içinde koloniler oluşmaya başlar. Bu durumda MİK ve MLK değerlerini kesin belirlemede acele edilmemesi gerekmektedir (Arda 2000). Disk difüzyon tekniği az masraflı, az zahmetli ve kolay uygulanır olması sebebiyle tercih edilmektedir. Ayrıca, bu teknikle bir petri kutusunda 5-6 antibiyotiğe karşı duyarlılığı belirlemek ve en etkili olan maddeyi saptamak mümkündür (Arda 2000).

2.7.2 *L. monocytogenes* 'in duyarlı olduğu antibiyotikler

Pek çok çalışmada *L. monocytogenes* 'in farklı suşlarının penisilin G, amfisilin, TMP/SMZ, gentamisin, streptomisin, eritromisin, vankomisin, amikasin, siprofloksasin, tetrasiklin, imipenem, rifampisin, kloramfenikol ve kotrimoksazole karşı duyarlı olduğu bulunmuştur (Marco *et al.* 2000, Troxler *et al.* 2000, Safdar and Armstrong 2003, Mayrhofer *et al.* 2004, Hansen *et al.* 2005). Türkiye'de yapılan bir çalışmada izolatların kanamisin, kloramfenikol ve tetrasikline karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir (Yücel vd.). Ayrıca başka bir çalışmada ofloksasin + rifampisin, klaritromisin + imipenem kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiği ve gentamisinin 4 saatte, imipenem ve klaritromisinin ise 24 saatte bakterisit etki gösterdiği bulunmuştur (Arslan 1997).

L. monocytogenes 'in in vitro koşullarda duyarlı olduğu antibiyotikler şu şekilde belirtilmiştir: Tetrasiklinler, aminoglikozitler (gentamisin, tobramisin, streptomisin, kanamisin, amikasin), penisilinler (oksasilin hariç), birinci ve ikinci generasyon sefalosporinler (sefklor, sefazolin, lokarbef), sefotiam, sefoperazon, karbenedemler, makrolidler, linkosamidler, glikopeptitler, dalfopristin/ kuinupiristin, kloramfenikol,

amfisilin, eritromisin, rifamisin, trimetoprim/ sulfametoksazole (TMP/SMZ), karbapenemler, vankomisin (Hof *et al.* 1997, Arda vd. 1999, Arslan 1997, Troxler *et al.* 2000)

Bu antibiyotiklerden sadece aminoglikozitler ve TMP/SMZ bakterisidal etkilidir. Diğerleri bakteriostatik etkilidir. Penisilin ve tetrasikline karşı direnç yaygındır. *L. monocytogenes* amfisilin ve gentamisine karşı direnç geliştirebilmektedir (Gandhi and Chikindas 2007).

Amoksisilinin gentamisine birlikte kullanımının en hızlı bakterisidal etki gösterdiği, trimetoprim- sulfametoksazolün ise 6 saatte daha az bakterisidal etkili olduğu bulunmuştur. Amoksisilinin rifampin ile kombinasyonu zayıf bir antagonistik etki (yaklaşık 1 log fark) göstermiştir (Boisivon *et al.* 1990).

1958-1982 yılları arasında İsveç'ten, 1958'den 2001'e kadar Danimarka'dan ve 1955-1997 New York'tan ve 1994-1998 yılları arasında Barselona'dan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının antimikrobiyel duyarlılıklarında önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Larsson *et al.* 1985, Hansen *et al.* 2005, Safdar and Armstrong 2003, Marco *et al.* 2000).

2.7.3 *L. monocytogenes* 'in dirençli olduğu antibiyotikler

Yapılan çalışmalarda izolatların streptomisin, tetrasiklin, siprofloksasin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu bulunmuştur (Marco *et al.* 2000, Yde and Genicot 2001). *L. monocytogenes* izolatlarının büyük çoğunluğunun (% 73) sülfonamide karşı dirençli olduğu, bazılarının tetrasikline (% 8,4), siprofloksasine (% 1,8) dirençli olduğu bulunmuştur (Zhang *et al.* 2007). Tüm dünyadan toplanmış 1100 *Listeria* spp.'den (60 klinik ve 1040 gıda ve çevre örneği) 61 *Listeria* spp.'nin (37 *L. monocytogenes*) tetrasikline dirençli olduğu bulunmuştur (White *et al.* 2002). Türkiye'de yapılan bir çalışmada izolatların hepsi sefalotin ve nalidiksik aside karşı dirençli oldukları belirlenmiştir (Yücel vd. 2005). 73 *Listeria* (*L. innocua*-32, *L.*

seeligeri-13, *L. monocytogenes*-28) türüne 9 antibiyotiğin aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada *L. innocua* tetrasikline dirençliyken *L. seeligeri* ve *L. monocytogenes* duyarlı bulunmuştur. Sulfametoksisazolün *Listeria* türlerine karşı aktivitesinin zayıf olduğu bulunmuştur (Abuin *et al.* 1994).

Danimarka'da yürütülen çalışmada daha önce başka yerde rastlanmayan insan enfeksiyonlarına neden olan çoklu dirence sahip suşların olduğu belirlenmiştir (Hansen *et al.* 2005). Yunanistan'da doğumdan 21 gün sonra gelişen bir menenjit vakasından izole edilen çoklu dirençli (multiresistant) *L. monocytogenes* suşu gentamisine (MIC >8 µg/mL), streptomisine (MIC >1000 µg/mL), kloramfenikole (MIC >16 µg/mL), klindamisine (MIC >2 µg/mL) dirençli olduğu bulunmuştur (Charpentier and Courvalin 1999).

L. monocytogenes 'in *in vitro* koşullarda dirençli veya orta dirençli olduğu antibiyotikler şu şekilde belirtilmiştir: Modern sefalosporinler (sefamet, sefiksim, seftibuten, seftazidim, sefdinir, sefpodoksim, sefotaksim, seftriakson, sefuroksim), sülfonamid, aztreonam, pipedimik asit, basitrasin, kolistin sülfat, nalidiksik asit, polimiksin b, fosfomisin, sülfametoksisazol, dalfopristin/ kuinupristin (Hof *et al.* 1997, Troxler *et al.* 2000)

1001 izolatın antimikrobiyel özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada *L. monocytogenes* 'in % 0,6'sı ve *L. innocua* 'nın % 19,5'i denenen antibiyotiklere karşı dirençli bulunurken *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* 'nin hiçbir antibiyotiğe karşı dirençli olmadığı belirlenmiştir (Walsh *et al.* 2001). Ayrıca denenen antibiyotiklerin büyük çoğunluğunda *L. monocytogenes* 'in diğer *Listeria* türlerinden daha duyarlı olduğu bulunmuştur (MacGowan *et al.* 1990).

Listeria türleri modern sefalosporinlere (sefamet, sefiksim, seftibuten, seftazidim, sefdinir, sefpodoksim, sefotaksim, seftriakson, sefuroksim), aztronam, pipedimik asit, dalfopristin, kuinupristin ve sülfamethoksazole doğal olarak dirençli veya orta dirençlidir. *Listeria* türlerinin doğal duyarlılıkları arasındaki önemli farklılıklar

kinolonlar, trimethoprim, ko-trimoksazol, rifampisin, fosfomisin ve fusidik asitte görülmüştür (Larsson *et al.* 1985, Troxler *et al.* 2000).

L. monocytogenes 'in seftazidim ve moksalaktam için MİK₉₀ değeri >128 µg/mL olarak bulunmuştur (Larsson *et al.* 1985). *Listeria* türleri içinde *L. innocua* basitrasın, sefotaksim, oksasilin ve fosfomisine karşı en dirençli türdür. *L. monocytogenes* fosfomisine doğal dirençlidir. *L. ivanovii* kinolonların çoğuna doğal olarak dirençli, fosfomisine ve fusidik aside ise en duyarlı olan türdür. Fosfomisin için *L. ivanovii* 'nin MİK₉₀ değeri 128 mg/L iken diğer *Listeria* türleri için aynı değer 1024 mg/L ve *L. monocytogenes* için ise 2048 mg/L'dir (MacGowan *et al.* 1990, Troxler *et al.* 2000, Li *et al.* 2006). *L. grayi* doğal olarak bütün antifolatlarla, trimethoprim, ko-trimoksazole karşı dirençli iken kinolonlara karşı duyarlıdır. *L. ivanovii* ve *L. monocytogenes* hariç diğer *Listeria* türlerinin antimikrobiyel duyarlılıklarıyla ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Rifampisine karşı bütün türlerin doğal duyarlılıkları vardır. Ancak *L. grayi* 'nin duyarlılığı net bir şekilde belirlenememiştir. *L. innocua* antibiyotiklere karşı diğer *Listeria* türlerinden daha dirençlidir. *Listeria* türlerine karşı rifampisin MIC₉₀ değeri 0,38 µg/mL ile en aktif antimikrobiyel maddedir. (Troxler *et al.* 2000, Li *et al.* 2006).

Trimethoprim- direnç gösteren suşda dfrD geni, 3,7-kb plasmitte (pIP823) bulunur ve bu plasmit, dairesel replikasyon yapan plasmit ailesine ait ve özellikle de *Staphylococcus* orijinlidir. *L. monocytogenes* 'deki dfrD geni *Staphylococcus* orijinlidir. pIP823 *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *E. coli* 'yi içeren geniş bir konakçı aralığında bulunmaktadır. *L. monocytogenes* 'te trimethoprim direnci özellikle önemlidir, çünkü trimethoprim-sülfametoksisazol kombinasyonu insan listeriozislerinde başarılı bir alternatif tedavi yöntemidir (White *et al.* 2002).

2.7.4. Besiyeri bileşiminde kullanılan bazı inhibitör maddelerin etkisi

Nalidiksik Asit

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan 1,8- naphtyridine 3- karboksilik asit yapısında sentetik bir preparattır. Kinolon grubundan bir antibiyotiktir. Nalidiksik asit, hücrelerin DNA sentezini önlemektedir (DNA giraz inhibitörü). Özellikle Gram negatif çubuk bakterilere karşı etkilidir. İlk kez Beerens ve Tahon-Castel tarafından 1966'da kullanılmıştır. Geliştirilen ilk ön zenginleştirme besiyerinde akriflavin ve siklohegzimid ile birlikte kullanılmıştır. Selektif zenginleştirme besiyerinde *Listeria* gelişimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir (Pearson and Marth 1990, Beumer *et al.* 1996, Ertan 2000, Arda 2000, Beumer and Hazeleger 2003).

Nalidiksik asit, konsantrasyonu 40 mg/L'ye çıkarıldığında, özellikle ısı ile işleme hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde olumsuz bir etki göstermemektedir (Asperger *et al.* 1999). Ancak konsantrasyon 100 mg/mL'ye çıkarıldığı zaman tüm *Listeria* türlerinin gelişim oranı azalmıştır. Nalidiksik asit, selektif zenginleştirme ve izolasyon besiyerlerinde 10-40 mg/L oranında kullanılmaktadır. Nalidiksik asidin bu oranda kullanılması, *L. monocytogenes* 'in gelişimi üzerine önemli bir etkisi yoktur. Bu bileşiğin inhibitör aktivitesi stabildir (Beumer *et al.* 1996).

LiCl

Etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır ama hücrenin işleyişinde AMP üretiminde etkili olduğu düşünülmektedir (Davis 2006). Stres altındaki *Listeria* 'nın geri kazanılmasında, refakatçi floranın özellikle de enterokokların inhibisyonunda etkili olmaktadır (Asperger *et al.* 1999).

LiCl'ün MİK değeri normal *L. monocytogenes* hücreleri için 40 g/L iken sıcaklıkla hasar görmüş hücreler için 15 g/L ve normal *E. faecium* için 10 g/L'dir. Aerobik şartlarda Fraser Broth'ta 35 °C'de normal *L. monocytogenes* hücreleri için LiCl'ün MİK değeri 12

g/L iken *E. faecium* için 7 g/L'dir. Refakatçi floranın inhibisyonu ve ısı ileme hasar görmüş *L. monocytogenes* hücrelerinin geri alımı için LiCl'ün en uygun kullanım oranının 7 g/L olması önerilmiştir. Besiyerlerinde 0,5-15 g/L oranında kullanılmaktadır. Bu oranlarda LiCl'ün *L. monocytogenes* üzerine herhangi bir inhibisyon etkisi yoktur. Besiyerindeki konsantrasyonu 8-10 g/L olduğunda etkisi tamamen bakteriyostatiktir (Mendonca and Knabel 1994).

LiCl, *Enterococcus* spp. gelişimini inhibe ederek sahte pozitif sonuçları azaltmaktadır. Ayrıca inkübasyon sıcaklığı ve süresi de *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* tarafından siyah renk oluşumunu etkilemektedir. LiCl konsantrasyonu 3 g/L olduğunda az sayıda bulunan *L. monocytogenes* 'in (10^3 /mL) renk dönüşümü gerçekleşirken daha yüksek sayıda olan *E. faecalis* 'in (10^6 /mL) renk dönüşümü LiCl tarafından engellenmektedir. Siyah renk oluşumu 37 °C'de 30 °C'den daha iyi olmakta ve 24 saat inkübasyon sonunda gözlenebilmektedir (Fraser and Sperber 1988).

Akriflavin

Akriflavin, mitokondriyal RNA sentezini engellemektedir. Bu inhibisyon etkiyi, DNA çift sarmalının içine girerek yapmaktadır. Akriflavinin düşük konsantrasyonları bile mitokondriyal protein sentezini önlemektedir. Akriflavinin sinonimi tripaflavin ve nötraflavindir. *Listeria* spp.'nin izolasyonu için akriflavini besiyerinde ilk kez Ralovich *et al.* 1971'de kullanmıştır. Ralovich 40 mg/L akriflavin varlığında Gram pozitif kokların gelişiminin baskılandığı, *L. monocytogenes* 'in ise iyi geliştiği sonucuna varmıştır. Aynı yıl Bockemühl *et al.* 12 akridin boyayı, selektif katkı olarak besiyerine eklemiş ve sonuçlarını yayınlamışlardır. Bunlardan üçünün (ksantakridin, nötral akriflavin ve proflavinhemisülfat), Enterokoklar üzerine çok kuvvetli bir inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir. Nötral akriflavin 2,8- diamino-10-metil akridinyum klorür olarak gösterilir ama günümüzde 3,6- diamino-10- metil akriladin hidroklorür ve 3,6- diamino akridinin bir karışımı olarak kullanılmaktadır. Bu madde akriflavin HCl veya akriflavin olarak bilinmektedir (De Vries and Kron 1970, Beumer *et al.* 1996, Beumer and Hazeleger 2003).

Özellikle Gram pozitif kokların gelişimini baskılamaktadır. Akriflavin derişiminin artışı *L. monocytogenes* 'in hem lag hem de generasyon zamanını etkiler. Oysa *L. innocua* 'ya hemen hemen hiçbir etkisi yoktur. Bu yüzden akriflavin konsantrasyonu besiyerinde adım adım arttırılmalıdır. Yapılan çalışmada 15 mg/L akriflavin kullanımının bazı *L. monocytogenes* suşlarını inhibe ederken *L. innocua*'yı hiç etkilemediği bulunmuştur. Kromojenik besiyerlerinde akriflavin koloni rengini etkilediği için kullanımı tavsiye edilmemektedir (Beumer *et al.* 1996, Asperger *et al.* 1999, Beumer and Hazeleger 2003).

Gıda ürünlerinin ön zenginleştirme besiyerine eklenmesinden sonra gıda bileşenleri ile akriflavinin karşılıklı etkileştiği ve inhibitör kapasitesi azaldığı için *L. monocytogenes* 'in gelişiminin arttığı bildirilmiştir. Akriflavin, örneklerdeki proteine bağlanmakta ve aktivitesinde düşme olmaktadır. Yapılan çalışmalarda gıda çeşidine ve akriflavin konsantrasyonuna bağlı olarak bu inhibitörün % 19-79 oranında proteine bağlandığı gözlenmiştir. 30 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası bu değerler % 43-100 oranında artmıştır (Beumer *et al.* 1996).

Beyaz lahana süspansiyonunda (düşük protein içeriği) akriflavin bağlanma oranının düşük değerlerde olmasına karşın 48 saat sonra akriflavin bağlanma oranı dikkat çekici bir şekilde, % 100'e varan oranlarda artmıştır. Bu süspansiyonun aynı zamanda pH'da da en büyük düşüşü göstermesi, akriflavinin proteine bağlanmasında pH'ya bağlı olduğunun göstergesi olmuştur. Düşük pH (<5,8) değerlerinde daha yüksek oranda akriflavin bağlanır ama bu patojenin gelişimi, düşük pH'da engellendiği için bunun gelişim üzerine olumlu bir etkisi olmamaktadır. Bağlanma denemelerinde, akriflavinin proteinlere bağlanması sonucunda pH'ya bağlı olarak başlangıç konsantrasyonunun yaklaşık % 60 veya daha düşük oranda azaldığı bulunmuştur (Beumer *et al.* 1996).

Besiyerindeki akriflavin konsantrasyonu 10-25 mg/L arasında değişmektedir. Bu oran 40 mg/L'ye çıkarıldığı zaman *L. monocytogenes* 'in iyi çoğaldığı ve Gram pozitif kokların gelişiminin baskılandığı görülmüştür (Beumer and Hazeleger 2003).

L. monocytogenes 'in farklı zenginleştirme besiyerlerinde, refakatçi flora ve peynir matriksi varlığında ve yokluğunda gelişiminin nasıl etkilendiğini araştıran bir çalışmada saf kültür ile çalışılmış olmasına rağmen UVM II (University of Vermont Broth) ve Hi II (Hitchins Broth) içerdiği yüksek orandaki akriflavin yüzünden *Listeria* gelişmesinin önemli oranda geciktiği bulunmuştur (Heisick *et al.* 1989b).

Beumer *et al.* (1988) tarafından akriflavinin bazı *L. monocytogenes* suşları için inhibitör etkili olduğu belirlenmiştir. Jung (1987) peynirdeki kazein ile akriflavin interaksyonu sonucu inhibitör etkinin azaldığı ve refakatçi mikroorganizma gelişimine uygun bir ortam sağlandığını belirtmiştir (Cox *et al.* 1991).

L. monocytogenes 'in izolasyonu için ön zenginleştirme işleminde düşük derişimde akriflavin kullanılması ile birlikte izolasyonun uygun bir tampon ile desteklenmesi gerekmektedir. Ön zenginleştirme besiyerlerinde 12-15 mg/L ve selektif zenginleştirme besiyerlerinde ise 25 mg/L selektif katı besiyerinde ise 5 mg/L oranında kullanılır. (Beumer *et al.* 1996, Scotter *et al.* 2001).

Polimiksin B Sülfat

Bacillus polymyxa tarafından sentezlenmektedir. Polipeptit grubundan bir antibiyotiktir. Bu antibiyotiğin etki mekanizması, sitoplazmik membran sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Daha çok Gram negatif mikroorganizmalara etkilidir. Bütün Gram negatif basillere *Proteus* grup hariç bakterisidal etkilidir. Bütün Gram pozitif bakteriler, Gram negatif koklar ve maya-küfler bu antibiyotiğe karşı dirençlidir. Selektif katı besiyerlerinden PALCAM Agar ve *Listeria* Ottaviani and Agosti (ALOA) agarda sırasıyla 10 mg/L ve 77.600 U/L oranında kullanılmaktadır (Arda vd. 1999, Williams and Lemke 2002, ISO 2004, http://www.rxlist.com/cgi/generic3/polymyxin_cp.htm, 2005).

Seftazidim

Beta laktam türevi 3. kuşak sefalosporin grubundandır. Etki mekanizması hücre duvarı sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Daha çok Gram negatif mikroorganizmalar üzerine etkili olmakla birlikte Gram pozitiflere de etkilidir. *Listeria* türleri modern sefalosporinlere dirençli veya orta dirençlidir (Troxler *et al.* 2000, Ertan 2000). *L. monocytogenes* 'in seftazidim için MİK₉₀ değeri >128 µg/mL olarak bulunmuştur (Larsson *et al.* 1985).

Seftazidimin etkili olduğu Gram negatif bakteriler arasında; *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp. , *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter* spp. yer almaktadır.

Seftazidimin etkili olduğu Gram pozitif bakteriler ise; *Staphylococcus aureus*, (metisilin duyarlı suş), *Staphylococcus epidermidis* (metisilin duyarlı suş), *Micrococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* grup b, *Streptococcus pneumoniae*, bazı *Streptococcus* spp. ve anaerobik bakterilerden *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium* spp. bulunur.

Seftazidim, metisilin dirençli *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. ve *Clostridium difficile* 'ye karşı aktif değildir. Besiyerlerinde 20-50 mg/L oranında kullanılmaktadır (Atlas 1996).

Fosfomisin

Etki mekanizması hücre duvarı sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Besiyerinde bazı enterokok türlerini inhibe etmektedir. Ancak bazı *Enterococcus* türleri fosfomisine dirençli olabilmektedir. *L. monocytogenes* fosfomisine karşı doğal dirençliyken, *Listeria* türleri içinde *L.innocua* fosfomisine karşı en dirençli

türdür. *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* ve *L. ivanovii*'ye karşı farklı oranlarda inhibisyon etkisi vardır. *L. ivanovii* fosfomisine en duyarlı olan türdür. Fosfomisin için *L. ivanovii* 'nin MİK₉₀ değeri 128 mg/L iken diğer *Listeria* türleri için aynı değer 1024 mg/L ve *L. monocytogenes* için ise 2048 mg/L'dir (MacGowan *et al.* 1990, Troxler *et al.* 2000, Williams and Lemke 2002, Sherwood and Logue 2006). Bu nedenle fosfomisin kullanımı, *L. monocytogenes* analizinde diğer *Listeria* türlerinin inhibisyonu için önemli olmaktadır. Oxford Agar besiyerinde 10 mg/L MOX agar besiyerinde ise 15 mg/L arasında kullanılmaktadır (Van Netten *et al.* 1988a, Atlas 1996).

Moksalaktam (Sefoksitin)

Beta laktam türevidir. Hücre duvarı sentezine engel olmaktadır. Moksalaktamın *Staphylococcus*, *Proteus* ve *Pseudomonas* spp. gibi pek çok Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı geniş spektrumlu aktivitesi vardır. Enterokok gelişimini baskılamakta veya indirmektedir (Schell *et al.* 1983, Salzer *et al.* 1983). Besiyerlerinde enterokok gelişiminin kontrolüne yardımcı olmak için 20-60 mg/L oranında kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada 60 mg/L moksalaktamın 7 adet *L. monocytogenes* ve 3 adet *L. seeligeri* 'yi inhibe ettiği belirtilmiştir (Van Netten *et al.* 1988b). Başka bir çalışmada ise 175 adet klinik kaynaklı *L. monocytogenes* suşunun 128 mg/ L moksalaktama karşı dirençli olduğu bulunmuştur (Larsson *et al.* 1985, Lee and McClain 1986, Van Netten *et al.* 1988b, Pearson and Marth 1990).

Siklohegzimit ve Amfoterisin B

Siklohegzimit (Actidione), ökaryotik hücrelerde 80 S ribozomal RNA'ya bağlanmasıyla protein sentezini önlemektedir. Selektif ön zenginleştirme ortamında maya-küf inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Selektif zenginleştirme besiyerinde *Listeria* gelişimi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir (Beumer *et al.* 1996, Asperger *et al.* 1999, Beumer and Hazeleger 2003). Besiyerlerinde 50-400 mg/L oranında kullanılmaktadır. ISO metodunda yer alan Oxford agarda 400 mg/L kullanılmış ancak

modifiye Oxford agarda kullanılmamıştır. Ayrıca pimarisin (natamisin) siklohegzimitten daha az toksik olduğu için alternatif bir antifungal bileşik olarak pimarisin'in kullanılması tavsiye edilmiştir (Hitchins 2003).

Amfoterisin B, *Streptomyces* spp.'den elde edilmektedir ve maya-küf inhibe etmek için kullanılmaktadır. Etki mekanizması sitoplazmik membran sentezinin inhibisyonu şeklindedir (Arda 2000). Genellikle 2,0-2,5 mg/L oranında kullanılmaktadır ve herhangi bir toksik etkisi bilinmemektedir.

Diğer İnhibitör Maddelerin Etkisi

–Fusidik asit: Steroit grubu bir antibiyotiktir. Etki mekanizması protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Daha çok Gram pozitif bakterilere özellikle de *Staphylococcus aureus* 'a etkilidir. 4 mg/L oranında kullanıldığında *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* üzerine sınırlı bir inhibisyon etkisi vardır ancak 8 mg/L oranında kullanıldığında *L. monocytogenes* 'i de etkilemektedir. *L. ivanovii*, fusidik aside ise en duyarlı olan türdür (Troxler *et al.* 2000, Ertan 2000).

–Kolistin sülfat (Polimiksin E): *Bacillus polymyxa* var. *colistinus* 'tan elde edilen ve sitoplazmik membrana etki eden bir antibiyotiktir. Daha çok Gram negatif mikroorganizmalara etkilidir. Oxford ve MOX Agarda 10-20 mg/L oranında kullanılmaktadır (Atlas 1996, Arda vd 1999, Williams and Lemke 2002).

–Sefotetan: Beta laktam türevidir. Hücre duvarı sentezine engel olurlar. Daha çok Gram negatif olmak üzere Gram pozitif mikroorganizmalara etkilidir. Selektif ön zenginleştirme ve selektif besiyerlerinden sadece Oxford Agarda 2 g/L oranında kullanılmıştır (Arda vd. 1999).

–Rifampisin: Ansmasin grubundan bir antibiyotiktir. Etki mekanizması DNA sentezinin inhibisyonu (transkripsiyonu önlemekte, RNA polimeraza etkili) şeklindedir. Geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve bakterisidal etkisi vardır. Rifampisine karşı bütün

türlerin doğal duyarlılıkları vardır. Ancak *L. grayi* 'nin duyarlılığı net bir şekilde belirlenememiştir. 0,03 mg/L oranında rifampisin kullanımının *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *L. grayi* üzerinde herhangi bir etkisi belirlenememiş ancak *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. ivanovii* üzerinde farklı oranlarda inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür (Troxler *et al.* 2000, Ertan 2000).

–Fenil etil alkol: Besiyerinde bazı *Pseudomonas* türlerinin gelişimini baskılamaktadır. Ancak fenil etil alkolün *L. monocytogenes* 'e sınırlı inhibisyon etkisi olduğu bildirilmiştir (Van Netten *et al.* 1988b). RAPAMY, Mac Bride, Modifiye Mac Bride ve LPM agar besiyerlerinde 2,5 g/L oranında kullanılmıştır (Van Netten *et al.* 1988b, Atlas 1996).

–Glisin anhidrit: Modifiye Mac Bride ve LPM Agar besiyerinde 10 g/L oranında kullanılmıştır. Ancak yapılan bir çalışmada LPM Agardaki glisinin *L. monocytogenes* 'i inhibe ettiği bulunmuştur (Lee and McClain 1986, Atlas 1996).

1949 yılındaki ilk çalışmalarda potasyum tellurit % 0,05-0,1 konsantrasyonda *L. monocytogenes* 'in gelişimini etkilemeden Gram negatif bakterilerin gelişimini baskıladığı için besiyerine ilave edilmiştir. Sodyum azid ise % 0,3 gibi düşük konsantrasyonda bile patojeni tamamen inhibe ettiği için kullanılamamıştır. Daha sonraları potasyum tellurit zayıf bir selektif bileşik olduğu görülmüş ve diğer selektif maddelerin arayışına girilmiştir. Bu amaçla guanidin hidroklorür, aminoguanidin, borik asit ve sodyum tiyosülfat gibi inhibitörler denenmiştir. Glisin, fenil etanol ve LiCl ile çalışmalara devam edilmiş fenil etanol agarın Gram negatif bakterileri çok iyi inhibe ettiği bulunmuştur. Mac Bride *Listeria* Agarı modifiye etmek için çeşitli inhibitörler denenmiştir. Bu inhibitörler tiyogiserol, potasyum tiyosiyanat, akriflavin hidroklorür, pipedimik asit, oksolinik asit, nalidiksik asit, polimiksin B, talyum asetat, safra, sodyum seftirakson, moksalaktam, sodyum sefotaksim ve siprofloksasindir. Bunlar içinden talyum asetat, moksalaktam ve oksolinik asit seçilmiş ve MLA modifiye edilmiştir. FDA, MLA besiyerine maya-küf inhibitörü olarak siklohegzimit (200 mg/L) ilave etmiş ve koyun kanını bileşimden çıkarmıştır. USDA LPM'yi kullanmayı tercih etmiştir. LPM refakatçi florayı çok iyi derecede inhibe ederken bazı *L. monocytogenes* suşlarının da

gelişimini inhibe etmektedir. Gum bazlı nalidiksik asit (GBNA) besiyeri *Listeria* kolonilerinin eğik ışık altında karakteristik mavi renk almasıyla kolay belirlenmesini sağlamaktadır. Ağır kontamine gıdalardan patojenin izolasyonu için Seftazidim Agar geliştirilmiştir. Modifiye Vogel-Johnson Agarda ise nalidiksik asit, moksalaktam ve basitrasine birlikte diferansiyel özellik olarak tellurit kullanılmıştır. *L. monocytogenes* bu besiyerinde tellurit pozitif, mannitol negatif özelliği sayesinde hızlı bir şekilde fark edilmektedir. Başka araştırmacılar ise Fe⁺³ iyonunun diferansiyel özelliğini bulmuşlardır (Pearson and Marth 1990).

L. monocytogenes gıda endüstrisinde kullanılan dörtlü amonyum bileşiklerine duyarlı benzalkonyum klorür ve setrimide karşı yüksek MİK değerine sahiptir (Soumet *et al.* 2005, Gandhi and Chikindas 2007).

Reuterin, β-hidroksipropioaldehit antimikrobiyel bir moleküldür. Gram pozitif ve Gram negatif bakteri, maya-küf ve protozoaya etkilidir. *Lactobacillus reuteri* tarafından gliserol metabolizması sırasında üretilmektedir. Hücrede DNA sentezini engelleyerek etki etmektedir. Reuterinin *L. innocua* 'ya karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 10 AU/mL reuterin kullanımı hücre bölünme oranını % 98,5'ten % 4,5'e düşürmüştür (Rasch *et al.* 2007).

2.8. Gıdalarda *Listeria monocytogenes* 'in Belirleme Yöntemleri

2.8.1 Klasik kültürel yöntemlerle *Listeria monocytogenes* 'in belirlenmesi

Gıdalarda *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde sıfır-tolerans politikası geçerlidir (Lauer *et al.* 2005). Bu nedenle pek çok ülkenin gıda kanunları *L. monocytogenes* 'in 25 g gıdada hiç olmamasını öngörmektedir. Bazı Batı Avrupa ülkeleri ise, güvenli gıda için 0,01 g gıdada hiç *Listeria* olmamasını önermektedir (< 100 kob/g). Sonucun bu yöntemle bir iki günde alınabileceği ileri sürülmüştür. *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde temel olarak 3 aşama bulunmaktadır. Bunlar, ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerinden izolasyon aşamalarıdır. Bu işlem

basamaklarından ilk ikisinin birleştirildiği uygulamalara da rastlanılmaktadır. Üçüncü aşamadan sonra mutlaka doğrulama/identifikasyon testleri yapılmalıdır. Bu yöntemle negatif sonuç almak için 4-5 gün geçmesi gerekmektedir. Muhtemel pozitif sonuçlar ise 2-3 gün içinde alınmaktadır. Bu üç temel aşamanın başarısı şu unsurlara bağlıdır;

- Örnekteki mikroorganizma sayısı ve durumuna
- Besiyerinin selektivitesine; refakatçi flora ile hedef mikroorganizmanın inhibisyonu arasındaki dengeye
- İnkübasyon koşullarına; zaman, sıcaklık ve oksijen varlığı
- İzolasyon ortamının seçiciliğine, hedef mikroorganizma ve refakatçi mikroorganizma arasındaki ayrımın kolay olmasına (Beumer and Hazeleger 2003).

Büyük *Listeria* salgınlarından hemen sonra Amerika'da gıdayı takip eden iki devlet kuruluşu USDA (United States Department of Agriculture) ve FSIS (Food Safety and Inspection Service) kırmızı et, kanatlı eti ve yumurtadaki düzenlemelerden sorumlu tutulurken FDA (Food and Drug Administration) ve DHHS (Department of Health and Human Services) süt, süt ürünleri, sebzeler ve deniz ürünlerinin de içinde bulunduğu diğer gıdalardan sorumlu tutulmuş ve her kuruluş *Listeria* spp.'nin belirlenmesinde kendi metotlarını tavsiye etmişlerdir. Kuruluşların tecrübelerinden dolayı genel olarak geliştirdikleri yöntemler ilgili alanlarda kabul görmüştür (Beumer and Hazeleger 2003).

L. monocytogenes 'in belirlenmesi için geçerli olan referans metotlar çeşitli kuruluşlar tarafından önerilmiş (FDA, USDA, IDF, ISO) farklı selektif zenginleştirme sıvı besiyerleri ve farklı ön zenginleştirme işlemleri içermektedir. Aşağıda, ilgili bölümlerde Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO), Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF-FIL), ABD Gıda-İlaç Kuruluşu (FDA) ve ABD Tarım Kuruluşu (USDA) tarafından *L. monocytogenes* aranması için gösterilen yöntemler kısaca verilmiştir. Her 3 yöntemin de son aşaması selektif katı besiyerlerinden izole edilen 5 tipik *Listeria* kolonisinin biyokimyasal, fizyolojik ve serolojik olarak *Listeria* 'nın doğrulanmasıdır. Bu testlerin yapılması için şüpheli koloniler önce Tryptone Soya Yeast Extract agar (TSYEA) besiyerinde ara kültüre alınır. Daha sonra kültürler, gerekirse biyokimyasal ve/ veya serolojik olarak doğrulanır (Farber 1993, Asperger *et al.* 1999, Hitchins 2003, www.mikrobiyoloji.org, 2004).

Son 30 yıldır *L. monocytogenes* 'in belirlenmesi amacıyla pek çok sayıda zenginleştirme ve izolasyon besiyeri geliştirilmiş ve bunların karşılaştırılmaları üzerine çok yoğun araştırmalar yapılmıştır. Günümüzde bu konu üzerinde hâlâ çalışılmakta olup, analiz süresinin kısaltılması ve sistemin hassasiyetinin artırılmasına dair çalışmalar devam etmektedir.

2.8.2 Ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme besiyerleri

Listeria spp.'nin belirlenmesi için ilk izolasyon yöntemleri basit bir katı besiyerinde direkt kültür yöntemine dayanıyordu ama patojenik *L. monocytogenes* 'in izolasyonu zordu. Az sayıda canlı *Listeria* hücresi olması halinde izolasyon başarısı düşmekte ve embriyo halindeki yumurtanın da dahil olduğu test hayvanlarına aşılama yapılması tavsiye ediliyordu. Bu biyolojik metot refakatçi mikroorganizmaların olmadığı örneklerde az sayıdaki *Listeria* 'nın belirlenmesi için kullanılabileceği bildirilmiştir. Ama kontaminantların olması halinde test hayvanlarının görünüşte Gram negatif karışık floranın neden olduğu septisemiden öldüğü görülmüştür ((Schönberg 1989, Beumer and Hazeleger 2003).

Daha sonraları uygulanan soğuk zenginleştirme işleminde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. *Listeria* 'nın düşük sıcaklıkta canlılığını sürdürmesi (beyin dokusunda) konusundaki ilk raporlardan biri Briester and Schwarte tarafından 1939 yılında yayınlanmıştır. Yaklaşık 10 yıl sonra Gray *et al.* 4 °C'de birkaç hafta soğuk zenginleştirme işlemine dayanan yeni bir teknik geliştirmiştir. *Listeria* 4 °C gibi düşük sıcaklıklarda gelişebildiği için daha yüksek sıcaklıktaki inkübasyona göre pozitif örnek sayısının arttığı görülmüştür. Ancak bu işlemin çok uzun zaman alması (7 günden bir kaç aya kadar) sebebiyle daha sonraları bu işlemde vazgeçilmiştir (Asperger *et al.* 1999, Beumer and Hazeleger 2003).

Daha yeni tekniklerin, çeşitli selektif ve ayırt edici maddelerin zenginleştirme ve izolasyon besiyerlerinde kullanımıyla pek çok sayıda zenginleştirme ve izolasyon besiyeri geliştirilmiştir. FDA Broth, ilk standart *Listeria* referans metot besiyeridir (IDF

143A; 1995). Amerika'da en çok kullanılan iki besiyerinden biri olan LEB, FDA tarafından UVM Broth ise FSIS tarafından kullanımı tavsiye edilmektedir (Bailey *et al.* 1990a,b). Ön zenginleştirme besiyerleri olarak; Fraser Broth (yarı konsantre), UVM I (University of Vermont) Broth, *Listeria* Enrichment Broth, Buffered *Listeria* Enrichment Broth kullanılırken, selektif zenginleştirme besiyerleri ise Fraser Broth (tam konsantre), UVM II ve L-PALCAMY'dir. *L. monocytogenes* analizinde kullanılan zenginleştirme besiyerleri ve geliştiren araştırmacılar Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5 *L. monocytogenes* analizinde kullanılan zenginleştirme besiyerleri ve geliştiren araştırmacılar (Farber and Peterkin 1991, Atlas 1996, Hitchins 2003)

Yöntem	Besiyeri	Geliştiren Araştırmacı
	Enrichment Broth	Ralovich ve ark., 1971, 1972
USDA	UVM Broth	Donnelly ve Baigent, 1986
	SEP Selective Enrichment Procedure	Doyle ve Schoeni, 1986
FDA	<i>Listeria</i> Enrichment Broth	Lovett ve ark., 1987
	Mod. UVM Broth	Mc Clain ve Lee, 1988
ISO, USDA	Fraser Broth	Fraser ve Sperber, 1988
	Lovett's <i>Listeria</i> Enrichment Broth	Lovett, 1989
	<i>Listeria</i> Repair Broth	Busch ve Donnely, 1992
FDA/BAM	Buffered <i>Listeria</i> Enrichment Broth	Hitchins, 1995
	oPSU Broth	Knabel, 2002

Bir besiyerinin değerlendirilmesinde şu 3 kriter önemlidir.

- Duyarlılık (pozitif örneğin belirlenme oranı)
- Spesifiklik (negatif örneğin belirlenme oranı)
- Etkinlik (verilen sonuçların doğru olma ihtimali) (Capita *et al.* 2000).

Selektif besiyerinin zenginleştirme özelliklerini belirlemede şu kriterlerin olması tavsiye edilmektedir.

- Geri alım oranının yüksek olması
- Hasar görmüş bakterinin canlanmasına izin verilmesi
- Yüksek sayıdaki refakatçi bakterinin baskılanması (Asperger *et al.* 1999).

UVM I-II Broth besiyerine 1988 yılında 20 mg Nalidiksik asit katılarak besiyeri modifiye edilmiştir (Mc Clain and Lee 1988). USDA tarafından selektif zenginleştirme besiyeri olarak önerilen UVM II'ye 1988 yılında LiCl ve Amonyum Fe(III) sitrat eklenmesiyle Fraser Broth besiyeri elde edilmiştir (Fraser and Sperber 1988). Fraser Broth besiyerindeki tampon maddelerden biri olan Na₂HPO₄ başlangıçta 12,5 g/L oranında kullanılırken daha sonraları bu oran 9,6 g/L'ye düşürülmüştür (Asperger *et al.*1999). *L. monocytogenes* analizinde en çok kullanılan zenginleştirme besiyeri bileşimleri Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6 *L. monocytogenes* analizinde kullanılan zenginleştirme besiyeri bileşimleri

BİLEŞENLER (g/L)	ISO		USDA-FSIS		FDA / IDF			Diğerleri		
	Fraser 1/2	Fraser 1/1	UVM I	UVM II	TSB-LCM	Buff. LEB	LEB	Hi I	Hi II	Lovet's LEB
Temel Bileşenler										
Proteoz Pepton	5,0	5,0	–	–	–	–	–	–	–	–
Kazein Peptonu	5,0	5,0	–	–	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	22,67
Soya Peptonu	–	–	–	–	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	4,0
Triptoz	–	–	10,0	10,0	–	–	–	–	–	–
NaCl	20,0	20,0	20,0	20,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	6,67
D(+) Glikoz	–	–	–	–	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	3,33
Maya ekstraktı	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	6,0	6,0	6,0	6,0	–
Et ekstraktı	5,0	5,0	5,0	5,0	–	–	–	–	–	–
Na- prüvat	–	–	–	–	–	1,1	–	–	–	–
Tamponlama										
Na ₂ HPO ₄	9,6	9,6	12	12	–	9,6	–	12	12	–
KH ₂ PO ₄	1,35	1,35	1,35	1,35	–	1,35	–	1,35	1,35	–
K ₂ HPO ₄	–	–	–	–	2,5	2,5	2,5	–	–	3,33
İndikatör										
Eskulin	1,0	1,0	1,0	1,0	–	–	–	–	–	–
Fe (III) NH ₄ sitrat	0,5	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–
İnhibisyon										
LiCl	3,0	3,0	–	–	10,0	–	–	3,0	3,0	–
Akriflavine (mg/L)	12,5	25,0	12,0	25,0	–	10,0	14,0	10,0	25,0	–
Nalidiksik asit (mg/L)	10,0	20,0	20,0	20,0	–	40,0	40,0	40,0	40,0	–
Moksalaktam (mg/L)	–	–	–	–	5,0	–	–	–	–	–
Siklohegzimid (mg/L)	–	–	–	–	–	–	50,0	50,0	50,0	–
Kolistin sülfat (mg/L)	–	–	–	–	2,5	–	–	–	–	–

Bütün *Listeria* türleri eskulini 6,7-dihidroksikumarin bileşiğine parçalar ve bu bileşik demir iyonlarıyla reaksiyona girerek siyahlaşmaya neden olur (Fraser and Sperber 1988). Eğer reaksiyon sonucunda siyahlaşma meydana gelmezse *Listeria* yoktur sonucuna varılır ve selektif katı besiyerine geçişe gerek görülmez. Bu diferansiyel

sistemin duyarlılığı % 98,95 ve negatif örnek belirleme yeteneği yani spesifikliğı % 40 olarak bulunmuştur (Capita *et al.* 2000). Fraser Brothu geliştiren araştırmacılar 24 saat inkübasyon sonrası besiyerinde siyahlaşmanın olması için örnekte en az 10^3 kob/mL *Listeria* hücresi olması gerektiğini bildirmişlerdir. Eğer örnek daha düşük sayıda *Listeria* içerirse Fraser Brothta siyahlaşma görülebilmesi için inkübasyon süresinin daha uzun olması gerekmektedir (Fraser and Sperber 1988). Warburton *et al.* (1991a, 1992), *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. gibi refakatçi mikroorganizmaların Fraser Brothta düşük sayıda, 10^2 kob/mL'den daha az olmasına rağmen eskulini hidrolize ederek siyahlaşmaya ve sahte pozitif sonuca neden olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde diğer araştırmacılar da Fraser Broth besiyerinden farklı oranlarda (Warburton *et al.* (1991a) % 56,5, Flanders *et al.* (1995) % 66,2, Capita *et al.* (2000) % 60,0, Fraser and Sperber (1988) % 69,9, Warburton *et al.* (1992) % 74, Koçan ve Halkman (2007) % 45) sahte pozitif sonuç almışlardır (Capita *et al.* 2000, Koçan ve Halkman 2007).

İnkübasyon süresi de zaman içinde değişiklik göstermiştir. FDA 1987'de açıkladığı yöntemde inkübasyon süresini 24-48 saatten 7 güne uzatmıştır. 7 günlük inkübasyonun *L. monocytogenes* 'in geri alım oranını azalttığı pek çok araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Lammerding and Doyle 1989, Bailey *et al.* 1990b, Asperger *et al.* 1999). Warburton *et al.* (1991b) ve Walker *et al.* (1990) ve Kornacki *et al.* (1993) inkübasyon süresini 48 saat olarak bildirmiştir. 7 günlük inkübasyon sonunda elde edilen bakteri sayısının 2 günden daha düşük ama 1 günden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bailey *et al.* (1990b), inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate uzatılmasıyla *L. monocytogenes* sayısının önemli bir şekilde yaklaşık 2,5 log arttığını bildirmiştir. Ancak tam tersine Fraser Broth besiyerinde uzun süreli inkübasyonda refakatçi bakteriler selektif maddelerin varlığında gelişerek *L. monocytogenes* 'in yanlış teşhisine neden olmaktadır. İnkübasyon süresi 48 saate uzatıldığı zaman *L. monocytogenes* teşhisinde kayıplar olmaktadır. Bu kayıpların sebebinin laktik asit bakterileri olduğu düşünülmüştür. Starter kullanılan peynirlerde refakatçi floranın olgunlaşma sırasında artışı *Listeria* spp.'nin geri alımını güçleştirmekte ve bu gibi örneklerde daha düşük geri alım yaşanmaktadır (Vlaemynek and Moermans 1996). Refakatçi mikroorganizmalar zenginleştirme besiyerinin pH'sını düşürebilmekte ve ürettikleri inhibitör maddelerle *Listeria* gelişimini etkilemektedir. Bu yüzden zenginleştirme besiyerininin 24. ve 48. saat inkübasyonlarının

sonunda selektif katı besiyerine geçiş yapılması gerekmektedir (Cox *et al.* 1991). İnkübasyon süresinin 7 güne uzatılmasıyla *L. monocytogenes* sayısının, refakatçi floradan yaklaşık 1 log daha düşük olduğu bulunmuştur (Bailey *et al.* 1990b). Benzer şekilde 4 gün inkübasyon süresinin *L. monocytogenes* sayısında yaklaşık 2-3 log birim, 7 günlük inkübasyon sonunda ise 4 log birim azalmaya neden olduğunu bildirilmiştir (Asperger *et al.* 1999).

Ayrıca inkübasyon süresinin 26 saatten daha fazla uzatılmasında başka bir sorun ortaya çıkmaktadır. Petran and Swanson (1993) ve Curiale and Lewis'e (1994)'e göre *L. monocytogenes* Fraser Brothta bu cinsin diğer türlerinden daha az çoğalmaktadır. Eğer denemede özellikle bu tür izole edilmek istenirse bu bir problem oluşturmaktadır. Tersine olarak Warburton *et al.* (1991a), Fraser zenginleştirme besiyerinde farklı *Listeria* türlerinin UVM II'den daha az geliştiğini bildirmiştir. *L. ivanovii*, Fraser Brothta daha çok izole edilirken, *L. grayi* de UVM II'de daha çok sayıda izole edilmiştir (Capita *et al.* 2001). Fraser Broth besiyerinde refakatçi floranın gelişimi önemli ölçüde lityum klorür ile baskılandığı için Fraser Brothun, UVM II'den çok az daha iyi selektiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Capita *et al.* 2001).

Hitchins 1995'te standart metotları değerlendirmiş ve *Listeria* zenginleştirme metotlarını harmanlayarak önemli noktaları belirlemiştir. Bunlar;

- UVM ve Fraser Broth besiyerlerine daha yüksek tampon kapasitesi uygulanabilir.
- Eskulin ve amonyum Fe(III) sitrat tuz sisteminin indikatör fonksiyonu Fraser Brothta gereksizdir.
- Siklohegzimit kullanımı maya/ küf inhibitörü olarak çok önemlidir.
- LiCl kullanımı, stres altındaki *Listeria* 'nın geri alımında refakatçi floranın inhibisyonunda yararlı olabilir.
- Nalidiksik asit konsantrasyonunun 40 mg/L'ye çıkartılması ısıtma işlemi altında kalmış *Listeria* 'nın geri alımında olumsuz bir etki göstermemektedir.
- Listeria* zenginleştirme formülasyonunda *Listeria* spp.'ye karşı en toksik madde olan akriflavin konsantrasyonu en azından adım adım arttırılmalıdır. 1. adım 10 mg/L, ikinci adım 25 mg/L olmalıdır (Asperger *et al.* 1999).

Yarı konsantre Fraser Brothtan tam konsantreye geçildiğinde pozitif örneğin % 55,9'unun kaybolduğu, bunun *L. innocua* 'nın aşırı gelişiminden kaynaklandığı laboratuvarlar arası çalışmada belirlenmiştir (Johansson *et al.* 2000). Selektif zenginleştirme besiyeri olarak Fraser Broth besiyerinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise *L. monocytogenes* pozitif olan 112 örneğin 104'ü (% 92,9) pozitif bulunarak en iyi sonuç alınmıştır (Beumer *et al.* 1996).

İnokülüm miktarının, *L. monocytogenes* 'in hem lag fazının süresine ve hem de maksimum popülasyona erişme süresine etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca inokülüm miktarının *L. monocytogenes* 'in gelişimine etkisi, kompleks şartların interaksiyonlarına bağlıdır. Bu faktörler, hücrenin fizyolojik durumu, refakatçi mikroflora ve besiyerinin yapısıdır. Gıdada *L. monocytogenes* 'in tahmin ve kontrolünü geliştirmek için bu interaksiyonların *Listeria* 'nın gelişimine nasıl etki ettiğini anlamak önemlidir (Besse *et al.* 2000, Besse *et al.* 2006).

Enrichment Brothun (EB) zayıf tamponlama kapasitesi olduğu için duyarlılığının az olduğu, sahte negatif sonuç alım oranının *L. monocytogenes* için % 80 (FB % 11) ve *Listeria* türleri için % 63 (FB % 6) olduğu bulunmuştur. *L. monocytogenes* tayininde EB'ta % 20 pozitif örnek alınırken bu oran Fraser Frothta % 89'dur (Bailey *et al.* 1990a, Beumer *et al.* 1996, Johansson *et al.* 2000). Besiyerinde glikoz gibi bir karbohidrat kullanıldığı zaman iyi bir tamponlama sisteminin bulunması gerekir. Aksi takdirde besiyerinin etkinliğinin düştüğü bilinmektedir. Ön zenginleştirme metot ve besiyerlerini karşılaştıran bir araştırmada Fraser Broth besiyerinde daha yüksek tamponlama kapasitesi olması gerektiği vurgulanmıştır (Asperger *et al.* 1999).

İki aşamalı zenginleştirme işleminin gıdada *Listeria* spp.'nin belirlenmesini geliştirdiği görülmüştür (Lee and Mc Clain 1986, Lammerding and Doyle 1989, Fernandez-Garayzabal and Genigeorgis 1990, Warburton *et al.* 1991a, Asperger *et al.* 1999). ISO yönteminde kullanılan iki aşamalı zenginleştirme işlemi FDA metodunda kullanılmış ve önemli ölçüde gelişme elde edilmiştir. Soğuk zenginleştirme, FDA zenginleştirme, selektif zenginleştirme [Doyle and Schoeni (1986)] yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir araştırmada tek başına hiçbir yöntemin toplam pozitif örnek sayısını (41 örnek)

vermediği ve her üç yönteminde aynı anda pozitif olduğu örneğin olmadığı görülmüştür. Bunun sonucunda iki aşamalı zenginleştirme işleminin gıdadan *Listeria* izolasyonunda faydalı olacağı düşünülmüştür (Doyle and Schoeni 1987). İki metodun birlikte kullanımı *L. monocytogenes* 'in geri alımını tek metodun kullanımına göre önemli bir şekilde arttırmaktadır. İki farklı zenginleştirme besiyeri ve/ veya selektif katı besiyeri kullanımında bu etkiler görülmüştür (Farber 1993, Vlaemynck and Moermans 1996, Vaz-Velho *et al.* 2001).

Çeşitli işlemler bakterinin zarar görmesine neden olduğu için bakteriyi canlandırma teknikleri teşhis için önemli bir aşamadır. Bush ve Donnelly (1992) selektif olmayan ön zenginleştirme adımını 5 saate uzatarak hasar görmüş hücrelerin canlanmasını sağlamış, ardından selektif maddelerin eklenmesiyle selektif zenginleştirmeye devam etmiştir. Başka bir çalışmada ise 4 saat canlandırma işleminden sonra selektif maddeler eklenmiş ve 20 saat sonunda *L. monocytogenes* sayısı 10^1 'den 10^7 hücre/mL'ye ulaşmıştır (Martin and Katz 1993, Gorski *et al.* 2006). Somon balıklarında *Listeria* türlerinin az oranda bulunmasının ön zenginleştirme besiyerlerinin selektivitesinden kaynaklandığı düşünülmüş ve bu amaçla katkısız Fraser Broth ile % 0,1 (w/v) peptonlu su karşılaştırılmıştır. Peptonlu su tek başına kullanıldığında 8 örnek, Fraser Brothta 5 örnek ve her iki besiyerinde de ortak 2 örnek pozitif bulunmuş ancak Fraser Brothta hiç *L. monocytogenes* tespit edilememiştir. Sonuçta, katkı ilave edilmeden Fraser Broth'un 4 saat yerine 6 saat inkübasyonu ile pozitif örnek sayısının arttığı bulunmuştur (Lammerding and Doyle 1989, Vaz-Velho *et al.* 2001). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada *L. innocua*'nın somon balıklarında pH, su aktivitesi, tuz konsantrasyonu ve dumanlama sıcaklığından (18-30 °C) etkilenmediği ancak dumanlama süresinden etkilenerek sayısında 3 log birimlik indirgenme görüldüğü bildirilmiştir (Sabanadesan *et al.* 2000).

PALCAM Broth (35 °C'de 26 saat inkübasyon) ve selektif zenginleştirme için UVM II (35 °C'de 26 saat inkübasyon) yönteminin zenginleştirme aşamaları için en iyi kombinasyonu içerdiği bulunmuştur. Sahte pozitif oranı % 1,9 ve sahte negatif oranı ise % 3,0 olarak verilmiştir (Sevel *et al.* 2003).

Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) katkılı olarak (akriflavin 10 mg/L, nalidiksik asit 40 mg/L ve siklohegzimid 50 mg/L) katkısız olana göre bakterinin generasyon süresini 8-26 dakika uzamasına neden olmuştur. Bunun bakterinin kimyasallardan etkilenmesinin bir sonucu olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmada kullanılan BLEB'un, UVM I ve UVM II'den daha iyi bir besiyeri olduğu görülmüştür. Bu sonuç iki besiyeri arasındaki besin öğelerinin farklı olması ile açıklanmıştır (Gorski *et al.* 2006).

L. monocytogenes tek başına bulunduğu zaman selektif sıvı besiyerinde geri alımı daha başarılı olmaktadır. Ancak *L. innocua* ile birlikte bulunduğu zaman *L. innocua* 'nın generasyon süresi *L. monocytogenes* 'ten daha kısa olduğu için *L. monocytogenes* 'in geri alım oranı daha düşük olmaktadır (Johansson *et al.* 2000, Vaz-Velho *et al.* 2001, Cornu *et al.* 2002, Beumer and Hazeleger 2003). Yapılan bir çalışmada pek çok *L. innocua* suşunun *L. monocytogenes* 'e karşı bakteriyosin benzeri bir madde ürettiği ve zenginleştirme aşamasından sonra mikroorganizmanın gelişmesinin inhibe olabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmada kullanılan 129 *L. innocua* suşundan 114'ü *L. monocytogenes* 'in gelişimini inhibe etmiştir. Sadece 2 *L. innocua* suşunun *L. monocytogenes* 'e karşı inhibitör etkisinin olmadığı bulunmuştur (Yokoyama *et al.* 1998).

L. monocytogenes 'in gıdalarda belirlenmesi için metot geliştirme üzerinde 11 laboratuvar ortaklaşa çalışmışlar ve her iki zenginleştirme metodu (USDA/UVM I-II ile FDA/LEB) arasında önemli bir fark olmadığı ve KOH uygulamasının zenginleştirme kültüründe bakterinin geri alım oranına önemli bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (Westöö and Peterz 1992). Stres altında olan ve olmayan hücreler ile yapılan çalışmalarda; dondurmada (Hitchins 1989), deniz ürünlerinde (Lovett *et al.* 1991), yumuşak Fransız peyniri ve tavuk suyunda (Bailey *et al.* 1990b), mavi ve beyaz küflü peynir ve tuzlanmış sığır eti konservesinde (Westöö and Peterz 1992) FDA ve USDA metodunun her ikisinde de bu patojen eşit olarak geri kazanılmıştır. Bu sonuçların oldukça yüksek seviyede *L. monocytogenes* ve düşük sayıda refakatçi ile yapay olarak kontamine edilmiş örnekler kullanıldığı için alınmış olabileceği açıklanmıştır (Hitchins 1989, Beumer *et al.* 1996). 19 laboratuvarın ortak yürüttüğü bir çalışmada FDA ve USDA

yöntemleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada 613 örnek FDA yöntemi ve modifikasyonları için 404 örnek ise USDA yöntemi ve modifikasyonları için kullanılırken 169 örnek ise her iki metot için kullanılmıştır. USDA yönteminde geri alım oranı FDA yöntemine göre % 6 daha fazla bulunmuştur (Warburton *et al.* 1991b). Peynir örneğinde ISO yöntemi IDF yönteminden daha iyi sonuç vermiştir (Waak *et al.* 1999). IDF'nin yürüttüğü 18 laboratuvarın katıldığı ortak bir çalışmada *L. monocytogenes* 'in sütte varlığı ve belirlenmesi araştırılmış, 1350 analiz yapılmış ve metodun % 100 spesifikliğe, % 94-100 duyarlılığa sahip olduğu düşük ve yüksek inokülüm oranında belirlenmiştir (Twedt *et al.* 1994).

L. monocytogenes 'in ısıtma işlemi hasar görmüş hücrelerinin geri alımında UVM Broth ve LEB başarılı bulunmuştur. Eğer canlı hücre sayısı düşükse yani hücreler hasar görmüşse UVM Brothta geri alım oranının LEB'tan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Golden *et al.* 1988, Bailey *et al.* 1990a, Beumer *et al.* 1996, Johansson *et al.* 2000). Ancak yapılan başka bir çalışmada da 55 °C'de 20 dakika ısıtma işlemi hasar görmüş *L. monocytogenes* hücrelerinin BHIEM (BHI+ MgCl₂+ egg yok) besiyerinde 18 saatte geri alınırken UVM I'de 22 saat ve UVM II'de 48 saatte geri alım gerçekleşmiştir (Jacobsen 1999). Fraser Broth besiyerinde de geri alım EB (FDA Broth) besiyerinden istatistik olarak önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Vlaemynek and Moermans 1996).

Isıtma işlemi hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in geri alımında 8 zenginleştirme besiyeri karşılaştırılmış ve en iyi sonuç LRB'ta 5,5 saat, daha sonra TSB'ta yaklaşık 5,68 saat ve Fraser Brothta yaklaşık 18 saat ile en uzun zaman aldığı bulunmuştur (Silk *et al.* 2002). Isıtma işlemi zarar görmüş *L. monocytogenes*, >30 °C inkübasyon sıcaklığında belirlenememiş ancak sıcaklık 25 °C'ye düşürüldüğü zaman belirlenebilmiştir (Teo and Knabel 2000). Universal Pre-enrichment Broth (UPB) besiyeri ısıtma işlemi hasar görmüş patojenlerin geri alımı için geliştirilmiş bir besiyeridir. *L. monocytogenes* için 6 saat inkübasyonun yetersiz olduğu ve en az 24 saatlik inkübasyonun gerekli olduğu bildirilmiştir (Zhao and Doyle 2001). Doğal olarak kontamine kaynaklardan *L. monocytogenes* 'in izolasyonunun yapay olarak kontamine gıdadan daha zor olduğu belirtilmiştir (Doyle and Schoeni 1986).

Isıl işleme hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde farklı zenginleştirme besiyerlerinin ve refakatçi floranın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada UVM, LEB, L-aerobik ve anaerobik L-PALCAMY, PSU Broth besiyerleri karşılaştırılmış ve anaerobik PSU Broth, diğer besiyerlerine göre sahte pozitif alma oranı en düşük ve hasarlı bakterinin belirlenme frekansı ise en yüksek olan besiyeri olarak bulunmuştur. *E. faecium* 'un aerobik ve anaerobik ortamda PSU Broth ve PALCAMY besiyerinde bulunması hasarlı *L. monocytogenes* 'in belirlenmesini önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak *E. faecium* sayısı $>10^6$ kob/mL olduğu takdirde, tersine olarak hasarlı bakterinin belirlenmesini engellemektedir. UVM Brothtaki kayıpların akriflavin derişiminin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. L-PALCAMY besiyeri zengin bileşenler içerdiği için *E. faecium* 'un gelişimini teşvik etmiş ve *L. monocytogenes* 48 saat sonunda anaerobik PSU Brotha göre daha düşük oranda belirlenmiştir (Hae-Suh and Knabel 2001).

Listeria, genellikle ısıtma, dondurma, asit uygulaması veya sanitasyon amaçlı kullanılan bileşikler gibi uygulamalar sonucunda gıdalarda hasar görmüş olarak bulunmaktadır. Ön zenginleştirme için UVM veya LRB, selektif zenginleştirme için de Fraser Broth besiyeri kullanıldığı UVM veya LRB'nin tek başına kullanımına göre önemli derecede daha fazla pozitif sonuç alınmıştır (Donnelly 2002).

Isıl işleme (56 °C 50 dk.) zarar görmüş *L. monocytogenes* 'in canlandırılmasında çeşitli karbohidratların etkileri araştırılmış ve glikoz, laktoz veya sakkarozun % 0,5 eklenmesiyle onarım hızının arttığı bulunmuştur. 5 saat içinde sayı kontrole göre % 50'nin üzerinde artmıştır. Daha yüksek konsantrasyon ve diğer şekerler negatif etki yapmıştır. Mannoz, früktoz, galaktoz veya eskulinin ısıtma zarar görmüş *L. monocytogenes* 'in geri alımında negatif etkisi vardır. Termodurik *Lactobacillus* 'un gelişimini teşvik ettiği belirlendiği için glikoz, son zamanlarda hazırlanan selektif ön zenginleştirme besiyeri bileşimlerinde yer almamaktadır (Busch and Donnelly 1992, Teo and Knabel 2000, Besse 2002).

Modifiye Listeria Enrichment Broth (MLEB) besiyerinin, Tryptone Soya Broth (TSB) maya ekstraktı, akriflavin (trifaflavin) ve nalidiksik asit eklenerek geliştirilen (TSByeAB) besiyerinden daha iyi zenginleştirme ortamı sağlamıştır (Cox *et al.* 1991).

L. monocytogenes 'in geliştiği minimal besiyeri üzerine yapılan bir çalışmada geliştirilen besiyerlerinden hiçbirinin bütün suşların gelişimini destekleme özelliğinde olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmada sadece metionin ve sistein aminoasitleri ile riboflavin ile lipoik asidin esansiyel olduğu ve tiamin ile biotinin sağlıklı koloni oluşumu için gerekli olduğu bulunmuştur. Besiyerinde denenen 16 karbohidrattan sadece glikoz, gliserol, früktoz ve mannozun gelişmeyi desteklediği görülmüştür. Premaratre *et al.* bu bakteride aminoasit katabolik yolunun olmadığını göstermiştir. Araştırmacı, tamponlama kapasitesinin ve fosfat kaynağı olarak kullanılan fosfat tuzlarının yüksek konsantrasyonda olduğunda bakteri için toksik etkili olabileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmada geliştirilen HTM besiyerinde fosfat tuzları azaltılmış ve yerine MOPS kullanılmıştır (Tsai and Hodgson, 2003).

Yürütülen bazı araştırmalarda *L. monocytogenes* 'in geri alımını teşvik edici unsurlar belirlenmiştir. Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine % 0,5 maya ekstraktı ilave edilmesi ısı ile zarar görmüş *L. monocytogenes* 'in canlanmasında etkili olmaktadır (5 saat sonra 0,5 log kob/mL artış). Maya ekstraktı, *Listeria* için gerekli olan B-kompleks vitaminleri bakımından önemli bir kaynaktır ve besin bileşenlerini sağlayarak hücre membranının hızlı bir şekilde onarılmasını sağlar (Busch and Donnelly 1992, Martin and Katz 1993, Besse 2002). Amonyum demir sitratın, eskulin hidrolizini göstermesinin yanında *L. monocytogenes* 'in gelişimini teşvik edici etkisi olduğu gözlenmiştir (Fraser and Sperber 1988). Canlandırma besiyeri bileşiminde bulunan pirüvat, reaktif oksijen türlerini nötralize etmektedir (Martin and Katz 1993). Selektif olmayan besiyerine % 1-3 sodyum pirüvat eklenmesinin ısı ile zarar görmüş *L. monocytogenes* 'in geri kazanılmasını artırdığı belirlenmiştir. FDA zarar görmüş hücrelerin geri kazanılmasını arttırmak için ön zenginleştirme besiyerine % 0,2 sodyum pirüvat eklenmesini tavsiye etmiştir (Curtis 1999, Hae-Suh and Knabel 2000, Besse 2002, Foong and Dickson 2004). Magnezyum iyonlarının stres altındaki bakterinin geri alımında pozitif etkisi vardır. Mg iyonları hücre membranı ve ribozomların stabilizasyonunda enzimlerin

aktivasyonunda rol oynar. En etkili magnezyum konsantrasyonu 15 mmol/L olarak belirlenmiştir. Magnezyum oranı ile inkübasyon sıcaklığı arasında önemli bir interaksiyon mevcuttur. 40 mmol/L oranında kullanıldığında inkübasyon sıcaklığı 27,5 °C'den yüksek olması halinde hasar görmüş hücreler inhibe olmaktadır. Demir iyonları ise redoks reaksiyonları için gerekli bir hücre bileşiğidir ve *L. monocytogenes* 'in gelişimini arttırıcı etkisi vardır (Teo and Knabel 2000, Besse 2002). Yumurta sarısı ilavesi de stres altındaki *L. monocytogenes* 'in geri alımını arttırmaktadır. Yumurta sarısı katkısının PALCAM Agarda hasarlı hücrelerin geri alımındaki yararı gösterilmiştir (in't Veld and Boer 1991).

150 mMol/L D-serin, *Bacillus* spp. sporlarının vejetatif forma geçmesini önlemekte ayrıca bu oranda eklenen aminoasitlerin ısı ile zarar görmüş *L. monocytogenes* üzerine olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır. Bu etkiyi D-aminoasitler, (D-serin veya D-alanin) spor yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak, germinasyonu teşvik eden L-aminoasitlerle rekabet ederek gerçekleştirmektedir (Teo and Knabel 2000, Besse 2002). Ancak besiyerinde D-serin kullanım oranı *L. monocytogenes* 'in gelişimi için önemlidir. Başka bir çalışmada 140,2 mM D-serin *B. subtilis* var. *globii* sporlarının germinasyonunu tamamen inhibe etmiş ancak *L. monocytogenes* 'in geri alımını engellemiştir (Teo *et al.* 2001). Optimize Pennsylvania State University (oPSU) Broth besiyerindeki LiCl 7 g/L'den 9 g/L'ye, MgSO₄ 1,81 g/L'den 1,9 g/L'ye ve D-Serin 13,7 g/L'den (130 mM) 15,8 g/L'ye (150 mM) çıkarılarak besiyeri modifiye edilmiş ve pastörize sütte hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in geri alım oranına etkileri belirlenmiştir. Sonuçta 9 g/L (212 mM) LiCl'ün *E. faecium* 'u tamamen inhibe ettiği, *L. monocytogenes* 'in geri alımına izin verdiği ve optimum geri alım için 15,8 g/L MgSO₄ kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir. Refakatçi mikroflora yokluğunda optimum inkübasyon sıcaklığı 28 °C bulunurken refakatçi floranın varlığında 30 °C inkübasyon sıcaklığı optimum bulunmuştur (Teo *et al.* 2001). Pastörize süt ve soslu sandviç örneklerinde oPSU Broth ile tek adımda zenginleştirme işleminin *L. monocytogenes* geri alımında etkisi araştırılmış ve hasarlı veya normal *L. monocytogenes* sayısı düşük olsa bile başarılı bir şekilde geri alınabildiği gösterilmiştir (Knabel 2002).

Yapılan son çalışmalarda ısıtıl işlem ile hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in izolasyonunda zenginleştirme besiyerine 0,5 g/L düzeyinde L-sistein ilavesinin, aerobik koşullarda daha yüksek düzeyde izolasyon sağladığı gösterilmiştir. Ancak 5 g/L oranında kullanıldığında hücrenin geri alımını tamamen inhibe etmektedir. İstenirse katkılar ilave edilmeden 30 °C'da 2 saat inkübasyon yapılarak zarar görmüş hücreler canlandırılmaktadır. Bu uygulama özellikle kurutma, ısıtma, dondurma gibi aşamalar sırasında zarar görmüş *Listeria* 'nın belirlenmesi için önerilmektedir (Hae-Suh and Knabel 2000, Besse 2002).

Oksijen, süperoksit anyonları ve hidrojen peroksitin de dahil olduğu reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bakteri kendini katalaz, süperoksit dismutaz gibi detoks etkisi olan antioksidant enzimlerle korumaktadır. Ancak bu iki enzimin aktivitesi hücre ısıtıl işlemle hasar gördüğünde azalmakta ve enzim sentez hızı düşmektedir. Bunun için anaerobik koşullar, antioksidant enzimlerin besiyerine eklenmesi gibi konularda hasarlı *Listeria* 'nın geri alımı test edilmektedir (Hae-Suh and Knabel 2000, Besse 2002). Anaerobik inkübasyon ile ısıtıl işlemle hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in selektif olmayan besiyerinde daha iyi geri alınabilmiştir (Mendonca and Knabel 1994). Ancak selektif besiyerinde aerobik koşullarda sonuç alınabilirken anaerobik koşullarda gelişme gözlenememiştir. Sıcaklıkla hasar görmüş (62,8 °C-5 dk. çiğ sütte) *L. monocytogenes* zorunlu anaerobik şartlarda TSAYE 30 °C'de 7 gün sonra geri alınabilmiş ancak, aerobik ortamda TSAYE besiyerinde hiçbir gelişme olmamıştır (Knabel *et al.* 1990, Hae-Suh and Knabel 2000, Besse 2002). Ayrıca selektif zenginleştirme işleminde 30 °C'de 24 saat mikroaerobik inkübasyon tavsiye edilmiştir. Sıcaklıkla hasar görmüş hücrelerin geri alımında sıcaklığın etkisinin modellenmesi üzerine pek çok çalışma yapılmış ve sonuçta hücrenin geri alınabilmesi için tuz toleransının olması gerektiği bulunmuştur (Doyle and Schoeni 1987, Chawla *et al.* 1996, McKellar *et al.* 1997, Chhabra *et al.* 2002).

L. monocytogenes 'in gelişim kurvesinin çıkarıldığı bir çalışmada Luria Bertani Broth (LB), *Listeria* Repair Broth (LRB), Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) ve LCGM Broth (Low Conductive Growth Medium) besiyerleri karşılaştırılmıştır. Sonuçta LB besiyerinde LCGM'ye göre daha kısa generasyon zamanı, daha uzun lag fazı ve iki

kat daha fazla hücre yoğunluğu elde edilmiştir. LRB ve BLEB'da ise daha iyi gelişim oranı, daha kısa generasyon zamanı ve diğer besiyerlerinden farklı olarak daha kısa lag fazı elde edilmiştir (Banada *et al.* 2006).

FDA, UVM ve Dominguez-Rodriguez besiyerlerinden FDA besiyerinde bütün *Listeria* türleri daha hızlı ve daha yüksek sayıda gelişmiştir. Bu çalışmada FDA-EB Broth ve LPM Agar kombinasyonu en etkili bulunmuştur (Garayzabal and Genigeorgis 1990). Çiğ süttten *Listeria* izolasyonunda LEB, UVM ve selektif zenginleştirme besiyeri olarak Fraser Broth ve L-PALCAMY arasında önemli bir fark bulunmazken pozitif örnek açısından PALCAMY (% 16,7) diğerlerinden UVM ve Fraser Broth (% 15,3) ve LEB (% 14,0) biraz daha etkili olduğu bildirilmiştir (Lund *et al.* 1991).

L. monocytogenes 'in lag zamanı sıvı besiyerinde katı besiyerine göre önemli bir şekilde daha uzun olmaktadır. Bu farkın oksijen kullanılabilirliğindeki değişiklikten veya sıvı-katı yapı farkından kaynaklandığı düşünülmektedir (Rasch *et al.* 2007).

2.8.3 Selektif katı besiyerleri

L. monocytogenes analizinde en çok kullanılan selektif izolasyon katı besiyerleri; *Listeria* selektif Agar (LSA), McBride *Listeria* Agar (MLA), Modifiye Mc Bride *Listeria* Agar (MMLA), Martin Agar (Gum base nalidixic acid; GBNA), Lithium chloride phenyletanol-moxalactam (LPM), Polymixin Acriflavine Lithium chloride Cefprozil Aesculin Mannitol Agar (PALCAM), Oxford Agar, modifiye Oxford Agar (MOX), Enhanced Haemolysis Agar (EHA), CHROM Agar, Rapid 'L. mono Agar, BCM Agar, ALOA Agardır (Atlas 1996, Hitchins 2003, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004). Çizelge 2.7'de *L. monocytogenes* analizinde kullanılan katı besiyerleri ve geliştiren araştırmacılar verilmiştir.

Çizelge 2.7 *L. monocytogenes* analizinde kullanılan katı besiyerleri ve geliştiren araştırmacılar (Farber and Peterkin 1991, Atlas 1996, Hitchins 2003)

Besiyeri	Geliştiren Araştırmacı
Mc Bride <i>Listeria</i> Agar (MLA)	Mc Bride ve Gerard, 1960
Modifiye Despierres Agar (MDA)	Despierres, 1971
Ralovich nalidiksik asit tripaflavin Agar	Ralovich, 1971
Dominguez Rodriguez İzolasyon Agar	Dominguez ve ark., 1984
Gum- Nalidiksik asit Tripton Soya Agar (GBNTSA)	Martin ve ark., 1984
Donnelly <i>Listeria</i> Enrichment Agar	Donnelly ve Baigent, 1986
LiCl feniletanol moksalaktam Agar (LPM)	Lee ve McClain, 1987
Modifiye Mc Bride <i>Listeria</i> Agar (MMA)	Lovett ve ark., 1987
Akriflavin-Seftazidim Agar	Bannerman ve Bile, 1988
Donnelly <i>Listeria</i> Enrichment	Golden ve ark., 1988
Modifiye Vogel Johnson Agar (mVJ)	Golden ve ark., 1988
RAPAMY Agar	Van Netten ve ark., 1988
PALCAM Agar	Van Netten ve ark., 1989
OXFORD Agar	Curtis ve ark., 1989
Enhanced Haemolysis Agar (EHA)	Cox ve ark., 1991
Modifiye EHA	Beumer ve ark., 1997
ALOA Agar	Ottoviani ve Agosti, 1997
CHROM Agar	Foret ve Dorey, 1997
Rapid'L.mono Agar	Foret ve Dorey, 1997
<i>L. monocytogenes</i> Blood Agar (LMBA)	Johansson, 1998
BCM Agar	Restaino ve ark., 1999
Harlequin Agar	Smith ve ark., 2001

Isıl işleme hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in geri alımı üzerine pek çok araştırma yürütülmüş ve çok sayıda besiyeri denenmiştir. Bunlara örnek olarak;

- Beckers *et al.* (1987)
- Triptoz broth, 30 ve 37 °C'de inkübasyon
- Bradshaw *et al.* (1985,1987)
- Triptik soy agar (TSA) % 0,6 yeast ekstraktlı (YE), 37 °C'de 48 saat inkübasyon
- Bunning *et al.* (1986) TSA-YE, 37 °C'de 48 saat inkübasyon
- Bunning *et al.* (1988) TSA-YE ayrıca TSB-YE, 25 °C'de 7 gün inkübasyon
- Donnelly and Briggs (1986) ve Donnelly *et al.* (1987) Triptoz agara eskulin ve sitrat eklenmiş, 37 °C'de 48 saat inkübasyon
- Doyle *et al.* (1987) Triptoz agar Mc Bride *Listeria* agar (MLA) 37 °C 48 saat soğuk zenginleştirme ve FDA kültürel zenginleştirme metodu

-Farber *et al.* (1988) Modifiye Mc Bride agar 35 °C 48 saat, soğuk zenginleştirme, canlandırma FDA kültürel zenginleştirme yöntemi,

-Garayzabal *et al.* (1987) MLA, *Listeria* selektif agar 37 °C 48 saat ve kendi zenginleştirme yöntemi verilebilir (Farber 1989).

Listeria suşları; PALCAM Agar üzerinde 1,5-2 mm çapında, gri-yeşil renkli bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu, yuvarlak, yassı bombeli, parlak kolonilerle tanınırlar. Oxford agar üzerindeki tipik *Listeria* kolonileri ise 2-3 mm çapında, gri-kahverengi, etrafları siyah zonla çevrili genellikle ortaları biraz basık, yuvarlak, yassı bombelidirler. PALCAM Agarda β -D-glukozidaz enziminin aktivitesiyle eskulin parçalanmakta ve koloniler gri yeşil renk almaktadır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan eskuletin, demir iyonlarıyla reaksiyona girerek koloni etrafında yaygın bir biçimde kahverengi-siyah hâleler oluşturmaktadır. PALCAM ve Oxford besiyerinin dezavantajı bütün *Listeria* türlerinin hatta bazı refakatçi bakterilerin bile (*Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. gibi) kahverengi-siyah hâleleri oluşturmalarıdır. Bu besiyerlerinde *L. monocytogenes* diğer patojen olmayan *Listeria* türlerinden ayırt edilememektedir (Warburton 2003, Kiiyukia 2003). Hemolize dayanan besiyerlerinde (EHA,) veya kromojenik besiyerlerinde (ALOA, Rapid'L.mono, CHROM agar, *L. monocytogenes* Blood agar bu ayırım kolaylıkla yapılabilmektedir. MOX besiyerinde *L. monocytogenes* dışında 43 eskulin pozitif bakteri izole edilmiş ve bu izolatların 41'i *Bacillus licheniformis* ve diğer ikisi de *Bacillus* spp. olarak tanımlanmıştır (Cox *et al.* 1998).

Oxford, MOX ve LPM besiyerleri Kuzey Amerika'da yaygın olarak kullanılırken PALCAM ve Oxford agar daha çok Avrupa'da tercih edilmektedir (Farber 1993, King *et al.* 2003). FDA, LPM kullanımını uygulamadan kaldırılmış, ancak LPM'nin eskulin ve Fe III eklendiğinde kullanılabileceğini belirtmiştir (Hitchins 2003). PALCAM Agar, Oxford Agar, MOX Agar ve LPM+eskulin-Fe III besiyerlerinden ikisinin kullanımı FDA, USDA ve ISO arama ve sayım metotlarında tavsiye edilmektedir. Ayrıca yeni kromojenik diferansiyel selektif besiyerleri olan BCM, ALOA, CHROM Agar *Listeria* ve Rapid'L.mono deneme kullanım sonuçları diğer selektif besiyerleriyle paralellik göstermiştir (Reissbrodt 2004).

LPM, MOX ve PALCAM Agar için inkübasyon sıcaklığı 30°C ve EHA için de 37 °C tavsiye edilmiştir. Oxford Agar 30 veya 37 °C'de inkübe edilebilir ama eğer *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* araştırılıyor ise bu türlerin yüksek sıcaklıklarda sefotetan ve fosfomisine olan duyarlılıkları arttığı için 30 °C tavsiye edilmiştir. Benzer şekilde seftazidim 37 °C'de *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* 'nin bazı suşlarına karşı daha aktiftir. Moksalaktam da 37 °C'de *L. seeligeri* 'ye karşı daha çok aktivite gösterir. Oxford Agarda *L. monocytogenes* dışında kalan bazı *Listeria* suşları 35 °C'de inkübe edildiği zaman inhibe olmaktadır (Curtis 1999, Warburton 2003, Kiiyukia 2003). Çizelge 2.8'de *L. monocytogenes* analizinde kullanılan başlıca katı besiyerleri ve bileşimleri verilmiştir.

Çeşitli süt ürünlerinden *L. monocytogenes* 'in geri alınmasında Mc Bride *Listeria* Agar (MLA) FDA, modifiye Mc Bride *Listeria* Agar (MMLA), Gum-Bazlı Nalidiksik Asit Tripton Soya Agar (GBNTSA), LiCl Feniletanol Moksalaktam (LPM) Agarın denendiği çalışma sonucunda LPM Agarın refakatçi mikroflorayı en iyi inhibe eden ve *L. monocytogenes* 'in gelişimi üzerine herhangi bir inhibisyon etkisi görülmeyen en etkili besiyeri olduğu ve LPM Agarda *L. monocytogenes* geri alım oranının % 19-40 oranında arttığı, ayrıca inkübasyonun modifiye atmosferik koşullarda yapılmasının *L. monocytogenes* 'in geri alım oranını arttırmadığı bulunmuştur (Lammerding and Doyle 1989). MLA besiyerindeki LiCl konsantrasyonu 5 g/L'ye çıkarılarak ve 20 mg/L moksalaktam eklenerek MMA besiyeri geliştirilmiştir. MMA besiyerinin bileşimi Columbia CNA Agara dayanmaktadır (Lee and Mc Clain 1986).

GBNTSA pastörize süt ve çikolatalı dondurma miskinde, Dominguez Rodriguez İzolasyon Agar, Brie peynirinde ve modifiye Despierres Agar ise lahanadan bakterinin geri alımında en etkili besiyeri olduğu belirlenmiştir. Mac Bride *Listeria* Agar, MMLA ve Donnelly *Listeria* Enrichment Agar besiyerlerinin etkileri birbirine yakın bulunmuş ancak diğerlerine göre biraz daha zayıf kalmışlardır. Benzer bir çalışma 14 farklı izolasyon besiyeriyle de yürütülmüştür (Golden *et al.* 1988, 1990). LPM Agar, MMA, *Listeria* Selective Agar (LSA- Dominguez-Rodriguez) ve Brain Heart Infusion (BHI) Agarda farklı *Listeria* türlerinin gelişmesi incelenmiş, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* LPM Agarda inhibe olmuştur. LPM ve LSA besiyerleri en iyi performansı göstermiştir (Garayzabal and Genigeorgis 1990).

Çizelge 2.8 *L. monocytogenes* analizinde kullanılan başlıca katı besiyeri bileşimleri

Bileşenler g/L	Mc Bride	MMc Bride	LPM	LCA	PALCAM	Oxford	MOX	ALOA
Temel Bileşenler								
Pepton	–	–	–	27,5 ¹	23	23	23	–
Pepton Hay. par.	5	–	5	–	–	–	–	18
Kazein Enz. par.	5	–	5	–	–	–	–	6
Triptoz	–	10	–	–	–	–	–	–
NaCl	5	5	5	5	5	5	5	5
D(+) Glikoz	–	–	–	2	0,5	–	–	2
Maya ekstraktı	6	–	–	–	3	–	–	10
Et ekstraktı	3	3	3	–	–	–	–	–
Mannitol	–	–	–	–	10	–	–	–
Nişasta	–	–	–	–	1	1	1	–
Na- pruvat	–	–	–	–	–	–	–	2
Agar	15	15	15	15	13	13	12	12-18
Tampon Sistem								
Na ₂ HPO ₄	–	–	–	2,5	–	–	–	2,5
KH ₂ PO ₄	–	–	–	–	–	–	–	–
K ₂ HPO ₄	–	–	–	–	–	–	–	–
MgSO ₄	–	–	–	–	–	–	–	0,5
Mg-gliserofosfat	–	–	–	–	–	–	–	1
İndikatör Sistem								
Eskulin	–	–	–	–	0,8	1	1	–
Fe (III) NH ₄ sitrat	–	–	–	–	0,5	0,5	0,5	–
Fenol red	–	–	–	–	0,08	–	–	–
5Br4Cl3İndoprnozid	–	–	–	–	–	–	–	0,05
İnhibisyon Sistem								
Akriflavin (mg/L)	15,0	–	–	–	5,0	5,0	–	–
Nalidiksik asit (mg/L)	40,0	–	–	–	–	–	–	–
LiCl	0,5	0,5	5	5	15	15	15	10
Seftazidim (mg/L)	–	–	–	50,0	20,0	–	–	20,0
Moksalaktam (mg/L)	–	–	20,0	–	–	–	15,0	–
Polimiksin B (mg/L)	–	–	–	–	10,0	–	–	77600 U
Siklohegzimit (mg/L)	50,0	200	–	–	–	400	–	50,0 *
Amfoterisin B (mg/L)	–	–	–	–	–	–	–	10,0 *
Kolistin sülfat (mg/L)	–	–	–	–	–	–	–	–
Sefotetan (mg/L)	–	–	–	–	–	2,0	–	–
Fosfomisin (mg/L)	–	–	–	–	–	10,0	–	–
Glisin anhidrit	–	10	10	10	–	–	–	–
Fenil etil alkol	2,5	2,5	2,5	–	–	–	–	–

¹Beyin, kalp ekstraktı ve pepton

* İkisinden biri diğeri yerine kullanılabilir

Modifiye Vogel Johnson Agar (m-VJ) ile LPM et, kanatlı eti ve deniz ürünlerinde *Listeria* spp. belirlenmesinde etkinlikleri, En Muhtemel Sayı (EMS) ile karşılaştırılmış ve iki besiyeri arasında önemli bir fark bulunamamıştır (Buchanan *et al.* 1989). Oxford Agarın LPM'den daha iyi olduğu ve LPM'ninde MMA'dan daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır (Lee and Mc Clain 1986, Heisick *et al.* 1989b, Beumer *et al.* 1996).

Warburton *et al.* 1991a, Westöö and Peterz 1992). USDA yönteminde LPM ile birlikte Oxford Agarın kullanılmasıyla *L. monocytogenes* pozitif örneklerin sayısında artış gözlenmiştir (Warburton *et al.* 1991a). Yapılan bir çalışmada LPM Agarın Brie peyniri ve lahana için en uygun besiyeri olduğu, Gum Bazlı Nalidiksik Asit Tripton Soya besiyerinin ise süt ve dondurma miksi için en uygun besiyeri olduğu belirlenmiştir (Cassiday *et al.* 1989). ISO yöntemiyle IDF yöntemi ve çalışmada kullanılan PALCAM ve Oxford Agar besiyerleri peynir örneklerinde *L. monocytogenes* belirlenmesinde karşılaştırılmış, PALCAM Agarın daha iyi geri alım sağladığı ve *Listeria* dışında daha az koloni geliştiği belirlenmiştir (Waak *et al.* 1999).

Yapılan bir çalışmada Baird Parker Agarda (BPA) *L. monocytogenes* 'in geliştiği görülmüştür. Bu besiyeri *Staphylococcus aureus* için selektif ancak *Streptococcus* spp. gelişiminin kontrollü olduğu bir besiyeridir. LPM Agar besiyeri BPA, MLA ve moksalaktamın kombinasyonu ile geliştirilmiş bir besiyeridir. LPM Agar, Fenil Etanol Agara 10g/L glisin anhidrit ve 5 g/L LiCl eklenmesiyle oluşturulmuştur. LPM Agarda da bazı refakatçi bakterilerin (*Enterococcus* spp. ve *Pseudomonas* spp.) geliştiği görülmüştür (Lee and Mc Clain 1986).

LPM Agarın en etkili besiyeri olarak belirlendiği bir çalışmada, *L. grayi* LPM, Rodriguez İzolasyon Agar (RISA) ve mVJ agarda inhibe olurken *L. seeligeri* mVJ Agar besiyerinde tamamen inhibe olmuş, LPM Agarda ise yaklaşık 1,5 log birimlik bir indirgenme olmuştur. Bazı *L. monocytogenes* suşları mVJ'de inhibe olurken *L. innocua* bütün besiyerlerinde çok iyi gelişmiştir. Çalışmada, telluritin refakatçi bakteri inhibisyon avantajından yararlanmak için LPM Agar besiyerine Baird-Parker Agar formülündeki ile aynı oranda eklenmiş ve *Listeria* suşları inhibe olmuştur. *Listeria* 'nın mVJ Agarda gelişip, modifiye Baird Parker Agarda gelişmemesi açıklanamamış ancak yüksek konsantrasyondaki glisin ve LiCl'ün buna sebep olabileceği düşünülmüştür (Loessner *et al.* 1988). İzolasyon besiyerlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada LPM Agarın en yüksek geri alım oranına sahip besiyeri olduğu, mVJ Agarın ise en selektif ama *L. monocytogenes* 'in geri alımında en zayıf besiyeri olduğu bildirilmiştir (Brackett and Beuchat 1989).

Çiğ süttten *Listeria* izolasyonunda LSA, MMA, LPM ve PALCAM Agar besiyerlerinin karşılaştırıldığı çalışmada en yüksek pozitif örnek sayısı Oxford ve PALCAM Agardan elde edilmiştir (Lund *et al.* 1991).

LSA besiyeri, Oxford Agar formülüne 25 mg/L kolistin sülfat ve 30 mg/L nalidiksik asit eklenerek elde edilmiş ve dumanlanmış balıktan *L. monocytogenes* 'in geri alımı için incelenmiştir. Ayrıca Oxford Agar formülüne *L. monocytogenes* 'in kolistin sülfat (25 µg), nalidiksik asit (30 µg), sülfametizol (200 µg) antibiyotiklerine dirençli olduğu belirtilmiştir. LSA'nın selektivitesini arttırmak için besiyerine 25 µg/mL kolistin sülfat, 30 µg/mL nalidiksik asit ve 200 µg/mL sülfametizol eklenmiş ve sülfametizol eklenmeyen besiyerinden yaklaşık 1 log birimlik daha fazla *L. monocytogenes* geri alındığı bulunmuştur. LSA besiyerine eklenen kolistin sülfat ve nalidiksik asit selektiviteyi artırmış ve dumanlanmış balık örneklerinden *L. monocytogenes* 'in geri alım oranını arttırdığı bulunmuştur (Neamatallah *et al.* 2003).

Çiğ tavuk etinden *L. monocytogenes* izolasyonunda PALCAM Agarin duyarlılık, selektivite ve diferansiyel özellik açısından MOX Agardan daha iyi olduğu görülmüştür. MOX besiyerinde 11 laboratuvarın katıldığı FDA ve USDA yöntemlerinin modifiye versiyonlarının karşılaştırıldığı çalışmada 24 saat sonunda yaklaşık % 92 pozitif örnek belirlenmiştir. Doğal kontamine örneklerin analizinde her iki yöntem arasındaki farkın önemli olmadığı belirtilmiştir (Warburton *et al.* 1991b).

Isıl işleme hasar görmüş hücrelerin geri alımının incelendiği bir çalışmada en iyi geri alımın *L. monocytogenes* Blood Agarda (LMBA) olduğu ve 5 °C'de soğuk zenginleştirme işleminin hasarlı hücrelerin onarımına izin vermediği ve inkübasyon süresinin 25 °C'de 10-15 saat ancak, 5 °C'de 8-12 gün aldığı belirlenmiştir (Mackey *et al.* 1994). LMBA, *Listeria* Selective Agar (LA), Oxford Agar ve PALCAM Agar gıdalarda *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde karşılaştırılmış LMBA ve LA zenginleştirme sonrası ve sayımda en iyi sonucu vermiştir. Besiyerlerinin zenginleştirme sonrası teşhis duyarlılıkları PALCAM % 68, Oxford % 67, LA % 74, LMBA ise % 96'dır (Johansson 1998). Başka bir çalışmada LMBA besiyerinden

PALCAM, Oxford veya her ikisinin birlikte kullanımından daha yüksek pozitif sonuç alınmıştır (Johansson *et al.* 2000).

Laboratuvarlar arası ortak düzenlenen çalışmalarda çeşitli yöntem ve besiyerleri karşılaştırılmıştır. 16 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada LMBA, PALCAM(y) Agar ve Oxford Agar besiyerleri, *L. monocytogenes* sayımı açısından karşılaştırılmış ve laboratuvarlar arasında önemli farklar bulunmuştur. Çalışmaya katılan laboratuvarların büyük çoğunluğunda Blood Agardaki bakteri sayısı diğer iki besiyerinden dikkate değer ölçüde daha yüksek bulunurken PALCAM Agardaki sayı 48 saat inkübasyon sonunda Oxford agardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (in't Veld and Boer 1991). PALCAM Agar besiyerinin Oxford agardan daha duyarlı ve daha selektif bir besiyeri olduğu gösterilmiştir (Gracieux *et al.* 2003). Benzer şekilde başka bir çalışmada da LMBA besiyerinin PALCAM ve Oxford Agardan daha yüksek duyarlılıkta olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *L. monocytogenes* diğer *Listeria spp.*'den hemolisin üretimiyle ayırt edilebilmiş ve bu çalışmadaki duyarlılık farkı, besiyerinde kullanılan lityum klorür miktarının LMBA'da (10 g/L) daha düşük olmasına ve akriflavin gibi diğer selektif katkıların bulunmamasına bağlanmıştır (Pinto *et al.* 2001).

EN-ISO 11290-1 (1997) yönteminin performansını belirlemek için 14 Avrupa ülkesinde, 19 laboratuvarda yürütülen, ortak bir çalışmada referans test materyali olarak taze peynir, kıyım ve kurutulmuş yumurta tozu kullanılmıştır. Sonuçlar EN-ISO 11290-1 metodunun; % 85,6 duyarlılığa, % 97,4 spesifikliğe, sahip olduğunu göstermiştir. Ancak test materyalinde çok sayıda *L. innocua* olması halinde tüm gıda çeşitlerinde sahte negatif sonuçlar alındığı ve gıdalarda az sayıda *L. monocytogenes* 'in belirlenmesi için standardın revize edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Scotter *et al.* 2001). Benzer şekilde Rapid'L.mono, ALOA Agar, BCM, PALCAM ve Oxford Agar ile yapılan çalışmada, *L. monocytogenes* ve *L. innocua* içeren örneklerde *L. monocytogenes* 'in *L. innocua* 'ya oranı belirlenmiş ve en yüksek oranın Rapid'L.mono'dan (%2,1), daha sonra ALOA'dan (%1,9) ve üçüncü olarak PALCAM Agardan (%1,2) elde edildiği bildirilmiştir (Beumer and Hazeleger 2003).

Toplam 18 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada 400'den fazla örnekte *L. monocytogenes* tayini yapılmış ve ALOA ve Rapid'L.mono'nun test edilen diğer besiyerlerinden önemli bir şekilde daha iyi performans gösterdiği bulunmuştur. ALOA Agarda *L. monocytogenes* sayısı 2,7 log/g iken PALCAM Agarda 2,1 log/g elde edilmiştir. Bunun sonucunda SC9 üyeleri, ISO 11290 kısım 1 ve 2'de ALOA'nın PALCAM ile değişimine oy birliğiyle karar vermiştir (Beumer and Hazeleger 2003).

Enhanced Haemolysis Agarda (EHA) selektif katkı olarak PALCAM Agarın katkısı kullanıldığı zaman hemoliz reaksiyonu etkilenmiştir. Bunun nedeni olarak akriflavin ve Polimiksin B sülfat olduğu belirtilmiştir. EHA besiyerinde hemolitik reaksiyonu pozitif olan *Bacillus* spp. kolonileri bazen *L. monocytogenes* 'in hemoliz reaksiyonunun okunmasında karışıklığa neden olmaktadır. Bu sorunun besiyerin 40 mg/L nalidiksik asit ilavesiyle aşılabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada EHA, PALCAM ve Oxford Agar karşılaştırılmış ve aralarında önemli bir fark olmadığı anlaşılmıştır (Beumer *et al.* 1997).

Oxford Agar ve EHA besiyerleri karşılaştırılmış ve Oxford Agar besiyerinde % 41,6 *L. monocytogenes* pozitif bulunurken EHA'da % 95,8 pozitif bulunmuştur. Bu farkın EHA'nın Oxford Agardan daha az LiCl (10g/L) içermesi, gelişme faktörü ve hemoliz reaksiyonunun belirlenebilmesi için koyun kanı içermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir. *L. innocua* sayısı *L. monocytogenes* 'ten daha yüksekse *L. monocytogenes* 'in teşhisi zorlaşmaktadır. *L. monocytogenes* / *L. innocua* oranı 1/100 olduğu zaman EHA'da *L. monocytogenes* belirlenebilirken Oxford agarda *L. innocua*, *L. monocytogenes* kolonilerini kapatmaktadır. EHA'da *L. monocytogenes* ile *L. innocua* 'nın koloni olarak ayırımı yapılabilirken Oxford Agarda böyle bir durum söz konusu değildir. EHA'da 366 nm dalga boyu UV ışık altında *Listeria* spp. 4-metilumbelliferil β -D-glikozit (MU β G) sayesinde ışığa yapmaktadır (Cox *et al.* 1991).

PALCAM, Oxford ve LPM'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada 1827 örnekte *Listeria* analizi yapılmış ve PALCAM Agarda 73, Oxford Agarda 35, LPM Agarda ise 35 örnek pozitif bulunmuştur (Cordano and Rocourt 2001) .

PALCAM Agar besiyerini geliştiren araştırmacılar bu besiyerini PALCAMF₁₀, PALCAMY, ALPAMY, Oxford, AC, ARS-MMA, m-VJ, LPM, MMA, RAPAMY, MG, TNSA izolasyon besiyerleriyle karşılaştırmış ve besiyerinin özelliklerini ortaya çıkarmışlardır. MMA, MG, TNSA, PALCAMY, PALCAM ve RAPAMY *L.ivanovii* 'nin gerialımı hariç en verimli besiyerleridir. LPM, MMA ve MG besiyerleri selektivite açısından en zayıf besiyerleridir. M-VJ, ARSMMA, ALPAMY ve AC agar besiyerlerinde daha dūřuk *L. monocytogenes* geri alımı olmuştur. *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. ivanovii* geri alımında PALCAM, RAPAMY, MG ve TNSA besiyerlerinde diğer besiyerlerine göre yaklaşık 3,5 log üzerinde kayıplar olmuştur. Oxford agarda *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* hariç 37 °C'de iyi geri alım sağlanmıştır. Fosfomisin PALCAM Agarda *Listeria* geri alım oranının dūřmesine neden olmuştur. Ancak bu inhibisyon inkübasyon sıcaklığının 30 °C'ye dūřrlmesiyle engellenmiştir. Fosfomisin kullanımıyla *L. monocytogenes* haricindeki diğer *Listeria* türlerinin tamamı baskılanamadığı için denemeden çıkarılmıştır. PALCAM besiyerinde *Enterococcus* veya *Staphylococcus* suşlarının gelişebildiğini ve bu bakterilerin gri koloniler, kahverengi-yeşil hâle veya sarı koloniler, sarı hâle oluşturduğu belirtilmiştir. PALCAM Agar besiyerindeki karakteristik siyahlaşmanın oluşması ancak 30-36 saat inkübasyon sonunda ve 10⁷ kob/mL bakteri seviyesini geçtiğinde gerçekleşmektedir (Van Netten *et al.* 1989, Warburton 2003).

Oxford agarı geliştiren ekip, karışık flora ile birlikte bulunan *L. monocytogenes* 'in izolasyonunda refakatçi bakterinin yaklaşık tamamını inhibe eden, *Listeria* kolonilerinin muhtemelen 24 saatte belirlendiği bir besiyeri olduğunu ileri srmuşlerdir. *Staphylococcus* spp. (sarı koloniler, hafif siyah hleli), *Bacillus* spp. (siyah koloniler), besiyerinde gelişebilmekte ancak koloni rengi ve şekliyle kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. sonucunda *Listeria* teşhisini çeşitli derecelerde inhibe etmektedir. 5 adet *L. seeligeri* 'den sadece biri Oxford agarda gelişebilmiştir. 194 kültürün 192'si Oxford agarda gelişebilmiş kalan 2'si ise inkübasyon süresi 48 saate uzatılınca pozitif sonuç vermiştir. Sonuçta Oxford Agar Mc Bride Agardan çok daha fazla selektif bir besiyeridir ve *Listeria* 'nın teşhisi bu besiyerinde çok daha kolay olabilmektedir (Curtis *et al.* 1989).

Hemolitik Seftazidim Lityum klorür Agar (HCLA) besiyerinde çok sayıda *L. innocua* arasından az sayıdaki *L. monocytogenes* kolonileri çok rahat ayırt edilebilmiştir. İnkübasyon süresi 35 °C'de 17-24 saattir. Bu besiyerinde LiCl'ün 7,5 g/L kullanılmasının nedeni hemoliz reaksiyonunun daha iyi görülebilmesi ve koloni rengindeki açılmanın önlenmesi isteğidir. LiCl oranı 5 g/L'ye indirildiği zaman refakatçi bakteri gelişimi inhibe edilememektedir. Besiyerinde kullanılan moksalaktam ve akriflavin ile *Bacillus* spp.'nin tamamen inhibisyonu sağlanamamıştır. Seftazidim 20, 30, 40, 50 mg/L oranında denenmiş ancak 20 mg/L oranında, refakatçi bakterileri inhibe etmesi nedeniyle tercih edilmiştir. İki yıl boyunca HCLA besiyeri 500'ün üzerinde deniz ürününün analizinde kullanılmış ve *L. monocytogenes* geri alımında Oxford Agar ile arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Poysky *et al.* 1993).

32 gıda kökenli izolatın MMA ve LPM Agarda *L. monocytogenes* için potansiyel refakatçiliği test edilmiştir. Refakatçi izolatların 6'sı *Enterococcus* spp., 2'si *Staphylococcus* spp. ve biri de *Corynebacterium* sp. olarak tanımlanmıştır. Bu bakteriler *L. monocytogenes* 'in düşük konsantrasyonda (10 kob/10 mL) refakatçi flora olarak test edilmiştir. Sonuçlar laboratuvar ortamında inoküle edilen refakatçi floranın zenginleştirme ortamında 1 kob/10µL varlığının, rekabet için yeterli olmadığını göstermiştir (Dallas *et al.* 1991).

RAPAMY Agar, Ralovich'in Nalidiksik Asit Tripaflavin Agar besiyerinin bir modifikasyonudur. RAPAMY agarda *Listeria* hücrelerinin doğal veya sonradan inoküle edilmiş olarak 1-10 kob/g olduğunda *Enterococcus* spp.'nin aşırı gelişmesiyle *L. monocytogenes* 'in baskılandığı görülmüştür (Van Netten *et al.* 1988). RAPAMY Agar besiyerinde gelişen *Enterococcus* spp.'nin yaklaşık 10³ kadar *L. monocytogenes* 'i geçmesi *L. monocytogenes* 'in teşhisinde kayıplara neden olmuştur. Bu nedenle RAPAMY Agarı geliştiren araştırmacılar besiyeri formülünde değişiklik yaparak ALPAMY Agarı geliştirmişlerdir. Columbia Agar besiyerine 10 mg/L akriflavin, 15 g/L LiCl, 2,5 g/L fenil etanol ilave ederek elde ettikleri ALPAMY Agarı *L. ivanovii* 'nin geri alımında özellikle taze gıdalardaki refakatçi bakteriler tarafından baskılandığı bildirilmiştir. LiCl ve nalidiksik asit kombinasyonunun *L. monocytogenes* 'in pek çok suşunu inhibe ettiği bulunmuş ve nalidiksik asit kullanımını yerine LiCl oranınının 15

g/L'ye çıkarılması tercih edilmiştir. (van Netten *et al.* 1988). Yoğun kontamine gıdalarda *Listeria* türlerinin izolasyon ve sayımı için ALPAMY Agar, RAPAMY Agara göre çok daha iyi sonuçlar vermiştir. Ancak ALPAMY Agar gıdalarda *Listeria* analizinde kullanılamaz çünkü hasarlı *Listeria* hücrelerinin geri alımında yetersizdir.

Oxford Agar besiyerinde *L. monocytogenes* analizi sırasında gelişen refakatçi floranın belirlendiği bir çalışmada 7 izolattan 4'ünün *Bacillus* spp., diğerlerinin ise *Micrococcus sedentarius*, *Micrococcus roseus* ve *Enterococcus* spp. olduğu görülmüştür. Çalışmalar sırasında *Listeria* spp. izole edilmemiştir. Sonuçlar, Oxford Aganın kuvvetli bir selektiviteye sahip olmadığını ve bu nedenle refakatçi florayı yeterince baskılayamadığı için sahte negatif sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir (Koçan vd. 2005).

Yapılan bir çalışmada PALCAM Agarda % 1,04 (2/192) sahte pozitif (*Bacillus* spp. nedeniyle) sonuç alınırken, MOX Agarda % 11,46 (22/192) sahte pozitif (temel olarak *Enterococcus* spp. kaynaklı) sonuç alınmıştır. MOX Agarda sadece koloni morfolojisine göre yapılan değerlendirmede fazla sayıda sahte pozitif sonuç alındığı bildirilmiş, bunun besiyerinde gelişen *Enterococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. gibi refakatçi floranın *Listeria* spp.'den zor ayırt edilmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir. *L. welshimeri* ve *L. ivanovii* PALCAM Agardan daha çok izole edilirken, *L. grayi* ise MOX Agar besiyerinden daha çok izole edilmiştir (Capita *et al.* 2001).

Serotip farkının koloni yapısına olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *L. monocytogenes* 'in 4b serotipinden (hastalıklarla en çok ilişkilendirilen) ve 1/2 a serotipinden (gıdalardan en çok izole edilen) alınarak bir karışım hazırlanmış ve gıda eklenerek ya da gıda eklenmeden FDA/ BAM yöntemiyle analiz yapılmıştır. Sonuçta 112.000'den fazla koloni analize alınmış ve suşların koloni uyumları arasında farklılıklar gözlenmiş ancak bu farklılıkların serotip veya genetik soyla ilgisi kurulamamıştır (Gorski *et al.* 2006). Benzer şekilde başka bir çalışmada seçilmiş çeşitli faktörlerin 4b ve 1/2a serovarları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda 1/2a serovarı 4 °C'de iki antilisterial bakterosine karşı 4b'den daha dayanıklı olduğu ve bunun tersi olarak da 4b serovarının 4 °C'deki depolama sonrası 60°C'deki ısı işleme 1/2a serovarından daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Buna ilaveten soğukta 4

°C'deki depolamadan sonra vücut sıcaklığına 37 °C'ye transferinde 4b serovarının 1/2a serovarından daha kısa lag fazına ve daha yüksek patojeniteye sahip olduğu bildirilmiştir (Buncic *et al.* 2001).

Hipovirüent *L. monocytogenes* suşları virüent suşlardan daha az oranda belirlenebilmektedir. Bütün virüent, hipovirüent ve virüent olmayan *L. monocytogenes* suşlarının % 92'si ALOA Agar besiyerinde saptanabilmiştir. Buna karşın virüent olmayan ve hipovirüent suşlar PALCAM Agar (Polymyxin-Acriflavine-LiCl-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol), Oxford Agar ve Rapid'L.mono besiyerinde 2 günlük inkübasyon sonunda ya hiç saptanamamış ya da çok zayıf olarak saptanabilmiştir. Çalışma sonucunda, inkübasyon süresinin uzatılmasıyla PALCAM besiyerinde saptanamayan suşların oranının % 8'e düştüğü belirlenmiş ve EN-ISO 11290-1 metodunda tavsiye edilen 2 günlük inkübasyon süresinin en az 3 güne çıkarılması gerektiği bildirilmiştir. ALOA Agar besiyeri ile benzer sonuç 2 günde alınmıştır (Garcieux *et al.* 2003).

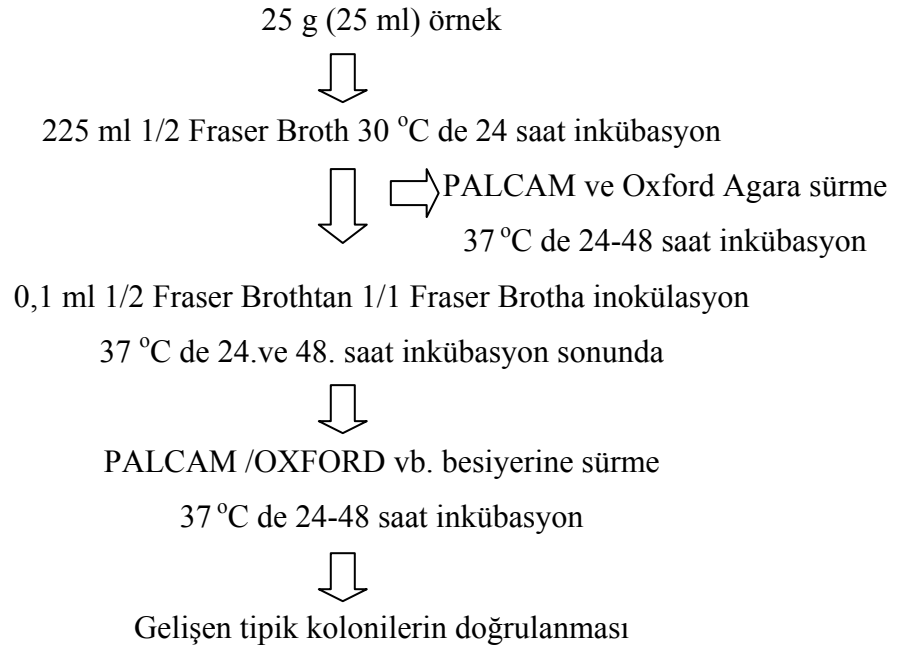
Sıcaklıkla zarar görmüş hücrelerin MOX Agarda inhibe olduğu belirtilerek TAL (thin agar layer) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde Petri kutusundaki MOX üzerine TSA dökülmekte ve hasarlı bakterinin onarımı için imkan tanınmaktadır. Sonuçta bu yöntemin MOX Agara göre hasarlı bakterinin geri alımında önemli bir şekilde daha iyi olduğu ve bu Petri kutularından MOX Agara göre daha yüksek sayıda *L. monocytogenes* elde edildiği belirtilmiştir Ayrıca daha sonraki çalışmalarda aynı Petri kutusunda biri selektif olmayan besiyeri ve 4 farklı selektif katı besiyeri katmanından oluşan 4-TAL sistem geliştirilmiş ve *L. monocytogenes* için MOX agar kullanılmıştır. Sonuçta; sıcaklıkla hasar görmüş patojenlerin 4-TAL sisteminde belirlenmesinde, ayrı ayrı besiyerlerinden teşhislerine göre önemli bir fark görülmemiştir (Kang and Fung 1999, Wu and Fung 2006).

Mossel (1989) kültür ortamının ekonomik olarak kullanımının prensiplerini açıklamış ve Petri kutusunda 21 başarılı hat çizerek inokülasyonun ardışık seyreltilerini yapmayı başarmıştır.

2.8.4 ISO, IDF, USDA, FDA-BAM, AOAC referans metotları

ISO *L. monocytogenes* Arama Yöntemi ISO- 11290-1

Horizontal metot adıyla 1995 yılında yayınlandı. Bu yöntemde *Listeria* 'ların ayrı sıvı besiyerleri içerisinde ön ve selektif nitelikte esas zenginleştirmeleri yapılır. Ön zenginleştirmede; besiyerinde bulunan inhibitör maddelerin olumsuz etkisini azaltmak için, yarı konsantre Fraser Broth (bazal Fraser Broth + yarı konsantre supplement), esas zenginleştirmede konsantre Fraser Broth kullanılır. *L. monocytogenes* analizinde örneğin homojenizasyonu amacıyla kullanılan stomacher gibi cihazların bazı yüksek asitli gıdalarda organik asitlerin bakteriye zarar vermesi ve bakteri inaktivasyonuna neden olması sebebiyle kullanımının uygun olmadığı bildirilmiştir (Han *et al.* 2004). Yöntem, şekil 2.1'de verilmiştir.



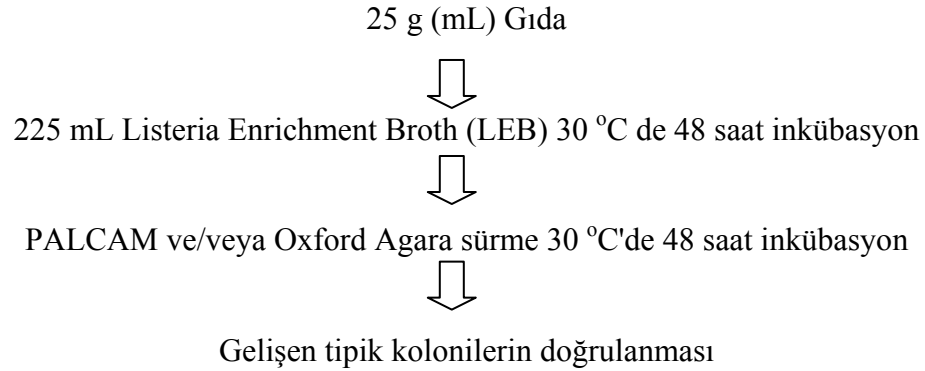
Şekil 2.1 ISO 11290-1 *Listeria* belirleme kültürel metodu

ISO 11290-1 yönteminde 2004 yılında değişiklik yapılarak ALOA agar besiyeri birinci, temel besiyeri olarak kullanılmaya başlanmış ve buna ek olarak başka bir selektif

besiyeri kullanımı yöntemde yer almaktadır. ISO yöntemi bu patojenin belirlenmesi için daha hızlı ve basit bir yöntemdir (Asperger *et al.* 1999, Beumer and Hazeleger 2003, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004, ISO 2004).

IDF *L. monocytogenes* Arama Yöntemi

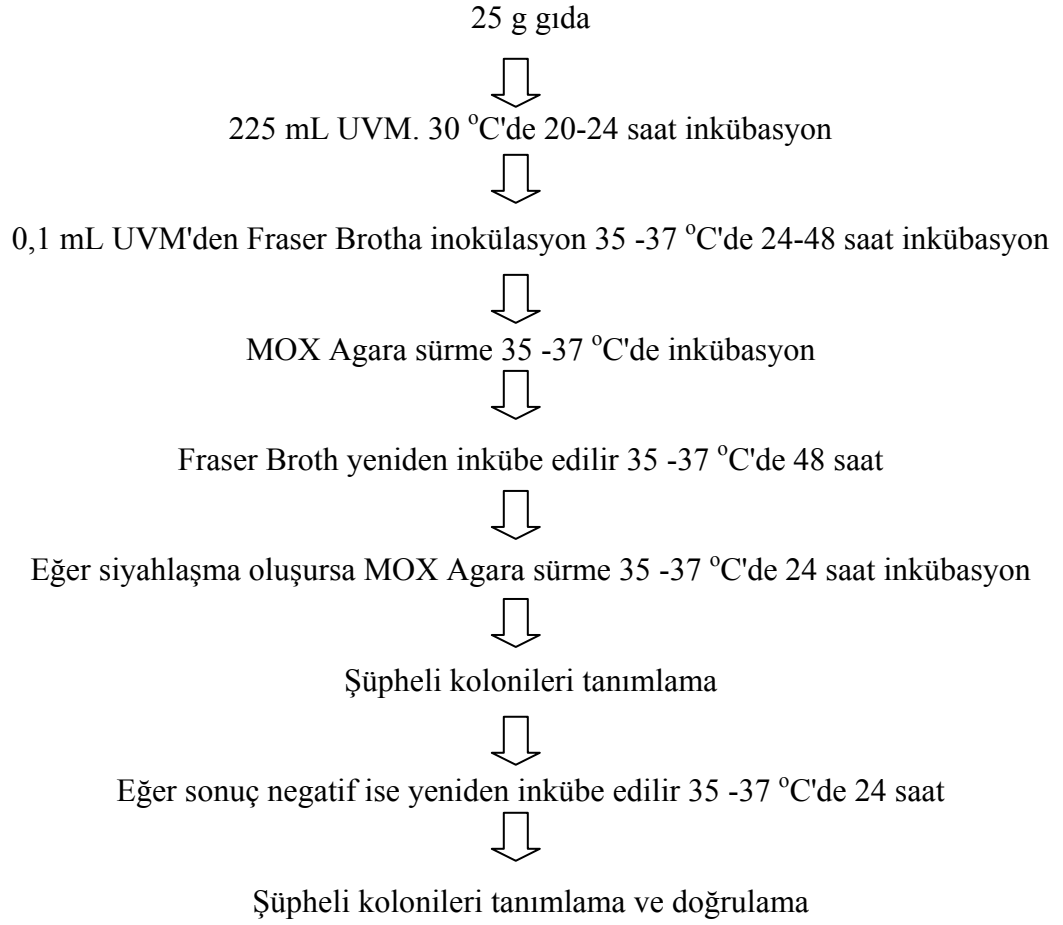
143A standart metot, *Listeria monocytogenes* 'in süt ve süt ürünlerinde belirlenmesi amacıyla 1995'te yayınlanmıştır. Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 IDF *Listeria* belirleme kültürel metodu

USDA *L. monocytogenes* Arama Yöntemi

Bu yöntem McClain and Lee tarafından 1988'de geliştirilmiş ve daha çok et, tavuk eti ve et ürünleri için tavsiye edilmiştir. Yöntem 1988 yılında besiyerine 20 mg Nalidiksik asit katılarak modifiye edilmiştir. USDA yönteminde ön zenginleştirme amacıyla kullanılan UVM I besiyerinde akriflavin oranı 12 mg/L iken selektif zenginleştirme besiyeri olan UVM II'de bu oran 25 mg/L'ye çıkarılmıştır. Daha sonraları USDA metodu değiştirilmiş ve UVM II yerine Fraser Broth kullanımı selektif zenginleştirme besiyeri olarak et ve kanatlı etlerinde tercih edilmiştir (McClain and Lee 1988, Beumer *et al.* 1996, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004). Yöntem, şekil 2.3'de verilmiştir.

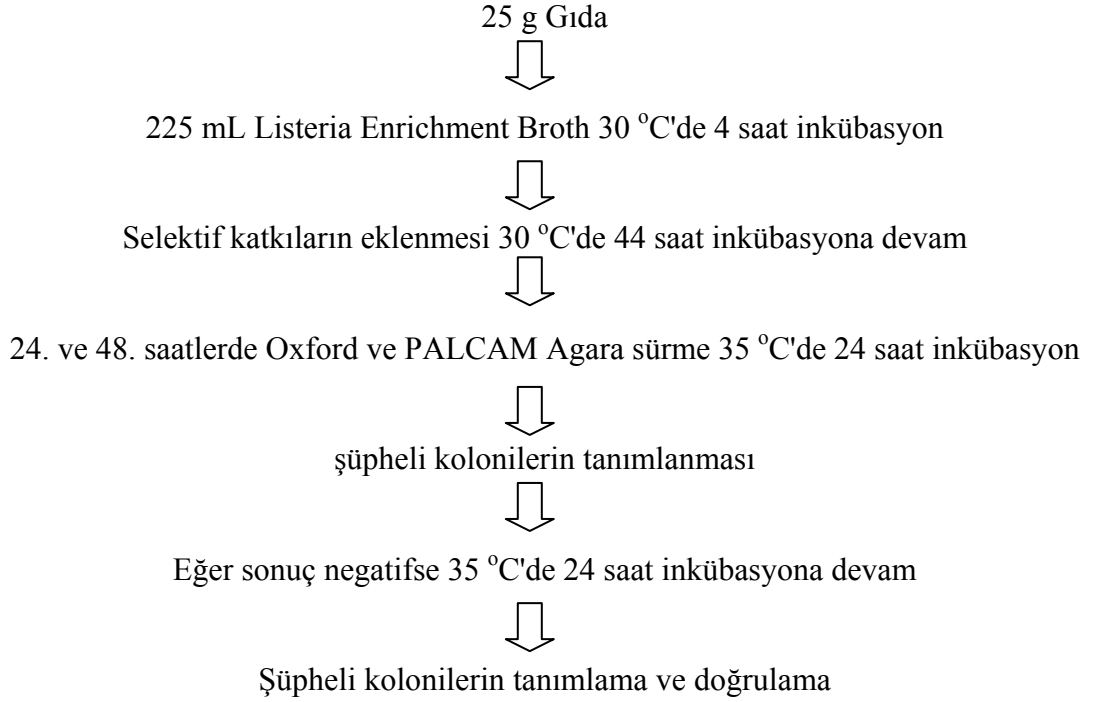


Şekil 2.3 USDA *Listeria* belirleme kültürel metodu Rev. 2 08.11.1999

FDA BAM *L. monocytogenes* Arama Yöntemi

Bu yöntem Lovett *et al.* tarafından 1987'de geliştirilmiş ve daha çok süt ve süt ürünleri için tavsiye edilmiştir. Daha sonra 1995'te Hitchins tarafından yeniden düzenlenmiştir (Smith *et al.* 2001). *Listeria* 'nın zenginleştirilmesi tek bir erlende tek bir zenginleştirme Brothu kullanılarak ancak iki aşamalı olarak yapılır. *Listeria* Enrichment Broth, inhibitör madde (akriflavin, siklohegzimid, nalidiksik asit) katılmadan 4 saat 30 °C de inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda inhibitör maddeler katılarak 30 °C de inkübasyon 44 saat daha devam eder. İzolasyonda selektif agar besiyerleri olarak Oxford Agar, PALCAM Agar, MOX ve ALOA Agar gibi kromojenik besiyerleri kullanılır. Tipik koloniler identifikasyon testlerinde kullanılır (Beumer *et al.* 1996, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004). FDA yönteminde *Listeria* zenginleştirme besiyerininin 15 mg/L akriflavin içermesi tavsiye edilmiştir (Beumer *et al.* 1996).

Yöntem, şekil 2.4'de verilmiştir.

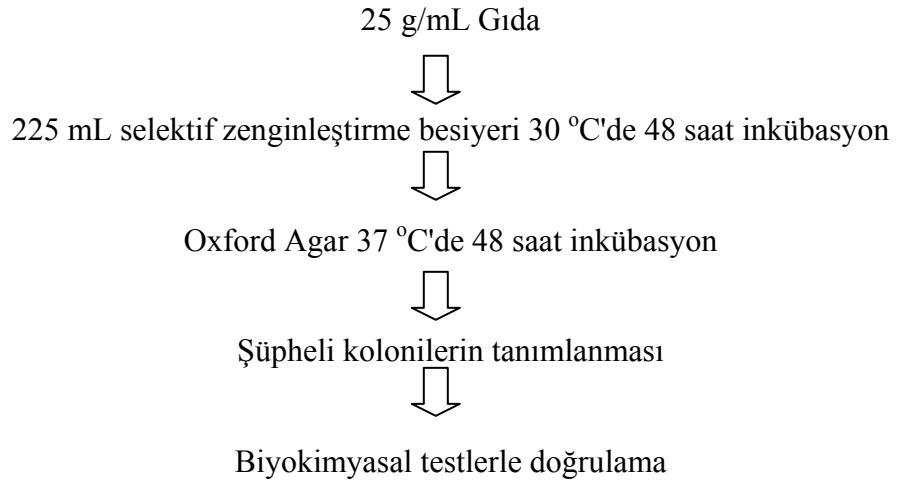


Şekil 2.4 FDA-BAM *Listeria* belirleme metodu- 8. versiyon (Hughes *et al.* 2003)

AOAC *L. monocytogenes* Arama Yöntemi

IDF 143A yöntemi adapte edilmiştir. Twedt ve Hitchins 1994 yılında yayınlamıştır.

Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5 AOAC Metot 993.12 Süt ve süt ürünleri (Hughes *et al.* 2003)

2.8.5 Kromojenik besiyeleri

Son yıllardaki çalışmalarda en doğru sonucu, en hızlı veren ve en ekonomik olan besiyeri arayışına gidilmiş ve patojenik *Listeria* spp. için selektif ve kromojenik besiyeleri geliştirilmiştir. Bu besiyelerinin avantajları, virülens faktör göstergesi olan fosfatidilinositol- fosfolipaz C (PI-PLC) ve daha az kullanılan fosfatidilkolin- fosfolipaz C substratlarının ayırımından yararlanarak patojenik *Listeria* spp.'nin direkt belirlenmesi ve sayımıdır. Bu gibi besiyeleri iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grup besiyerinde ayırım PI-PLC'nin L- α - fosfatidilinositol ile koloni etrafında beyaz bir presipitat zon oluşturması ve β - D- glukozidaz aktivitesinin belirlenmesi için kromojenik bir substrat olan 5-brom-4-klor-3-indoksil- β -D-glukopiranozit'in kombine kullanımıyla mümkün olmaktadır. ALOA, CHROMagar, OCLA vb. besiyeleri birinci grupta yer almakta ve tüm *Listeria* spp. bu besiyelerinde turkuaz-mavi renkte koloniler oluşturmaktadır (Jinneman 2003, Reissbrodt 2004).

İkinci grup besiyelerinde ise, 5-brom-4-klor-3-indoksil-myoinositol-1-fosfat kullanılmakta ve patojen *Listeria* spp. kolonileri turkuaz-mavi renkte koloniler oluştururken, patojen olmayan *Listeria* spp. ise beyaz renkte koloniler oluşturmaktadır. BCM *Listeria monocytogenes* besiyeri, Rapid'L.mono ve LIMONO-Ident-Agar bu grupta yer almaktadır. Rapid'L.mono besiyerinde ise ksiloz fermantasyonuna bağlı olarak *L. monocytogenes* etrafı hâlesiz, mavi koloniler oluştururken *L. ivanovii* etrafında sarı hâleler olan mavi koloniler oluşturmaktadır. Diğer *Listeria* türleri ise fosfatidil inositol fosfolipaz C aktiviteleri olmadığı için beyaz renkte koloni ve ksiloz fermantasyonuna bağlı olarak sarı hâleler oluştururlar (Manafi 2000). PI-PLC aktivitesi *Listeria* spp.'den sadece *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* de görülmektedir. Bu besiyelerinde selektiviteyi sağlamak için LiCl, nalidiksik asit ve/ veya siklohegzimid kullanılmıştır (Manafi 2000, Jinneman 2003, Gracieux *et al.* 2003, Beumer and Hazeleger 2003, Reissbrodt 2004, Gasanov *et al.* 2005). BCM besiyerinde florojenik substrat olarak 4-metilumbelliferil-miyo-inositol-1-fosfat içermekte ve patojenik *Listeria* türleri (*L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*) 24 saat sonunda bu besiyerinde turkuaz renginde konveks koloniler oluşturarak belirlenmektedir. Besiyeri bileşiminde bulunan ramnoz sayesinde de *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* birbirinden ayırt

edilebilmektedir. PI-PLC aktivitesi *Listeria spp.* ile sınırlı değildir aynı zamanda *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *S. aureus* ve *Clostridium novyi* tarafından da muhtemel farklı enzimatik özellikleriyle aktive göstermektedir.

Listeria türlerinin patojenitelerinin belirlenmesi için kullanılan fosfolipaz C veya lesitinaz önemli potansiyel virülens faktörlerdendir. Bazı suşların agarlı besiyerinde lesitinaz aktivitelerini belirlemek zordur. *L. monocytogenes* 'in virülens faktörlerini belirlemek için, aktive edilmiş odun kömürü bulunan Egg-Yolk Agar (CEYM) kullanılmış ve bu besiyerinde lesitinaz aktivitesinin çok net görüldüğü, *L. monocytogenes* 'in *L. ivanovii* 'den çok kolaylıkla ayırt edilebildiği bildirilmiştir (Erdenlig *et al.* 2000, Ermolaeva *et al.* 2003). *L. monocytogenes* fosfatidilinositol-spesifik fosfolipaz C'yi de (PIPLC) içeren birkaç virülens faktör içermektedir. Yeni bir florojenik substrat olan metil-FLIP, enzim kinetiği uygulamalarında kullanılmıştır (Ryan *et al.* 2002).

Oxford Agar, ALOA Agar, Rapid'L.mono Agar besiyerleri 170 gıda örneğinde *Listeria* analizinde karşılaştırılmış ve Rapid'L.mono Agar besiyerinin diğer iki besiyerinden önemli bir şekilde daha zayıf olduğu bulunmuştur (Greenwood *et al.* 2005).

Rapid'L.Mono Agar besiyeri, karışık salata, Brie peyniri, surimi ve işlenmiş hindi etinden *L. monocytogenes* analizinde kullanılmış ve besiyerinin duyarlılığı % 99,4 ve selektivitesi ise % 100 olarak belirlenmiştir. Bu besiyeriyle zenginleştirme işlemi standart yöntemlere göre 24 saat daha kısalmaktadır (Lauer *et al.* 2005).

BCM agarın Oxford ve PALCAM Agarla karşılaştırıldığı bir çalışmada BCM-OXF ve BCM-PAL'in OXF- PAL'den veya üçünden herhangi birinin tek başına kullanılmasından daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir BCM besiyerinde bazı *Bacillus* türleri turkuaz mavi koloniler vermiş ancak bu koloniler 3-4 mm'den daha büyük ve pürüzlü (rough) yapıda olmasıyla *L. monocytogenes* 'ten ayırt edilmiştir (Jineman *et al.* 2003). Başka bir çalışmada ise BCM besiyerinde sahte pozitif sonuca neden olan mikroorganizmalar (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *B. thuringiensis* ve

mayalar) gelişmemiştir (Restaino *et al.* 1999). BCM ile yapılan bir çalışmada BCM'nin duyarlılığı % 85,7 spesifikliğı ise % 100 bulunmuştur (Manafı 2000).

ALOA Agarı geliştiren araştırmacılar *L. monocytogenes* serovarlarının bütün stres koşullarındaki kültürlerini denemişler ve besiyerinde etrafında opak hâleler olan mavi koloniler verdiği ve ayırt edici opak hâle verme oranının en az 0,95 olduğu bildirilmiştir. Besiyerinde patojen olmayan *Listeria* türleri ve bazı *Enterococcus* ve *Staphylococcus* türleri mavi koloni vermekte ancak opak hâle oluşturmamaktadır. Bazı *Bacillus cereus* suşları *L. ivanovii* kolonilerine benzer koloni vermekte ve bu durum yanıltıcı olabilmektedir. Ancak sadece bazı tanımlanamayan *Listeria* benzeri bakteri sahte pozitif sonuç vermiştir. ALOA Agarda doğal kontamine süt ve et ürünlerinde ISO yöntemi kullanılıp şüpheli kolonilerde Genprob ve VIDAS kullanılmasına göre % 4,3 daha fazla pozitif sonuç belirlenmiştir. ALOA Agar ile %13,9 sahte negatif sonuç alınırken PALCAM/ Oxford Agar kullanıldığında % 38,9 sahte negatif sonuç alınmıştır. *L. monocytogenes* ve *L. innocua* denmelerinde ALOA Agarın çok daha iyi bir besiyeri olduğu görülmüştür (Vlaemynck *et al.* 2000).

CHROM Agar besiyeri, PALCAM ve Oxford Agar ile karşılaştırılmış ve *L. monocytogenes* analizi standart Fransız metodu (AFNOR V 08-055) ile yapılmıştır. Sonuçta kromojenik besiyeri diğer iki besiyerinden önemli bir şekilde daha selektiftir bulunmuş ve şüpheli kolonilerin % 87,5'u CHROM agar belirlenmiştir (El Marrakchi *et al.* 2005).

Modifiye Oxford agar besiyerine eskulin yerine 3,4 siklohegzanoeskultin- β -D glusit eklenmiş ve besiyeri bileşiminde bazı değişiklikler yapılarak Harlequin Agar besiyeri geliştirilmiştir. Harlequin Agarda kullanılan β -D glikozit derivatı (CHE glikozit) hidrolize olduğunda CHE maddesi demir iyonlarıyla kompleks yapar ve besiyerinde çözünmeyen siyah bir presipitat oluşturur. Bu besiyerinin üstünlüğü *Listeria* kolonilerinin kuvvetli siyah renk alması ve oluşan bu siyah rengin yayılmamasıdır. Bu besiyeriyle % 34 daha fazla *Listeria* saptanmış ve analiz süresi 1 gün kısalmıştır. (Smith *et al.* 2001).

Atipik koloni morfolojisinin Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono ve ALOA Agarda belirlendiği bir çalışmada 176 suştan 4 suş düşük geri alım ve /veya atipik koloni morfolojisi göstermiştir. Bu sonuçlar besiyelerinin kombine kullanımlarının yararını göstermektedir. Peynirden izole edilmiş 1/2a serovarında olan hassas bir suş Oxford Agarda (% <0,1) ve PALCAM Agarda (% 32) 48 saatte düşük geri alım göstermiştir. Başka bir suş ise Oxford ve Rapid'L. mono (% <0,1) besiyelerinde düşük koloni yoğunluğu gösterirken ALOA (% 8) ve PALCAM Agarda (% 0,3) düşük geri alım oranı elde edilmiştir. İnsandan izole edilen hassas bir suşun geri alımı ise PALCAM Agarda 48 saatte (% <0,1) koloni yoğunluğu düşük ve Rapid'L. mono (%11), ALOA (% 20) ve Oxford Agarda (% 27) olarak bulunmuştur (Leclercq 2004).

2.8.6. Hızlı test yöntemleri

Geleneksel kültür metotlarıyla *L. monocytogenes* 'in gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu oldukça zaman alıcıdır ve bunun için yaklaşık 4-6 gün gerekmektedir. *Listeria* spp.'nin belirlenmesi günümüzde immunolojik yöntemlere dayalı geliştirilen test kitleriyle de yapılmaktadır. Bütün yöntemler bir veya ardışık iki zenginleştirme evresinin ardından uygulanırlar. Son zamanlarda çalışmalarda AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ve AFNOR (Association Française de Normalisation Tour Europe) tarafından onaylı 43 saatte sonuç veren hızlı analiz testi "Oxoid Listeria Rapid Test" (FT 401M) veya "Merck Singlepath" kullanılmaktadır. "Merck Singlepath" 25 g (mL) gıda örneğinde *L. monocytogenes* 'in yarı selektif besiyerinde ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme aşamasından sonra kit ile hızlı analizidir. Pozitif sonuç alındığında doğrulama için katı besiyerine sürme yapılarak analize standart şekilde devam edilmekte ancak negatif sonuçta ise analiz sona erdirilmektedir. (<http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004, Doğan 2000).

Son zamanlarda optik yoğunluk (OD) ile sayım sonuçları kob/mL arasındaki ilişkinin çevre koşullarından (sıcaklık, pH ve a_w gibi) etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca OD ile canlı hücre sayısı arasında iyi bir kalibrasyon için gelişim parametrelerinin iyi

hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla model gelişimi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Francois *et al.* 2005, 2006).

Listeria türlerinin klasik yöntemler, DL-alanin β -naftilamit (DLABN) ve API hızlı test kiti ile identifikasyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, klasik yöntemlerle % 99 DLABN hidrolizi testi ve API test kiti ile de % 97 oranında doğru tanımlama yapılmıştır. klasik yöntemlerle sadece 4 adet *L. monocytogenes*, *L. innocua* olarak yanlış tanımlanmış, DLABN de 14 *L. ivanovii* izolatının 6'sı atipik sonuç vermiş ve API test kiti ile de 9 izolat (6'sı *L. monocytogenes* ve 3'ü *L. innocua*) yanlış tanımlanmıştır (McLauchlin 1997). API *Listeria* kitinde CAMP testi yer almadığından *L. monocytogenes* ile *L. innocua*'nın ayırımında arilamidaz enzimi (DIM reaksiyonu) kullanılmaktadır. Arilamidaz enzimi *L. monocytogenes* 'te bulunmamakta ancak diğer *Listeria* türlerinde bulunmaktadır. Bu test sayesinde 646 suşun % 85'i 18-24 saat içinde tanımlanmıştır. Bu testin tek zorluğu portakal-sarı pozitif reaksiyon ile portakal-kırmızı negatif reaksiyon arasındaki farkın bazen karıştırılmasıdır (Farber 1993, Partis *et al.* 1994, Allerberger 2003).

Accuprobe test gen sondaları 30-45 dakikada sonuç vermektedir ancak, bu test ile tanımlama yapılamamakta sadece *Listeria var/* yok tayini yapılmaktadır. *Listeria* suşlarının tamamını Accuprobe tanımlama testiyle belirlemek için hücre konsantrasyonunun yaklaşık 10^7 kob/mL olması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda UVM ve Fraser Broth besiyerlerinin yüksek konsantrasyonda tuz içermelerinden dolayı sahte negatif sonuçlar alınmıştır. Besiyeri bileşiminde bulunan eskulin ve akriflavin HCl'nin sinyalde azalmaya neden olduğu bulunmuştur ancak bu etki tuzun etkisinin yanında önemsiz kalmıştır (Farber 1993, Partis *et al.* 1994, Teo *et al.* 2001).

Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) hızlı tanımlama kitiyle yürütülen bir çalışmada 52 saat inkübasyon sonunda yöntemin duyarlılığı % 98,1 ve spesifikliğı % 97,0 ve etkinliğı % 97,5 olarak bulunmuştur (Sewell *et al.* 2003). *L. monocytogenes* 'in çiğ süttten belirlenmesinde floresan ile işaretlenmiş bakteri popülasyonunun Flow Sitometrik yöntemle (FCM) analizi yapılmış ve refakatçi floranın yoğun olduğu örnekte avantaj sağlanmıştır (Donnelly and Baigent 1986). *Listeria* spp.'nin tanımlanmasında

kullanılan PCR-sıcaklık gradient jel elektroforezi analizi ile geleneksel tanımlama arasında fark olmadığı belirlenmiştir (Manzano *et al.* 2000). Ayrıca 5' nükleaz revers transkriptaz (RT) yöntemi de anaerobik zenginleştirme sistemiyle birlikte kullanılmış ve sıcaklıkla hasar görmüş hücreler PSU Broth besiyerinde 37 °C'de 48 saat inkübasyon ve RT kombinasyonu ile daha kısa sürede belirlenmiştir (Boyapalle *et al.* <http://www.ipic.iastate.edu/reports/02swinereports/asl-1815.pdf>, 2005). ISO-GRID filtre yöntemi kullanıldığında *L. monocytogenes* 'in geri alımı çiğ ve pastörize süt, fermente sosis, karides, sosisli sandviçte önemli bir şekilde artmıştır. Ayrıca *L. monocytogenes* 'in geri alımı refakatçi aerobik floranın varlığından etkilenmemiştir (Entis and Lerner 2000).

Son yıllarda DNA - RNA arttırıcısına (amplification-hücre canlılığının hassas bir göstergesi) dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR- Polymerase Chain Reaction) yöntemi kullanılmaktadır. PCR yöntemi geleceğin hızlı teşhis yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Nükleik asit ekstraksiyonundan önce iki aşamalı zenginleştirme işlemi, istenen teşhis limitlerine ulaşılabilmesi ve PCR analizinin klasik teşhis yöntemlerine eşit duyarlılıkta olabilmesi için gereklidir. Bu şart, hem DNA bazlı hem de RNA bazlı prosedürler için geçerlidir. PCR çeşitleri içinde Real-time tavsiye edilmektedir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri; düşük sayıda *L. monocytogenes* ve örnekte yüksek sayıda refakatçi bakteri olduğu zaman bile teşhisin bundan etkilenmemesidir. Ayrıca bu yöntemle çeşitli örneklerden az seviyede bulunan *L. monocytogenes* bile belirlenebilmektedir ((Norton 2002, Beumer and Hazeleger 2003, Burtscher and Wuertz 2003).

L. monocytogenes 'in çiğ etten PCR ile belirlenmesinde tek aşamalı zenginleştirme yönteminde 10¹ kob/g *L. monocytogenes* inoküle edilen örnekte bile 24 saat inkübasyon sonunda modifiye UVM Broth besiyerinde pozitif sonuç alınmıştır. Fraser Broth kullanıldığında ancak 10³ kob/g *L. monocytogenes* inoküle edildiği zaman 48 saat inkübasyon sonunda pozitif sonuç alınabilmiştir. PALCAM Broth, PCR'da daima negatif sonuç vermiştir. Amonyum Fe(III) sitrat oranının yüksek oluşunun PCR için inhibitör etki yaptığı düşünülmüştür (Balamurugan *et al.* 2006). 266 süt ürününün PCR ile yapılan analiz sonuçlarında analiz işleminin 24 saatte tamamlandığı ve yöntemin % 95,2 duyarlılığa, % 96,7 spesifikliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Cox *et al.* 1998).

Çeşitli gıdalardan (et, çiğ tavuk ve taze gıda) izole edilen *L. monocytogenes* 'in PCR ile serogrup tanımlama, Pulsed-Field Gel Electrophoresis ile genotiplendirme (PFGE) ve antimikrobiyel duyarlılık testiyle özellikleri belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2007). Geçen 5 yılda *L. monocytogenes* için DNA-bazlı tiplendirme yönteminin gelişmesinde büyük ilerlemeler olmuştur. PFGE ve ribotiplendirme günümüzde yaygın olarak kullanılmasına rağmen DNA sekans bazlı yöntemler geliştirilmiş ve pek çok uygulamada tercih edilen bir yöntem olmuştur (Ryser *et al.* 1996, Wiedmann 2002).

İmmunomanyetik ayırma (IMS), 1990'lı yılların başında geliştirilmiş bir yöntemdir. Yöntemin prensibi manyetik taşıyıcılar üzerine tutuklanmış antikorların hedef mikroorganizma hücrelerini tutabilmeleridir. Özgül monoklonal veya poliklonal antikorlar ya da lektinler ve agglutininer hedef hücreleri bağlamak için kullanılmaktadır (Doğan 2000).

Karşılaştırmalı bir çalışmada ELISA ile pozitif örneklerin % 68'i, GENE-TRAK DNA probu ile % 45'i, FDA ile % 75'i ve FDA prob yöntemiyle de % 86'sı belirlenmiştir. Çalışmada ELISA tekniğinde 22 sahte pozitif, GENE-TRAK DNA probu ile 14 sahte negatif sonuç alınmıştır (Lee and Mc Clain 1986, Heisick *et al.* 1989b).

Listeria 'nın çevre örneklerinden belirlenmesinde yeni, hızlı bir yöntem üzerinde çalışılmış ve yarı sıvı bir tabakada BioSYS aracıyla sonuçlar otomatik görüntülenmiştir. Svapta 1-10 kob/svap bakteri olması halinde bile 22 saatten daha kısa sürede sonuç alınmıştır. Toplam analiz süresi 22 saattir (Firstenberg-Eden and Shelef 2000). Ayrıca kanatlı ve domuz eti işleyen ünitelerde *L. monocytogenes* 'e karşı fizikokimyasal risk faktörleri çıkarılmış ve bu faktörlerin *L. monocytogenes* 'in yüzey kolonizasyonunu etkilediği bildirilmiştir (Chasseignaux *et al.* 2002).

26 laboratuvarın katıldığı ortak bir çalışmada VIDAS ile klasik kültürel yöntem arasında istatistik açıdan bir fark olmadığı bulunmuştur (Silbernagel *et al.* 2004). *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde standart ISO yöntemi, mini-VIDAS ve PCR yöntemleri 225 gıda da karşılaştırılmış standart yöntemde 22, mini-VIDAS'ta 23 ve

PCR yönteminde 60 pozitif sonuç alınmış ve gıda da *L. monocytogenes* analizinde PCR yöntemi tavsiye edilmiştir (Aznar and Solis 2006).

TECRA (*Listeria* visual immunoassay- LIS-VIS kit) ve BCM besiyeriyle karşılaştırıldığı çalışmada her iki yöntem ile benzer sonuçlar alınmıştır (Istafanos and James 2002). TECRA için yüksek derecede toksik bir antifungal olan siklohegzimid maddesini içermeyen, farklı bir zenginleştirme besiyeri geliştirilmiş ve 30 laboratuvarın katıldığı çalışmada referans metot olan AOAC 993.12 ile TECRA arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (Hughes *et al.* 2003).

Son zamanlarda kullanılan *Listeria* hızlı görüntüleme metotları şunlardır;

- AOAC Metot 993.09.2000. Süt ürünlerinde, deniz ürünlerinde ve etlerde *Listeria*. Kolorimetrik DNA hibridizasyon metodu (GENE-TRAK *Listeria* Assay- Neogen).
- AOAC Metot 994.03.2000. Süt ürünlerinde, deniz ürünlerinde ve etlerde *Listeria monocytogenes*. Kolorimetrik monoclonal enziyme-linked immunosorbent assay metot (*Listeria*-Tek ELISA assay).
- AOAC Metot 995.22.2000. Gıdalarda *Listeria*. Kolorimetrik poliklonal enzim immunoassay metot (TECRA *Listeria* visual immunoassay [TLVIA]).
- AOAC Metot 996.14.2000. Assurance (poliklonal enzim immunoassay metot)
- AOAC Metot 996.06.2000. Enzime bağlı immunofluorescent assay (ELFA) VIDAS LIS assay screening metot (bioMerieux) (Hitchins 2003).

2.8.7 *Listeria monocytogenes* 'in belirlenmesindeki problemler

Gıdalarda *Listeria* aranması veya sayılması üzerinde pek çok çalışmalar yapılmasına karşın *Listeria* halen gıda mikrobiyolojisinde en zor belirlenen bakteriler arasındadır. Bunun nedeni *Listeria* 'nın gıdalarda çoğu kez az sayıda olmasına karşın çok sayıda refakatçi bakteri ile birlikte olmasıdır. *L. monocytogenes* selektif katı besiyerlerinde küçük koloniler oluştururken, gelişmesi engellenemeyen refakatçi bakteriler (*Bacillus* spp. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. vb.) bu küçük kolonileri örtecek şekilde büyük koloni meydana getirmekte ve sıklıkla sahte negatif

bazen de sahte pozitif sonuçlar alınmaktadır. Bu yüzden besiyeri bileşimindeki inhibitör maddelerin çeşitleri, etki spektrumları ve kullanım oranları çok önemli olmakta ve *L. monocytogenes* 'in gelişimine olan etkisinin bilinmesi gerekmektedir (Beumer *et al.* 1996, Johansson *et al.* 2000, Capita *et al.* 2001).

Test materyalinde çok sayıda *L. innocua* olması halinde tüm gıda çeşitlerinde sahte negatif sonuçlar alınmaktadır. *L. innocua* selektif ön zenginleştirme aşamasında *L. monocytogenes* 'i baskılama eğilimindedir. Bunun için katı besiyerinde az sayıdaki *L. monocytogenes* kolonileri *L. innocua* tarafından baskılanmaktadır (Scotter *et al.* 2001). Bakteri sayısının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda *L. innocua* 'nın özellikle selektif olmayan Brain-Heart Infusion Broth (BHIB) besiyerinde *L. monocytogenes* 'ten daha hızlı gelişebildiği gösterilmiştir. UVM besiyerinde *L. innocua*, *L. monocytogenes* 'ten 1 log birim, Fraser Broth besiyerinde ise 1,9 log birim daha yüksek bir sayıya ulaşmıştır. Benzer sonuçlar çiğ inek sütünden izole edilen suşların LEB'taki gelişmesinde de elde edilmiştir (Beumer *et al.* 1996, Pinto *et al.* 2001).

Gram boyanmış *Listeria* 'nın mikroskopik görünümü kültür koşullarına göre değişebilir. Katı besiyerinde üremiş kolonilerden alınan hücreler, streptokoklara veya kokobasillere benzer şekilde kok gibi görünebilir. Sıvı besiyerinde ise daha uzun, çomak şeklindedir. *Listeria*; *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* ve *Kurthia* cinsleriyle kolayca karıştırılabilmektedir. Kokobasil formundaki *Listeria* cinsleri, streptokoklarla da kolayca karıştırılabilmekle birlikte, Gram boyamadaki morfolojisi, hareketi, katalaz pozitif olması ve eskulini hidrolize etmesiyle ayrılırken; *Enterococcus* 'dan yine Gram boyamadaki morfolojisi, hareketi ve katalaz pozitifliği ile ayrılır. *Erysipelothrix*, *Listeria* 'dan katalaz ve hareket negatif olmasıyla ayrılır. Çoğu *Lactobacillus* türleri hareketsiz ve katalaz negatif; *Kurthia* türleri mutlak aerob, oksidaz pozitif, eskulin negatif ve glikozdan asit üretmez. *Brochothrix* ise 35 °C'de gelişme yeteneğine sahip değildir ve sodyum hippuratu hidrolize edemez (Holt *et al.* 1994).

L. monocytogenes 54 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda, dondurma işleminde ve diğer çeşitli uygulamalarda hasar görmüş olarak canlılığını sürdürebilir. -18 °C'da dondurma ile ardışık donma ve çözündürme uygulamasında az hasar görür. Selektif olmayan

besiyerlerinde bu hücreler kendilerini onararak normal gelişmelerini sürdürebilirler. Bununla beraber, selektif besiyerlerinde selektif inhibitörler hücrelerin kendilerini onararak normal gelişme sürecine girmelerine izin vermeyebilir. Bu nedenle *L. monocytogenes* 'i öldürmeyecek ancak sadece zarar verecek düzeyde işlem görmüş gıdalarda *L. monocytogenes* sayımında farklı besiyerlerinde selektif inhibitörlerin çeşidi ve/ veya konsantrasyonuna bağlı olarak kabul edilebilir limitlerin çok üzerinde farklı sayım sonuçları alınabilmektedir (Doğan 2000).

Eskulin-Demir amonyum sitrat indikatör sistemin % 12 sahte pozitif sonuç verdiği bilinmektedir. Ayrıca sahte negatif sonuç da vermektedir (Asperger *et al.* 1999). *Listeria* spp. eskulini β -D-glukosidaz enzimi ile eskuletin ve glikoza parçalar. Eskuletin demir (III) sitrat ile zeytin yeşili-siyah renk veren kompleks yapar (King *et al.* 2003). Bu özellik tüm *Listeria* spp. için geçerli olduğu gibi *Bacillus* spp. gibi refakatçi flora için de geçerli olduğundan *Listeria monocytogenes* 'in bu indikatörle teşhisinde zorluk yaşanmaktadır. Araştırmacılar Fraser Broth besiyerinde eskulin-Fe III tuz sisteminin indikatör fonksiyonunun gereksiz olduğunu belirtmişlerdir (Asperger *et al.* 1999).

Pastörize sütte *L. monocytogenes* 'in belirlenmesinde, özellikle *Enterococcus* ve *Lactobacillus* gibi termodurik mikroorganizmaların gelişmesi ve sıcaklığa dayanıklı bakteri sporlarının varlığı karışıklığa sebep olmakta, sahte pozitif ve sahte negatif sonuçlara neden olmaktadır (Teo and Knabel 2000).

Yapılan bir çalışmada *Enterococcus faecium* farklı oranlarda *L. monocytogenes* ile birlikte inkübe edilmiş ve FDA, ISO yöntemleriyle *L. monocytogenes* analizi yapılmıştır. FDA yönteminde $2,2 \times 10^6$ kob bakteri geri alınabilmiş, ISO yönteminde ise $0,8 \times 10^6$ kob geri alınmıştır. *E. faecium* / *L. monocytogenes* oranı yüksek olduğu zaman zenginleştirme aşaması sonucunda *L. monocytogenes* 'in çok küçük koloniler oluşturduğu ve agar besiyerinde diğer kolonilerin arasına gömülerek fark edilemediği bildirilmiştir (Hitchins and Duvall 2000).

Metotlarda yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı, selektif katkıların kombinasyonlarının ve ELISA veya DNA problemlerinin kullanılmasıyla izolasyon için gerekli zamanı

kısaltmıştır. Ancak tüm işlem hala uzun sürmektedir. Çünkü az sayıda mikroorganizma içeren gıdalarda sayı en az 10^5 kob/mL seviyesine ulaştığında belirlenebilmektedir. Gıdalarda *L. monocytogenes* olması istenmediği için ön zenginleştirme işleminin verimliliğini artırmak amacıyla daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Beumer *et al.* 1996).

Araştırmalarda, doğal olarak kontamine kaynaklardan patojenin izolasyonunun yapay olarak kontamine gıdadan daha zor olduğu belirtilmiştir (Doyle 1986).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada çiğ süt ve süt ürünleri, dana eti, tavuk eti, balık ve deniz ürünleri, sebze, şarküteri ürünleri ve tüketime hazır gıdalardan oluşan toplam 80 adet gıdadan ISO 11290-1 metoduna göre *Listeria monocytogenes* analizi yapılmış ve PALCAM Agarda üreyen bütün mikroorganizmalar izole edilip tanımlanmıştır. Tanımlanan bu mikroorganizmalar çalışmanın bundan sonraki aşamalarında materyal olarak kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de örnek çeşidi, adedi ve bakterilerin örnek çeşidine göre dağılımları yer almaktadır. Denemelerde kullanılan gıdalar daha çok Ankara ve çevresindeki market ve pazarlardan temin edilmekle birlikte özellikle çiğ süt numuneleri Acıgöl, Avanoz ve Seydiköy- Atatürk Orman Çiftliği'nden, Aydınca, Zile, Kazova, Ceylanpınar, Saray, Uygur, Niksar, Günevi- Dimes'den temin edilmiştir. Ayrıca çiğ süt numunelerinin bir kısmı da Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümünden, taze kaşar peyniri, tavuk sosis ve ızgara sucuk örneklerinin birer adedi de Antalya'dan ve midye örneği de Bodrum'dan temin edilmiştir.

Çalışma sırasında izole edilen 107 mikroorganizmanın 14'ü *L. monocytogenes*, 13'ü *L. innocua*, 9'u *L. welshimeri*, 4'ü *L. seeligeri* 1'i *L. grayi*, 26'sı *Bacillus* spp., 11'i *Enterococcus* spp., 9'u *Staphylococcus* spp., 2'si *Lactobacillus* spp. ve 7'si de maya olarak tanımlanmıştır. Geri kalan 11 izolat Gram pozitif çubuk bakteri olarak belirlenmiş ancak tanımlanamamıştır. Bulunan *Enterococcus* spp.'nin 7'si *E. faecalis*, 2'si *E. casseliflavus*, 1'i *E. faecium* ve 1'i de *E. solitarius* olarak tanımlanmıştır. Çalışma sırasında 1/2 Fraser Brothtan PALCAM Agara geçildiğinde gelişebilen ancak 1/1 Fraser Brothun 24. saat ve/ veya 48. saat inkübasyonundan sonra PALCAM Agara geçildiğinde gelişemeyen bakteriler olduğu görülmüştür. Bu özellikte 41 adet bakteri bulunmakta olup bu bakteriler daha çok *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakterilerden oluşmaktadır. 107 izolatin 66'sı 1/1 Fraser Brothun 48. saat inkübasyonu sonunda bile gelişme göstermektedir. Tanımlanan 107 refakatçi mikroorganizmanın içinden *L. monocytogenes* analizinin son aşaması olan 1/1 Fraser Broth besiyerinden 48. saat

inkübasyon sonunda PALCAM Agara sürme yapıldığında gelişen 66 mikroorganizma seçilmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında materyal olarak kullanılmıştır. Bu 66 mikroorganizma aşağıdaki gibidir.

<i>L. monocytogenes</i>	14 adet	<i>Bacillus spp.</i>	11 adet
<i>L. innocua</i>	13 adet	<i>Enterococcus faecalis</i>	6 adet
<i>L. welshimeri</i>	9 adet	<i>Staphylococcus spp.</i>	3 adet
<i>L. seeligeri</i>	4 adet	Maya	4 adet
<i>L. grayi</i>	1 adet	Gram pozitif Çubuk Bakteri	1 adet

Denemelerde şahit bakteri olarak 4 adet *Listeria monocytogenes* bakterisi kullanılmıştır. Bunlardan biri *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, diğeri Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonundan temin edilen RSKK NO 02028 numaralı yerel suş ve Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünden temin edilen 1505-Viyana ve 1483 kod numaralı 2 bakteridir.

Çalışmanın sonunda kurulan sistemin ISO 11290-1 yöntemiyle karşılaştırılması için piyasa taraması yapılmış ve bu amaçla Ankara ilinin çeşitli market, pazar ve satış yerlerinden toplanan gıdalar analize alınmıştır. Piyasadan toplanan gıdaların dağılımları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Mikroorganizmaların örnek çeşidine göre dağılımları

Gıda	Adet	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> . spp.	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Gr+Çubuk Bakteri	Maya
Çiğ Süt	12	2	3	2	1	1	-	3	6	3	1	2
Beyaz Peynir	3	-	-	-	-	-	-	3	-	1	1	-
Lor Peyniri	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-
Tulum Peyniri	4	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-
Kaşar Peyniri	2	-	1	-	-	-	-	1	-	1	1	-
Torba Yoğurdu	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Kaymak	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Çiğ Kıyım	12	3	3	2	-	-	-	1	-	5	3	-
Dana kuşbaşı	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hindi eti	2	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Hindi Döner	2	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucuk	2	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-
Sosis	3	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Tavuk eti	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tavuk sakatat	8	2	1	2	1	-	-	-	-	2	-	-
Tavuk sosis	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Alabalık	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hamsi	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Midye	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pasta	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4
İtalyan Salata	2	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Krokantlı Fındık Ezmesi	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Marul	3	-	-	-	-	-	2	2	-	4	2	-
Paprika	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Domates	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Lahana	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM	80	14	13	9	4	1	2	11	9	26	11	7

Çizelge 3.2 Piyasadan toplanan örneklerin dağılımı

Örnek adı	Örnek Sayısı	Örnek adı	Örnek Sayısı
Çiğ Süt	11	Salata-meze	11
Sebze	11	Şarküteri ürünü	11
Tavuk eti	11	Süt ürünü	12
Dana-kuzu eti	11	Tatlı-pasta-börek	11
Deniz ürünü	11	TOPLAM	100

3.2. Yöntem

Çalışmalar, birbirini izleyen aşamalarda yürütülmüştür. İşlem sırası aşağıda kısaca açıklanmıştır:

-80 adet gıdada ISO 11290-1 yöntemine göre *Listeria monocytogenes* analizi yapıldı. PALCAM Agardan izole edilen 107 mikroorganizma tanımlandı ve bunlardan 66'sı seçilerek araştırmada kullanıldı. Ayrıca çalışmaya 4 adet şahit *L. monocytogenes* bakterisi eklenerek bundan sonraki çalışmalar bu 70 izolat üzerinden yürütüldü.

-Refakatçi mikroorganizmaları inhibe etmek için çeşitli antibiyotik ve inhibitör maddeler denendi. Bunun için LiCl, seftazidim, fosfomisin, rifampisin, amfoterisin b, moksalaktam, fusidik asit, polimiksin B sülfat, nalidiksik asit sefiksim ve sefiksim-tellurit karışımı ve akriflavin denendi. Bu inhibitör maddelerin etkileri disk difüzyon ve sayım metotları ile belirlendi. İnhibisyon etki belirlenirken inhibitör maddenin etkisi kullanılacağı aşamaya göre sıvı ve katı besiyerinde ayrı ayrı uygun yöntemle belirlendi.

-Bu çalışmalar sonucunda *L. monocytogenes* 'in gelişimini etkilemeyen ama refakatçi bakterileri inhibe eden antibiyotik ve inhibitör maddeler ve kullanım oranları belirlendi.

-Belirlenen inhibitör maddeler uygun kullanım oranlarında bir araya getirilerek yeni bir inhibisyon sistem oluşturuldu. Bu sistem; ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyeri için ayrı ayrı oluşturuldu.

-Belirlenen inhibisyon sistem ve gelişme faktörlerinden oluşan besiyeri formülleri hazırlandı.

-Hazırlanan besiyerleri çalışmanın başlangıcında izole edilip tanımlanan 70 izolat üzerinde denendi ve izolatların geri alımlarına bakıldı.

-En son olarak piyasa taraması yapıldı. Hazırlanan yeni sistem ve ISO 11290 yöntemi eş zamanlı kullanılarak 100 gıda maddesinde *L. monocytogenes* analizi yapıldı. İzole edilen *Listeria* türleri tanımlandı ve sistemin işleyişi incelendi.

Buna göre; çalışmalar 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalarda yapılanlar aşağıda kısaca özetlenmiştir. İlgili bölümlerde ayrıntılı açıklamalar vardır.

1. aşama: 80 gıdadan EN-ISO 11290-1 yöntemine göre *L. monocytogenes* analizi yapılmış ve analiz sırasında ön zenginleştirme ve/ veya selektif zenginleştirme aşamalarından herhangi birinden selektif besiyeri olan PALCAM Agara geçildiğinde üreyen 107 mikroorganizma izole edilip tanımlanmıştır. Tanımlanan 107 refakatçi mikroorganizmanın içinden *L. monocytogenes* analizinin son aşaması olan 1/1 Fraser Broth besiyerinden 48. saat inkübasyon sonunda PALCAM Agara sürme yapıldığında üreyen 66 mikroorganizma seçilmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında materyal olarak kullanılmıştır.

2. aşama: Seçilen 66 mikroorganizma ve 4 şahit *L. monocytogenes* bakterisiyle inhibisyon çalışmalarına başlanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde refakatçi mikroorganizmaları inhibe eden ama, *L. monocytogenes* 'e zarar vermeyen inhibitör maddeler ve kullanım oranları belirlenmiştir. Bunun için LiCl, seftazidim, fosfomisin, rifampisin, amfoterisin B, moksalaktam, fusidik asit, polimiksin B sülfat, nalidiksik asit sefiksim ve sefiksim- tellurit karışımı ve akriflavin denenmiştir. LiCl'ün ve fosfomisinin Fraser Brothtaki etkisi hariç, diğer inhibitör maddelerin etkileri, antibiyotik disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca makrodilüsyon yöntemiyle de mayalar için MİK değeri belirlenmiştir. Etkisi yeterli bulunan inhibitör maddelerden belirlenen oranlarda besiyerine eklenmiş ve sayım yapılmıştır.

3. aşama: Kullanımına karar verilen inhibitör maddelerin belirlenen oranlarıyla bir inhibisyon sistemi oluşturulmuş, besiyerine eklenmiş ve izolatlarla karşı besiyerinin etkinliği saptanmıştır.

4. aşama: Hazırlanan yeni sistem piyasadan toplanan gıdaların analizinde kontrol grubuyla birlikte kullanılmış ve besiyerinin etkinliği saptanmıştır.

3.2.1 Mikroorganizmaların izolasyonu, tanımlanması ve muhafazası

Çalışmada *Listeria monocytogenes* 'in saptanmasında EN-ISO 11290-1 yöntemi kullanılmıştır.

EN-ISO 11290-1 yöntemine göre işlem basamakları şöyledir;

-25 g (mL) gıda örneğinin yarı konsantrasyonda selektif inhibitörleri içeren Fraser Broth besiyerinde homojenizasyonu ve 30 °C'da 24 saat inkübasyon,

-Buradan alınacak 0,1 mL kültürün tam konsantrasyonda selektif inhibitörleri içeren 10 mL Fraser Broth besiyerine inokülasyonu, 35-37 °C'da 48 saat inkübasyonu, bu sürenin 24 ve 48. saatlerinde PALCAM ve/ veya Oxford Agar besiyerlerine sürme

-PALCAM ve/ veya Oxford agar besiyerlerinin 30-37 °C'da 24 ve gerekirse 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen tipik kolonilerin tanımlanması şeklindedir.

-ISO 11290 nolu standart, ALOA Agar besiyerinin yaygınlaşması ile 2004 yılında değiştirilmiş, ve selektif katı besiyeri olarak ALOA Agar ile selektif diğer bir besiyeri olarak tanımlanmıştır (Anonymous 2004c).

Selektif katı besiyerlerinden izole edilen ve TSYE (Tryptone Soya Yeast Extract) Agar besiyerine sürülen koloniler biyokimyasal testler ile tanımlanmıştır. Bu amaçla önce Gram reaksiyonuna ve mikroskoptaki morfolojik yapısına bakılmıştır. Daha sonra uygulanan testler katalaz, oksidaz, hareket, O/F, nitrat indirgeme, spor testi, metil red, VP, % 6,5-% 7,5 ve % 10 NaCl'de gelişmedir. Eğer izolat *Listeria* türü ise kesin tanımlamasını yapmak için ramnoz, ksiloz, mannitol, α -D-mannopiranosid kullanımı ile hemoliz ve CAMP testleri uygulanmıştır. Sonuçlar Hitchins (2003) ve Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e (Holt *et al.* 1994) göre değerlendirilmiştir. İzolat *Enterococcus* spp. tür bazında tanımlaması için Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.* 1994) ve Manero and Blanch (1999)'a göre yapılmıştır. Şeker

testleri Phenol Red Broth Base besiyerinde, hemoliz ve CAMP testi ise Kanlı Agar besiyerinde yapılmıştır.

Tanımlanan mikroorganizmalar, daha sonra kullanılmak üzere % 40 oranında gliserol içeren Tryptic Soy Yeast Extract Broth (TSYB) besiyerinde stoka alınmış ve -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Refakatçi mikroorganizmaların inhibisyonu

İnhibisyon işlemi iki aşamalı olarak ele alınmıştır. Birinci aşama selektif katı besiyerinde üreyen *Listeria* spp. dışında kalan refakatçi floranın (*Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., Maya ve Gram pozitif çubuk bakteri) inhibisyonudur. Bu amaçla LiCl, seftazidim, moksalaktam, amfoterisin B, nalidiksik asit, polimiksin B, akriflavin, sefiksim ve sefiksim tellurit kullanılması kararlaştırılmıştır. İkinci aşama ise hedef bakteri olan *Listeria monocytogenes* dışında kalan diğer *Listeria* türlerinin (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*) inhibisyonudur. Bu amaç için de fosfomisin, fusidik asit ve rifampisin denenmiştir.

L. monocytogenes 'e zarar vermeyen ancak refakatçi bakterileri inhibe eden antibiyotiklerin ve kullanım oranlarının belirlenmesi için TSYA'da disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyogram testi yapılmıştır. Bunun için seçilen antibiyotikler seftazidim, fosfomisin, rifampisin, amfoterisin B, moksalaktam, fusidik asit, polimiksin B sülfat, nalidiksik asit, sefiksim, sefiksim-tellurit karışımı ve akriflavindir. Antibiyotiklerin etkilerini belirlemek için 20 mikroorganizma seçilmiş ve farklı konsantrasyondaki inhibitör maddeler kullanılmıştır. Antibiyogram testi sonucu etkisi yeterli bulunan antibiyotikler, belirlenen oranlarda besiyerine eklenmiş ve sayım yapılmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle yapılan antibiyogram testlerinde kullanılan 20 mikroorganizmanın dağılımı şöyledir: *L. monocytogenes* : 51, 86, 92, 99, ATCC; *L. innocua* : 5, 55; *L. welshimeri* : 73; *L. seeligeri* : 25; *L. grayi* : 91; *Bacillus* spp. : 36, 77, 102; *Staphylococcus* spp. : 64, 74, 83; *Enterococcus* spp. : 24, 96; Gram pozitif çubuk : 84; Maya : 63.

Disk difüzyon yöntemi National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS M2-A7 2002) göre yapılmıştır. Bu amaçla bakteri kültürü TSYB'da 2 pasaj aktifleştirilmiş ve 18 saatlik kültürün bulanıklığı 0,5 McFarland standart bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Bulanıklığı ayarlanan kültürden steril eküvyon çubuk aracılığı ile daha önce hazırlanıp, yüzeyi kurutulmuş olan TSYA besiyerinin tüm yüzeyine yayılmıştır. Besiyerinin bakteri kültürünü emmesi için 5-10 dakika beklenmiş ve aseptik koşullarda steril boş antibiyotik diskler daha önce hazırlanan şablon kullanılarak Petri kutusuna yerleştirilmiştir. Daha sonra her diske farklı konsantrasyonlardaki antibiyotiklerden 10 µL aktarılmıştır. Antibiyotikler disklere aktarıldıktan sonra 10-15 dakika içinde Petri kutuları sarsılmadan tek sıra olarak inkübatöre yerleştirilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları birkaç açıdan kumpas cetvelle (mm) ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır. Mikroorganizma direnç ve duyarlılıkları ölçülen zon çaplarına göre, NCCLS (M2-A7 2002) ve BSAC (Andrews 2001b, The British Society for Antimicrobial Chemotherapy 2002) çizelgelerine göre değerlendirilmiştir. Bu yöntem uygulanırken, besiyeri 90 mm çapındaki Petri kutusunda 4 mm yüksekliğinde (yaklaşık 25 mL) dökülmüş ve besiyerinin aşırı kurumamasına özen gösterilmiştir. Ayrıca bakteri kültürü besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra disklerin 15 dakika içinde yerleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan antibiyotiklerin ticari isimleri, üretici firmalarının isimleri ve fiziksel durumları aşağıda verilmiştir.

Nalidiksik asit	Sigma - Aldrich (toz)
Polimiksin B Sülfat	Sigma - Aldrich (toz)
Moksalaktam	Sigma - Aldrich (Moksalaktam sodyum tuzu)
Seftazidim	Glaxo Smith Kline (Fortum enjektabl flakon)
Amfoterisin B	Bristol - Myers Squibb (Fungizone enjektabl flakon)
Akriflavin	Sigma - Aldrich (toz)
Rifampisin	Aventis Pharma (Rifadin kapsül ve süspansiyon)
Fusidik asit	Leo Pharmaceutical (Fucithalmic viskoz göz damlası)
Fosfomisin	Inpharzam- Zambon Grup (Monurol saşe toz)
Sefiksim	Fujisawa (toz)
Sefiksim-tellurit	Merck (SMAC katkısı - toz)
Lityum Klorür	Merck (toz)

Denemelerde kullanılan boş antibiyotik diskler Oxoid firmasından temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan inhibitör maddelerin uygun çözücülerle stok çözeltileri hazırlanmış ve bu stoktan uygun seyrelticilerle gerekli seyreltmeler yapılarak 10 µL disklerle aktarılmıştır. Araştırmada hazırlanan disklerdeki etken madde miktarları aşağıda verilmiştir.

Nalidiksik asit	20; 30; 40; 50; 100 µg
Polimiksin B Sülfat	5; 100; 150; 200; 250; 300 µg
Moksalaktam	20; 30; 40; 50; 60; 70 µg
Seftazidim	10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 µg
Amfoterisin B	0,156; 0,32; 0,625; 1,25; 2,5; 10 µg
Akriflavin	25; 50; 100; 200; 300; 400 µg
Fusidik asit	4; 8; 16; 32; 64; 128 µg
Fosfomisin	10; 50; 100; 150; 200; 250 µg
Sefiksım	4; 8; 16; 32; 64; 128 µg
Sefiksım-tellurit	0,0125-0,625; 0,025-0,125; 0,05-2,5; 0,0625-3,125; 0,125-6,25; 0,25 -12,5 µg

Kullanılan inhibitör maddelerin çözücü ve seyrelticileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Antimikrobiyel maddelerin hazırlanması ve depolanması (Andrews 2001)

İnhibitör Madde	Çözücü	Seyreltici	+4 °C	-20 °C
Lityum klorür	su	su	–	–
Nalidiksik asit	0,1 M NaOH; 10 mg/mL	su	–	–
Polimiksin B sülfat	su; 50 mg/mL	su	2 ay	
Moksalaktam	su; 50 mg/mL	su	–	–
Seftazidim	doymuş NaHCO ₃	su	1 gün	3 ay
Amfoterisin B	su	% 5 glikoz	1 hafta	–
Akriflavin	su	su	–	–
Fusidik asit	Etil alkol	su	–	–
Fosfomisin	su	su	–	–
Rifampisin	Su 2,5 mg/mL; (25 °C pH 7,3)	su		1 ay

-LiCl: LiCl, hem Fraser Broth hem de PALCAM Agarda yer alan bir inhibitör olduğu için etkisi sıvı ve katı besiyerinde farklı yöntemlerle ölçülmüştür. LiCl'in katı

besiyerindeki *L. monocytogenes* ve refakatçi bakteriler üzerine etkisini belirlemek için agar dilüsyon yöntemi (Baron and Finegold 1990) kullanılmıştır. Bunun için Nutrient Agar ve Fraser Agar (Fraser Broth besiyerine 15 g/L agar eklenerek elde edilmiştir) besiyerinde kontrol, 3,0 ve 10,0 g/L olmak üzere 3 farklı konsantrasyon LiCl ve seçilmiş 12 izolat denenmiştir. Seçilen izolatların 4'ü *E. faecalis*, 4'ü *Bacillus* spp., 1'i *Staphylococcus* spp., 1'i Gram pozitif çubuk bakteri, 1'i *L. innocua*, 2'si *L. monocytogenes* 'tir. Bu deneme 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Yapılan bu ön deneme sonuçları ışığında 70 izolatın agar dilüsyon metoduyla kontrol ve 10, 11, 12, 13, 14 ve 15 g/L olmak üzere 7 farklı konsantrasyonda LiCl içeren Nutrient Agar besiyerinde denenmesine karar verilmiştir. Katı besiyerinde LiCl'ün etkisini tam anlayabilmek için bu çalışmanın devamında 16, 17, 17, 19, 20 ve 25 g/L olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda LiCl denemesi yapılmıştır. Sonuçta Nutrient Agarda tüm *E. faecalis* suşlarının 16 g/L'den itibaren inhibe olduğu görülmüştür. Ancak 25 g/L'de *L. monocytogenes* de inhibe olmuştur. Bu yöntemle farklı oranda LiCl kullanımının *L. monocytogenes* üzerine ne kadar etkili olduğu anlaşılammakta sadece tamamen inhibe olduğu belirlenebilmektedir.

LiCl'ün Fraser Brothtaki *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* 'e olan etkisini belirlemek için spektrofotometre kullanılmış ve iki ön deneme yapılmıştır. Bunun için 13 ve 24 nolu *E. faecalis* izolatları, 92 nolu *L. monocytogenes* izolatı ile *L. monocytogenes* ATCC 7644 bakterileri seçilmiş ve TSYE Agara ilgili seyreltmelerden ekim yapılmıştır. Ancak sonuçlar *L. monocytogenes* ile *E. faecalis* için uyumsuz görüldüğünden inhibisyon etki, farklı konsantrasyonlarda LiCl içeren Fraser Broth besiyerinden PALCAM ve TSYA Agarsa yayma yöntemiyle ekim yapılarak belirlenmiştir.

LiCl'ün Fraser Brothta *L. monocytogenes* 'e karşı etkisini belirlemek için 3, 10, 15, 20 g/L LiCl içeren Fraser Brothta üreyen 18 *L. monocytogenes* 'den gerekli seyreltmeler yapılarak PALCAM ve TSYE Agara yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübasyon sonunda sayım yapılmıştır. Sonuçlar istatistik olarak değerlendirilerek Fraser Broth besiyerinde LiCl'ün *L. monocytogenes* 'e karşı herhangi bir etkisinin olmadığı en uygun kullanım oranı belirlenmiştir. Bu yöntemle Fraser Brothta *L. monocytogenes* 'in LiCl'den etkilenmeye başladığı en düşük konsantrasyon

belirlenmiş ve *E. faecalis* 'e olan etkisine bakılmıştır. Ancak bu aşamada *E. faecalis* izolatlarının TSYE Agarda çok iyi ürerken PALCAM Agarda hiç gelişmediği görülmüş ve deneme bir çok defa farklı stoklarla yenilenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında *E. faecalis* inhibisyonuna ara verilmiş ve bu sonucun nedenleri araştırılmaya başlanmıştır.

-Amfoterisin B: PALCAM Agarda üreyen mayaları inhibe etmek için Amfoterisin B antifungal kullanılmış ve 4 maya için MİK değeri makrodilüsyon yöntemiyle (Baron and Finegold 1990) belirlenmiş, spektrofotometre ile de doğrulanmıştır. Bu deneme 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Başta *L. monocytogenes* olmak üzere diğer bakterilerin duyarlılıklarını ölçmek için ise disk difüzyon yöntemi (NCLLS M2-A7 2002) tercih edilmiştir. Bu yöntemde 10; 2,5; 1,25; 0,625; 0,32 ve 0,156 µg Amfoterisin B emdirilmiş boş antibiyotik diskler, test mikroorganizmasıyla kaplanmış TSYE ve PALCAM Agar besiyerlerine yerleştirilmiştir. 37 °C'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda oluşan zon çapları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Bu deneme 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Daha sonra besiyerine katılması kararlaştırılan oranda besiyerine eklenip bütün izolatlarla karşı etkisi yayma ekim yöntemiyle belirlenmiştir. Bu denemede PALCAM Agar kontrol olarak kullanılmış ve her iki besiyeri 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

MİK değerini belirlemek için Antibiotic Medium 3 (AM3) % 2 glikoz içeren besiyeri kullanılmış, 16; 8; 4; 2 ; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,032; 0,0156; 0,0078; 0,0039; 0,0019 µg/ mL; ikinin katları şeklinde azalan seyreltmeler yapılmıştır. Maya süspansiyonu, yaklaşık 1×10^8 kob/mL maya içeren tüpten besiyeriyle 1:100 seyreltme yapılarak hazırlanmış ve içinde antibiyotikli azalan seyreltilerde 2,5 mL besiyeri içeren her tüpe 2,5 mL eklenmiştir. 37 °C'de 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda hem gözle hem de spektrofotometre ile 540 nm'de ölçüm yapılmıştır. Bu deneme 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Ayrıca Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) değerinin belirlenebilmesi için gelişme olmayan tüplerden Sabouraud-% 2 Dextrose Agar (SDA) besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Ekim sonuçları, antifungal içermeyen kontrol tüpündeki sayının % 0,1'den büyük olması halinde bir sonraki tüp MBK olarak kabul edilmiştir.

-Seftazidim: Seftazidim hem selektif sıvı besiyerinde hem de katı besiyerinde kullanılacağı için etkisi sıvı ve katı besiyerinde farklı yöntemlerle ölçülmüştür. Çalışmada PALCAM Agara farklı oranlarda (20, 60 ve 100 mg/L) seftazidim ilave edilmiş ve seçilen 10 bakterinin seftazidimden nasıl etkilendiği yayma ekim yöntemiyle belirlenmiştir. Bu sonuçların ışığında seftazidimin PALCAM Agarda kullanım oranı belirlenmiş ve bu oranın diğer izolatlara olan etkisi yine yayma ekim yöntemiyle saptanmıştır. Ayrıca seftazidim Fraser Broth besiyerine eklenmesi de düşünüldüğü için 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L oranında 4 farklı *L. monocytogenes* (86, 92, ATCC, 103) izolatıyla bir ön deneme yapılmış ve sonuçlar ışığında belirlenen kullanım oranında seftazidim Fraser Brotha eklenerek TSYE ve PALCAM Agarda yayma ekim yöntemiyle etkisi belirlenmiştir.

-Fosfomisin: Fosfomisin, hem Fraser Broth besiyerine hem de PALCAM Agar besiyerine 50 mg/L ve 100 mg/L oranında ilave edilmiş ve kontrol (Fraser ve PALCAM) ile birlikte TSYE ve PALCAM Agar besiyerlerinde yayma ekim yöntemiyle *Listeria* türlerine olan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu ön deneme planı için 4 *Listeria* türü (51- *L. monocytogenes*, 25- *L. seeligeri*, 73- *L. welshimeri*, 91- *L. grayi*) seçilmiş ve inhibisyon oranına bağlı olarak hangi seyreltmelerden ekim yapılacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre fosfomisin 200 mg/L PALCAM Agara (katkısız) ilave edilmiş, kontrol olarak PALCAM Agar kullanılmış ve yayma yöntemiyle fosfomisinin 45 adet *Listeria* izolatına olan etkisi belirlenmiştir. Ayrıca belirlenen izolasyon besiyeri formülünde fosfomisinin seftazidim olmadan 250 mg/L oranında kullanılması seçilen izolatlar üzerinde yayma ekim yöntemiyle denenmiştir.

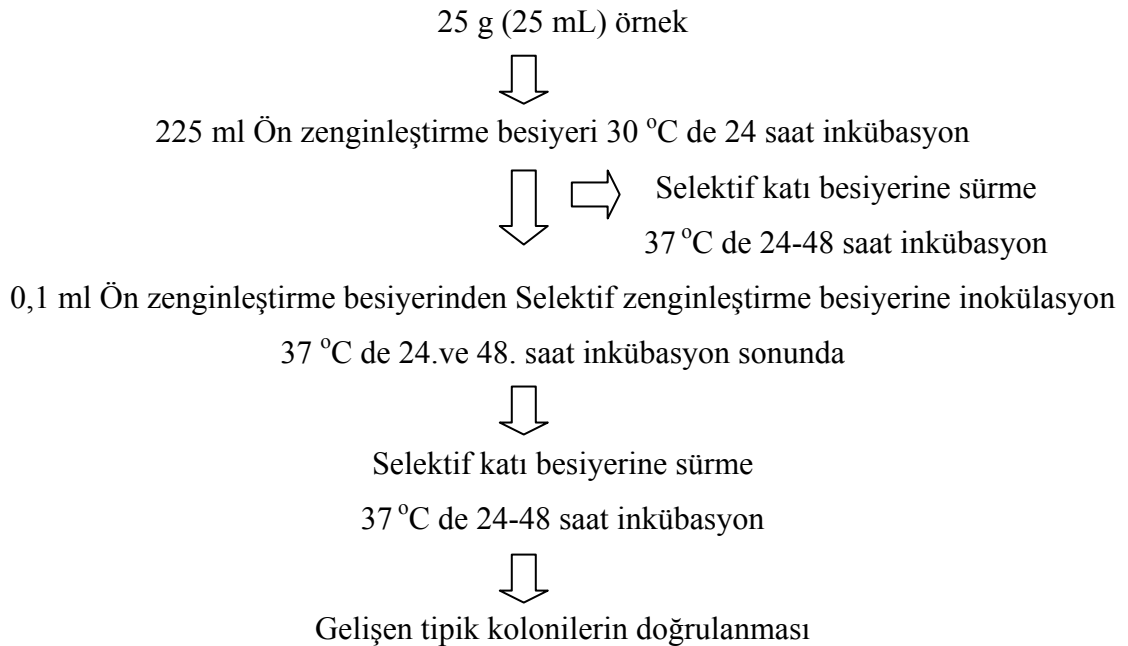
-Rifampisin: Rifampisin antibiyotiğinin de etkisi *Listeria* türleri arasında değişiklik göstermektedir. Rifampisinin inhibisyon etkisinin belirlenmesi için daha önce yapılan çalışma sonuçlarına göre solüsyon şeklinde olan rifampisinin etkisinin değişken olduğu ve 2 deneme sonucunun tutarlı olmadığı görülmüş ve solüsyon yerine kapsül kullanımına karar verilmiştir. Kapsül şeklindeki rifampisin antibiyotiğinin 0,02 mg/L ve

0,03 mg/L oranında izolasyon besiyerinde kullanımının bazı *L. monocytogenes* izolatlarına karşı inhibitör etkisi görüldüğü için, rifampisin inhibitör sisteme dahil edilmemiştir.

3.3.3 Besiyeri bileşiminin oluşturulması ve geri alma denemeleri

Bu inhibisyon çalışmaları sonucunda ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyeri inhibitör madde ve antibiyotik kombinasyonları oluşturulmuştur. Bunun için ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme ortamlarında LiCl, seftazidim, nalidiksik asit ve fosfomisin kullanımına, selektif katı besiyerinde ise LiCl, seftazidim, polimiksin B sülfat ve amfoterisin B kullanımına karar verilmiştir.

Bileşimi oluşturulan ön zenginleştirme besiyerine 70 bakteri aşılınmış ve 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ön zenginleştirme ortamından 100 µL selektif besiyerine aktarılmış ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda selektif katı besiyerine (S 60 ve S 100) yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan yöntemin şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Geliştirilen yeni besiyerleriyle *Listeria* belirleme yöntemi şeması

3.3.4 Piyasa taraması

Ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyeri bileşimleri ve sistemin tanımlanan izolatlar üzerindeki etkisi belirlendikten sonra piyasadan örnek toplanmış ve hazırlanan bu sistemle paralel olarak ISO 11290-1 metoduna göre *Listeria* analizi yapılmıştır. Analiz sonrasında Petri kutularında belirlenen tipik *Listeria* kolonileri izole edilip tanımlanmıştır.

3.2.5 İstatistik analiz

İstatistik analizler Min Tab 14.01 sürümü kullanılarak, Duncan Testi ise MS-TAT paket programıyla yapılmıştır. Disk difüzyon sonuçları, varyans analiz tekniği ile değerlendirilmiştir (One Way Anova). LiCl özelliği bakımından elde edilen gözlemler faktöryel düzende varyans analiz tekniği ile değerlendirilmiştir (Two Way Anova). Antibiyotik özelliği bakımından elde edilen gözlemler faktöryel düzende varyans analiz tekniği ile değerlendirilmiştir. Antibiyotiklerin etkisini belirlerken kontrol ile antibiyotik arasındaki farklılıklar T-Test (Two Sample T-Test) ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Gıdadan Gelen *Listeria* spp.'nin ve Refakatçi Floranın İzolasyonu ve Tanımlanması

Bu araştırmada 80 adet gıdadan ISO 11290-1 yöntemine göre *L. monocytogenes* analizi yapılmış ve 107 mikroorganizma izole edilmiştir. PALCAM Agardan izole edilen 107 izolatın morfolojik özellikleri ve biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. 107 izolatın 14'ü *L. monocytogenes*, 13'ü *L. innocua*, 9'u *L. welshimeri*, 4'ü *L. seeligeri* 1'i *L. grayi*, 26'sı *Bacillus* spp., 11'i *Enterococcus* spp., 9'u *Staphylococcus* spp., 2'si *Lactobacillus* spp. ve 7'si de maya olarak tanımlanmıştır. Geri kalan 11 izolat Gram pozitif çubuk bakteri olarak belirlenmiş ancak tanımlanamamıştır. Bulunan *Enterococcus* spp.'nin 7'si *E. faecalis*, 2'si *E. casseliflavus*, 1'i *E. faecium* ve 1'i de *E. solitarius* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi bakterilerin bazıları sadece 1/2 Fraser Brothtan PALCAM Agara geçildiğinde gelişirken 1/1 Fraser Brothun 24. saat ve/ veya 48. saat inkübasyonundan sonra PALCAM Agara geçildiğinde gelişmemektedir. Bu bakteriler *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakterilerin bir bölümüdür.

1/1 Fraser Brothun 48. saat inkübasyonundan PALCAM Agara geçildiğinde üreyen bakteriler daha çok *Listeria* spp., *Bacillus* spp. ve *E. faecalis* olmakla birlikte *Staphylococcus* spp., maya ve tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakteridir. 107 izolatın 66 'sı 1/1 Fraser Brothun 48. saat inkübasyonu sonunda bile gelişme göstermektedir. Bu 66 mikroorganizmanın 41 adedi *Listeria* spp.'dir. Geri kalan 25 izolatın 11'i *Bacillus* spp., 6'sı *E. faecalis*, 4'ü maya, 3'ü *Staphylococcus* spp. ve 1'i de tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakteridir. Çalışmanın bu aşamasında 66 bakteri-maya izolatu ve biri ATCC 7644 olmak üzere 4 adet *L. monocytogenes* şahit bakterisi çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları

İzolat no:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kaynak	ÇS1	ÇS1	L1	Papr	Ky1	Ky1	Ky2	Ky2	L2	ÇS2	ÇS2	L2
İzol. Aşa. Fraser	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1*	1/1*	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Morf.	K	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	K	M	Ç
TSYE Agar	Kr	S, Kr	S, Kr	S, Kr	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	T	B, Kr	B	S, Kr
PALCAM	YS	Si	Si	S	Y	Y	Y	Y	Si	Si	PS	Y
1/1 F 24/ 48 s	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
Hareket	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-		-
Spor	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-		-
MR/VP	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+		+/+
Nitrat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+		-
10 °C	+									+		
45 °C	-/											
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Arj. Hidr.												
%0,04 tel.												
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz												
L-Arabinoz												
Sorbitol												
Rafinoz												
Gliserol												
Ksiloz					-	-	-	+				-
Ramnoz					+	+	+	+				
Mannitol					-	-	-	-	-			-
α-D-M.P.					+	+	+	+				
Beta Hemoliz					-	-	-	-	+			
CAMP (Sa/Re)					-/-	-/-	-/-	-/-				
Eskulin H.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Ent. B.	-											
Tanımlama	<i>Staph. spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>Prop. thoenii</i>	<i>Staph. spp.</i>	Maya	Gr + çubuk

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky: Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Teğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbs: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSl: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görünümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Kaynak	Ky2	Ky2	Py1	Py1	Py2	Py2	TP1	TP1	KP	KP	KP	KP
İzol. Aşa. Fraser	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/1*	1/2	1/2
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	K	Ç	K	K	Ç	K	K	Ç	Ç	Ç	Ç	K
TSYE Agar	B	B,Ş	B	Kr,Ş	S	S	B	S	Kr	B,Ş	B	B
PALCAM	Y	S	S	AS	S	AS	Y	AS	AK	Y	Si	Y
1/1 F 24/ 48 s	+ / +	- / -	+ / -	+ / -	- / -	+ / -	+ / +	- / -	- / -	+ / +	- / -	+ / +
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Hareket	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Spor	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MR/VP	+ / -	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / +	+ / +
Nitrat	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
10 °C	+		+	+		+	+					+
45 °C	+		+	+		+	+					+
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Arj. Hidr.	+		+	+		-	+					+
%0,04 tel.	+		-	-		+	+					+
Glikoz	+	+z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktöz	+		+	-		+	+					+
L-Arabinöz	-		+	-		+	-					-
Sorbitol	+		-	-		+	+					+
Rafinoz	-		-	-		+	-					-
Gliserol	+		+	+		+	+					+
Ksiloz	-	-	-	-		+	-				-	-
Ramnoz	+		-	-							+	
Mannitol	+	-	+	+							-	
α-D-M.P.											+	
Beta Hemoliz												
CAMP (Sa/Re)											- / -	
Eskulin H.	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Ent. B.	+		+	+		+	+					+
Tanımlama	<i>E. faecalis</i>	Gr + çubuk	<i>E. faecium</i>	<i>E. solitarius</i>	Gr + çubuk	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>	Gr + çubuk	<i>Bacillus</i> spp.	<i>L. innocua</i>	Gr + çubuk	<i>E. faecalis</i>

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky: Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri
 Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk
 göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbş: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms:
 Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSl: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi
 Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka:
 Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görünümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Kaynak	Sc	Sc	TSo	TSo	Dom	Mr1	Mr1	Mr1	Mr1	Mr1	Mr1	TY
İzol. Aşa. Fraser	1/2	1/2		1/2	1/2	1/2	1/1*	1/2	1/2	1/2	1/1	1/1*
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	Ç	Ç	K	M	K	Ç	K	Ç	Ç	Ç	Ç
TSYE Agar	B,Ş	Kr	B,Ş	B	B	B	Kr,Ş	B	B	T,Ş	Kr,Ş	B
PALCAM	Y	Y,Ka	Y	Y	B	Si	H	S	Y	Ka	Ka	Kr
1/1 F 24/ 48 s	+/+	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	+		-	+	-	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	-		-	+	-	+	+	+	-
Spor	-	+	-	-		-	+	-	+	-	+	+
MR/VP	+/+	-/+	+/+	+/-		+/+	+/+	+/+	-/+	+/-	+/-	-/+
Nitrat	-	-	-	-		-	+	-	-	-	+	+
10 °C				+		+		+				
45 °C				-		+		+				
%6,5 NaCl	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+		+	+	+	+	-	-	+
Arj. Hidr.						+		+				
%0,04 tel.				-		+		+				
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz						+		+				
L-Arabinoz						-		-				
Sorbitol						-		-				
Rafinoz						-		-				
Gliserol						+		+				
Ksiloz	+		-			-		-				
Ramnoz	-		+									
Mannitol	-		-									
α-D-M.P.	-		+									
Beta Hemoliz	+		-									
CAMP (Sa/Re)	+/-		-/-									
Eskulin H.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ent. B.				-		+		+				
Tanımlama	<i>L. seeligeri</i>	<i>Bacillus</i> spp.	<i>L. innocua</i>	<i>Staph.</i> spp.	Maya	<i>E. faecalis</i>	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E. faecalis</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Gr + çubuk	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky: Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc: Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Teğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd: Hindi eti Kmk: Kaymak Kbş: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD: Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSl: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S: Sarı T: Turuncu Si: Siyah Y: Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görünümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Kaynak	TY	ÇS3	ÇS3	ÇS3	ÇS3	ÇS4	So1	So2	Ky3	Ky3	Ky3	Ky4
İzol. Aşa. Fraser	½	½	½	½	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	Ç	Ç	K	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç
TSYE Agar	B	T,Ş	Kr	S,Kr	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	Kr	Kr	B,Ş	B,Ş
PALCAM	AK	H	S	AK	Y	Y	Y	Y	Ka	AK	Y	Y
1/1 F 24/ 48 s	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Hareket	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Spor	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MR/VP	-/+	+/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
Nitrat	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C				+								
45 °C				+								
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arj. Hidr.				-								
%0,04 tel.				+								
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktöz				+								
L-Arabinoz				+								
Sorbitol				+								
Rafinoz				+								
Gliserol				+								
Ksiloz				+	-	-	-	-			-	-
Ramnoz					+	+	+	+			+	+
Mannitol					-	-	-	-			-	-
α-D-M.P.					+	+	+	+			+	+
Beta Hemoliz					-	-	+	+			-	+
CAMP (Sa/Re)					-/-	-/-	+/-	+/-			-/-	+/-
Eskulin H.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ent. B.				+								
Tanımlama	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>E. casseliflavus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky:Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbs: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSl: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Kaynak	Ky4	Ky4	Ky5	Ky5	Ky5	Tçğ	Tg	Tg	Tvt	Tvt	Tvkn	Tvkn
İzol. Aşa. Fraser	1/1	1/1*	1/1*	1/1	1/2	1/1*	1/1*	1/1	1/1	1/1	1/1*	1/1*
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç
TSYE Agar	Kr	Kr	B,Ş	Kr	Kr	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	Kr
PALCAM	S	Si	Y	Ka	AK	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Ka
1/1 F 24/ 48 s	+/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spor	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MR/VP	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Nitrat	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
10 °C												
45 °C												
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Arj. Hidr.												
%0,04 tel.												
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz												
L-Arabinoz												
Sorbitol												
Rafinoz												
Gliserol												
Ksiloz			-			+	-	-	+	-	+	
Ramnoz			+			-	-	+	+	+	+	
Mannitol			-			-	-	-	-	-	-	
α-D-M.P.			+			-	+	+	+	+	+	
Beta Hemoliz			+			+	-	+	-	+	-	
CAMP (Sa/Re)			+/ -			+/ -	-/-	+/ -	-/-	+/ -	-/-	
Eskulin H.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ent. B.												
Tanımlama	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Bacillus</i> spp.	Gr + çubuk	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>Bacillus</i> spp.

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky:Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbs: Kuşbaşı Tvkn: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSlt: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Kaynak	Tvkn	Ky3	Ps1	Ps1	Ps1	Ps1	Ps2	So3	TP2	TP2	Mr2	Mr2
İzol. Aşa. Fraser	½	½	1/1*	1/1*	1/1*	1/1	1/1	½	½	½	½	½
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	Ç	M	K	M	M	M	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç
TSYE Agar	Kr	Kr	B	B	B	B	B	B	Kr	B	Kr	T
PALCAM	AK	Si	Bej	Y	Si	Gri	B	Ysi	Ka	Y	H	Ka
1/1 F 24/ 48 s	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+		+				+	+	+	+	-
Oksidaz	-	-		-				-	-	-	-	-
Hareket	+	+		-				-	-	-	-	-
Spor	+	-		-				+	+	+	-	-
MR/VP	+/+	+/+		+/-				-/+	-/+	-/+	+/-	+/-
Nitrat	+	-		-				-	-	-	+	-
10 °C				+								
45 °C				-								
%6,5 NaCl	+	+		+				+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+		+				+	+	+	+	+
%10 NaCl	+z	+		+				+	+	+	+	+
Arj. Hidr.												
%0,04 tel.												
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz												
L-Arabinoz												
Sorbitol												
Rafinoz												
Gliserol												
Ksiloz												
Ramnoz												
Mannitol												
α-D-M.P.												
Beta Hemoliz												
CAMP (Sa/Re)												
Eskulin H.	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ent. B.				-								
Tanımlama	<i>Bacillus</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Maya	<i>Staph.</i> spp.	Maya	Maya	Maya	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Gr + çubuk	<i>Lactobacillus</i> spp.

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky:Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbs: Kuşbaşı Tvkn: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSlt: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görünümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Kaynak	Hnd	Hnd	Mr2	Mr2	Kmk	Kbş	Ky6	Ky6	P3	ÇS5	ÇS5	ÇS6
İzol. Aşa. Fraser	1/1*	1/1*	½	½	1/1*	1/1*	½	1/1*	1/1*	1/1	1/1*	1/1*
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	K	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	M	K	Ç
TSYE Agar	B,Ş	B	ST	T	Kr	B,Ş	SŞ	B,Ş	S	Kr	Kr,Ş	S,Kr
PALCAM	Y	Y	H	Si	B	Y	Ka	Y	B,Kr	B	P,S	B
1/1 F 24/ 48 s	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	-	+	+	+	+	+		+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	+	-	-		-	-
Hareket	+	-	-	-	+	+	-	+	-		-	-
Spor	-	-	+	-	+	-	-	-	+		-	-
MR/VP	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-		+/+	+/+
Nitrat	-	-	-	-	+	-	-	-	+		+	+
10 °C		+									+z	
45 °C		-									+	
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
%10 NaCl	+	+	+	-/	+z	+	+	+	+z		+	+z
Arj. Hidr.												
%0,04 tel.												
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktöz												
L-Arabinöz												
Sorbitol												
Rafinoz												
Gliserol												
Ksiloz	+					-		+				
Ramnoz	+					+		+				
Mannitol	-					-		-				
α-D-M.P.	+					+		+				
Beta Hemoliz	-					+		-				
CAMP (Sa/Re)	-/-					+/-		-/-				
Eskulin H.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Ent. B.		-									-	
Tanımlama	<i>L. welshimeri</i>	<i>Staph. spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Gr + çubuk	<i>L. welshimeri</i>	<i>Bacillus spp.</i>	Maya	<i>Staph. spp.</i>	Gr + çubuk

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky:Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbş: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSlt: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
Kaynak	ÇS7	ÇS7	Tvk	ÇS8	ÇS9	ÇS10	ÇS12	ÇS10	ÇS12	ÇS12	ÇS12	ÇS10
İzol. Aşa. Fraser	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	K	Ç	Ç	K	K	K	K
TSYE Agar	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	S,T	S,Kr	S,T	B,Ş
PALCAM	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Si	Ka	H	Y
1/1 F 24/ 48 s	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Spor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR/VP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arj. Hidr.						+						+
%0,04 tel.						+						+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktöz						+						+
L-Arabinöz						-						-
Sorbitol						+						+
Rafinoz						-						-
Gliserol						+						+
Ksiloz	+	-	-	-	+	-	-	-				+
Ramnoz	+	+	+	+	-	+	-	+				+
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-				+
α-D-M.P.	+	+	+	+	-		+	+				
Beta Hemoliz	-	+	-	-	+		-	+				
CAMP (Sa/Re)	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-		-/-	+/-				
Eskulin H.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ent. B.						+			+z	+z	+z	+
Tanımlama	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Staph. spp.</i>	<i>Staph. spp.</i>	<i>Staph. spp.</i>	<i>E. faecalis</i>

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky:Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbş: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSlt: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görünümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

Çizelge 4.1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları (devam)

İzolat no:	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
Kaynak	ÇS12	HD1	HD1	AB	Hms	KFEz	Mdy	İtSlt1	İtSlt2	İtSlt1	HD2
İzol. Aşa. Fraser	1/1	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/2	1/2
Gram Reak	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morf.	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç
TSYE Agar	B,Kr	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,ku	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş	B,Ş
PALCAM	Y	Y	Y	Y	Y	S,Kr	Y	Y	Y	Y	Y
1/1 F 24/ 48 s	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spor	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MR/VP	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Nitrat	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10 °C											
45 °C											
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arj. Hidr.											
%0,04 tel.											
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz											
L-Arabinoz											
Sorbitol											
Rafinoz											
Gliserol											
Ksiloz	+	+	-	+	-		-	-	-	+	-
Ramnoz	+	+	+	-	+		+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
α-D-M.P.	+	+	+	-	+		+	+	+	+	+
Beta Hemoliz	-	-	+	+	+		+	-	-	-	+
CAMP (Sa/Re)	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-		+/-	-/-	-/-	-/-	+/-
Eskulin H.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ent. B.											
Tanımlama	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>

ÇS: Çiğ Süt L: Lor Peyniri Papr: Paprika Ky:Kıyma Py Beyaz Peynir TP: Tulum Peyniri KP: Kaşar Peyniri Sc.Sucuk TSo: Tavuk sosis Dom: Domates Mr: Marul TY: Torba Yoğurdu So: Sosis Tçğ: Tavuk ciğer Tg: Tavuk göğüs Ps: Pasta Hnd:Hindi eti Kmk: Kaymak Kbs: Kuşbaşı Tvk: Tavuk eti HD:Hindi Döner AB: Alabalık Hms: Hamsi Md: Midye KFEz: Krokantlı fındık ezmesi İtSlt: İtalyan Salata TSYA PALCAM B: Beyaz Kr: Krem rengi Ş: Şeffaf S:Sarı T: Turuncu Si:Siyah Y:Yeşil YS: Yeşil sarı PS: Pembe sarı AS: Açık sarı AK: Açık Kahve Ka: Kahverengi H: Hardal rengi ku: kuru görümlü O/F: Oksidatif/Fermentatif

4.2 Refakatçi Flora İnhibisyon Sonuçları

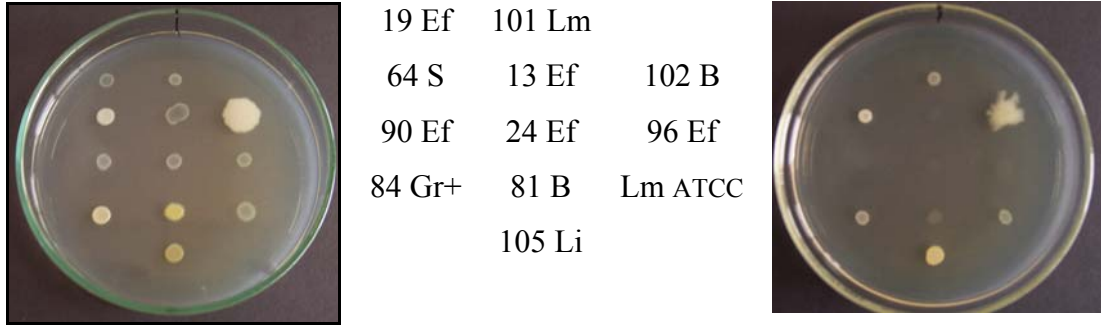
4.2.1 LiCl'ün *L. monocytogenes* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

LiCl'ün *L. monocytogenes* ve refakatçi diğer bakteriler üzerine etkisini belirlemek için uygulanan agar dilüsyon yöntemi sonuçlarına göre 3,0 g/L oranında LiCl içeren Nutrient Agar ile Fraser Agarın kontrolle aynı olduğu ancak 10,0 g/L oranında LiCl içeren Nutrient Agar besiyerinde 24 nolu *E. faecalis* izolatının, Fraser Agarda ise 24, 90, 96 nolu *E. faecalis* ve 81 nolu Gram pozitif çubuk bakterinin zayıf geliştiği görülmüştür. Bu denemede Fraser Agarda eskulinden gelen bir bulanıklık olduğu için bakteri kolonilerinin seçilmesinde zorluk yaşanmış ve her iki besiyerinde de *E. faecalis* 'in tamamen inhibe olmadığı görülmüştür.

Yapılan bu ön deneme sonuçları ışığında 70 izolatın agar dilüsyon metoduyla kontrol ve 10-15 g/L olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda LiCl içeren Nutrient Agar besiyerinde 13 g/L'den itibaren 90 nolu *E. faecalis* izolatının zayıf koloni oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak diğer bakterilerin gelişmesinde herhangi bir fark görülmemiştir. Katı besiyerinde LiCl'ün etkisini tam anlayabilmek için 16-20 g/L ve 25 g/L LiCl'ün denendiği çalışma sonucunda Nutrient agarda tüm *E. faecalis* suşlarının 16 g/L'den itibaren inhibe olduğu görülmüştür. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi *L. monocytogenes* 25 g/L LiCl'den etkilenmiş ancak inhibisyon net olarak belirlenememiştir. Bu yöntemle farklı oranda LiCl kullanımının *L. monocytogenes* üzerine katı besiyerinde ne kadar etkili olduğu anlaşılammakta sadece bakterinin tamamen inhibe olduğu oran belirlenebilmektedir.

İnhibitör maddenin *L. monocytogenes* 'e olan etkisi Fraser Brothta spektrofotometre ile ölçülmesi için yapılan ön denemenin sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu çalışma sırasında LiCl'ün otoklav sonrasında Fraser Broth besiyerinde çökelti oluşturduğu görülmüş bunun önlenmesi için önce hangi orandan itibaren çökelti oluşturduğu araştırılmış ve 7 g/L'den itibaren çökelti oluşturmaya başladığı anlaşılmıştır. Çözüm olarak LiCl'ün stok çözeltisi hazırlanmış ve otoklavda sterilize edilip besiyerine otoklav sonrası eklenmiştir. Bu ön deneme sonuçlarına göre bakteri farklılığı spektrofotometre sonuçlarını çok etkilemiş ve aynı sayıdaki farklı bakterilerin değerleri çok farklı

çıkıştır. Bu deneme farklı bir *L. monocytogenes* izolatı ile tekrarlanarak 24. ve 48. saatteki absorbands ölçüm ve koloni sayımları yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Kontrol; Nutrient Agar

Nutrient Agar+25 g/L LiCl

Şekil 4.1 25 g/L LiCl'ün bazı izolatlara olan etkisinin agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmesi

Çizelge 4.2 Farklı oranlarda LiCl kullanımının *E. faecalis* ve *L. monocytogenes* üzerine etkisinin 24. saatteki spektrofotometre ve sayım sonuçları

LiCl Oranı	Sayım Sonuç log kob/mL				LiCl Oranı	625 nm Absorbans			
	E 13	ATCC 7644	E 24	Lm 92		E 13	ATCC 7644	E 24	Lm 92
3 g/L	8,61	8,48	8,46	8,58	3 g/L	0,327	0,156	0,337	0,170
10 g/L	6,08	8,40	6,20	8,52	10 g/L	0,050	0,141	0,040	0,152
15 g/L	5,02	8,34	5,28	8,44	15 g/L	0,020	0,140	0,022	0,147
20 g/L	4,95	7,93	5,08	8,08	20 g/L	0,014	0,044	0,012	0,050
25 g/L	4,90	7,51	4,94	7,73	25 g/L	0,010	0,002	0,006	0,021

13 ve 24 nolu izolatlar *E. faecalis*; 92 ve ATCC 7644 nolu izolatlar ise *L. monocytogenes* 'tir.

Çizelge 4.3 Farklı oranlarda LiCl kullanımının *E. faecalis* ve *L. monocytogenes* üzerine etkisinin 24.ve 48. saatteki spektrofotometre ve sayım sonuçları

Sayım 24. saat	log kob/mL				Spektro 24. saat	625 nm Absorbans			
	LiCl Oranı	E 13	ATCC 7644	E 24		Lm 51	LiCl Oranı	E 13	ATCC 7644
3 g/L	8,38	8,32	8,41	8,63	3 g/L	0,330	0,152	0,346	0,212
10 g/L	6,60	8,24	6,54	8,48	10 g/L	0,058	0,147	0,041	0,175
15 g/L	6,36	8,11	6,32	8,40	15 g/L	0,032	0,132	0,031	0,155
20 g/L	5,71	7,48	6,14	7,88	20 g/L	0,024	0,057	0,023	0,081
25 g/L	5,58	6,56	6,00	7,20	25 g/L	0,018	0,009	0,008	0,016
Sayım 48. saat	log kob/mL				Spektro 48. saat	625 nm Absorbans			
	LiCl	E 13	ATCC	E 24		Lm 51	LiCl	E 13	ATCC
3 g/L	8,58	8,57	8,43	8,64	3 g/L	0,332	0,164	0,357	0,214
10 g/L	7,83	8,38	6,08	8,62	10 g/L	0,115	0,160	0,070	0,200
15 g/L	5,46	8,32	5,72	8,48	15 g/L	0,042	0,157	0,047	0,188
20 g/L	5,15	7,53	5,60	7,90	20 g/L	0,033	0,148	0,046	0,147
25 g/L	5,11	7,46	5,16	7,78	25 g/L	0,027	0,144	0,025	0,133

13 ve 24 nolu izolatlar *E. faecalis*; 51 ve ATCC 7644 nolu izolatlar ise *L. monocytogenes* 'tir.

Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi *L. monocytogenes* ATCC 7644 izolatı 25 g/L LiCl içeren Fraser Broth besiyerindeki sayım sonucu 7,51 log kob/mL ve aynı tüpün absorbans değeri 0,002 okunmuştur. Ancak aynı şartlardaki *E. faecalis* 13 nolu izolatın sonuçları 4,90 log kob/mL ve 0,010 olarak belirlenmiştir. 13 nolu izolatın 24. saatteki başlangıç değeri 8,38 log kob/mL ve absorbans değeri 0,330 ölçülmüşken aynı değer Lm. ATCC 7644 izolatı için 8,32 log kob/mL ve absorbans değeri ise 0,152 ölçülmüştür. Buradan da anlaşılacağı gibi birbirine yakın sayıdaki iki farklı bakterinin spektrofotometre sonuçları çok farklı çıkmıştır.

Spektrofotometre sonuçları kendi içinde tutarlı görünse de, sayım sonuçları ile karşılaştırıldığı zaman inhibitör maddenin etkisi konusunda yanıltıcı bilgiler verdiği görülmüştür. Bu yüzden LiCl denemesinin sayım metoduyla yapılmasına karar verilmiş ve bunun için 3, 10, 15, 20 g/mL LiCl içeren Fraser Broth besiyerinden elde edilen sonuçlar istatistik olarak değerlendirilerek *L. monocytogenes* 'in Fraser Broth besiyerinde LiCl'den etkilenmeye başladığı oran bulunmuştur. Sayım sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı oranda LiCl içeren Fraser Brothta üreyen *L. monocytogenes* izolatlarının PALCAM ve TSYA besiyerindeki sayım sonuçları

İzolat No	TSYE Agar log kob/mL				PALCAM Agar log kob/mL			
	LiCl g/L				LiCl g/L			
	3	10	15	20	3	10	15	20
43 <i>L. m.</i>	8,88	8,63	8,43	8,24	8,83	8,60	8,41	8,19
44 <i>L. m.</i>	8,62	8,52	8,08	7,97	8,61	8,46	8,08	7,97
48 <i>L. m.</i>	8,73	8,65	8,46	8,40	8,72	8,54	8,46	8,37
51 <i>L. m.</i>	8,53	8,48	8,04	7,41	8,49	8,46	7,90	7,32
56 <i>L. m.</i>	8,55	8,49	8,04	7,59	8,51	8,38	7,94	7,54
58 <i>L. m.</i>	8,73	8,54	8,32	8,11	8,66	8,51	8,20	8,08
62 <i>L. m.</i>	8,44	8,41	7,77	7,04	8,42	8,29	7,72	7,02
78 <i>L. m.</i>	8,37	8,28	7,99	7,08	8,33	8,27	7,93	7,01
86 <i>L. m.</i>	8,34	8,32	8,09	7,20	8,31	8,20	8,03	7,11
92 <i>L. m.</i>	8,55	8,49	8,32	8,05	8,52	8,45	8,25	7,95
99 <i>L. m.</i>	8,43	8,35	7,88	7,40	8,41	8,32	7,86	6,34
101 <i>L. m.</i>	8,34	8,31	8,03	7,15	8,32	8,23	7,30	6,08
103 <i>L. m.</i>	8,54	8,40	8,11	7,75	8,47	8,28	7,81	6,18
107 <i>L. m.</i>	8,51	8,34	8,21	8,14	8,37	8,34	8,15	8,07
ATCC <i>L. m.</i>	8,76	8,31	7,70	7,23	8,70	8,09	7,69	7,22
RSHM <i>L. m.</i>	8,45	8,39	7,78	7,20	8,35	8,15	7,66	7,17
Viyana <i>L. m.</i>	8,76	8,31	7,70	7,23	8,70	8,09	7,69	7,22
1483 <i>L. m.</i>	8,45	8,39	7,78	7,20	8,35	8,15	7,66	7,17

18 farklı *L. monocytogenes* izolatına karşı Fraser Brothta LiCl'ün etkisini belirleme çalışması sonucunda PALCAM ve TSYE Agar arasındaki farkın istatistik olarak önemli olduğu ancak farklı LiCl oranlarının her iki besiyerinde de bakteri üzerine aynı etkide bulunduğu yani interaksyonun olmadığı belirlenmiştir. Sonuçta 3 g/L ve 10 g/L LiCl arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmazken 15 g/L'deki fark önemli bulunmuş ($p < 0,05$) ve LiCl'ün Fraser Broth besiyerinde en ideal kullanım oranı 10 g/L olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın bundan sonraki kısmında, LiCl Fraser Brotha 10 g/L olarak ilave edilmiş ve bütün izolatlar özellikle de *E. faecalis* 'e karşı etkisi kontrol grubuyla birlikte TSYE ve PALCAM Agarda sayım yöntemiyle belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Ancak deneme sırasında PALCAM Agardan izole edilip tanımlanan *E. faecalis* izolatlarının 6'sının da aynı besiyerinde gelişmediği ama TSYE Agarda çok iyi ürediği

görülmüştür. Bu sonuçlara bir anlam verilememiş ama denemeler farklı bakteri stokları ve PALCAM Agar besiyerleri ile bir çok defa tekrarlanmış ama sonuç değişmemiştir. LiCl ile ilgili olarak yapılan bu çalışmaların sonucunda PALCAM Agardaki LiCl oranı 15 g/L'den 10g/L'ye düşürülmüştür.

Çizelge 4.5 Kontrol 3 g/L ve 10 g/L LiCl içeren Fraser Broth besiyerinde gelişen izolatların PALCAM Agar ve TSYE Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

LiCl	TSYA		PALCAM		İzolat No	TSYA		PALCAM	
	3 g/L	10 g/L	3 g/L	10 g/L		3 g/L	10 g/L	3 g/L	10 g/L
43 <i>L.m.</i>	8,88	8,63	8,83	8,60	5 <i>L. inn.</i>	8,45	8,43	8,43	8,42
44 <i>L.m.</i>	8,62	8,52	8,61	8,46	6 <i>L. inn.</i>	8,93	8,28	8,94	8,32
48 <i>L.m.</i>	8,66	8,54	8,64	8,49	7 <i>L. inn.</i>	8,71	8,34	8,76	8,40
51 <i>L.m.</i>	8,73	8,65	8,72	8,54	22 <i>L. inn.</i>	8,40	8,20	8,43	8,28
56 <i>L.m.</i>	8,53	8,48	8,49	8,46	27 <i>L. inn.</i>	8,51	8,43	8,57	8,46
58 <i>L.m.</i>	8,55	8,49	8,51	8,38	41 <i>L. inn.</i>	8,43	8,42	8,43	8,42
62 <i>L.m.</i>	8,65	8,53	8,58	8,51	42 <i>L. inn.</i>	8,63	8,32	8,74	8,42
78 <i>L.m.</i>	8,73	8,54	8,66	8,51	47 <i>L. inn.</i>	8,64	8,20	8,69	8,30
86 <i>L.m.</i>	8,44	8,41	8,42	8,29	55 <i>L. inn.</i>	8,70	8,66	8,80	8,52
92 <i>L.m.</i>	8,37	8,28	8,33	8,27	87 <i>L. inn.</i>	8,58	8,28	8,61	8,34
99 <i>L.m.</i>	8,34	8,32	8,31	8,20	88 <i>L. inn.</i>	8,60	8,38	8,69	8,48
101 <i>L.m.</i>	8,55	8,49	8,52	8,45	104 <i>L. inn.</i>	8,58	8,28	8,72	8,42
103 <i>L.m.</i>	8,43	8,35	8,41	8,32	105 <i>L. inn.</i>	8,61	8,38	8,60	8,36
107 <i>L.m.</i>	8,34	8,31	8,32	8,23	8 <i>L. wel.</i>	8,57	8,43	8,60	8,53
ATCC <i>L.m.</i>	8,54	8,40	8,47	8,28	57 <i>L. wel.</i>	8,67	8,08	8,73	8,26
RSHM <i>L.m.</i>	8,51	8,34	8,37	8,34	59 <i>L. wel.</i>	8,40	8,04	7,43	7,15
Viyana <i>L.m.</i>	8,76	8,31	8,70	8,09	73 <i>L. wel.</i>	8,75	8,26	8,83	8,26
1483 <i>L.m.</i>	8,45	8,39	8,35	8,15	80 <i>L. wel.</i>	8,87	8,32	8,93	8,48
31 Bac.	7,36	7,08	7,36	7,32	85 <i>L. wel.</i>	8,95	8,78	8,95	8,76
36 Bac.	7,49	7,15	7,48	7,11	97 <i>L. wel.</i>	8,52	8,23	8,53	8,28
45 Bac.	7,58	7,46	7,36	7,11	98 <i>L. wel.</i>	8,60	8,42	8,60	8,52
46 Bac.	7,76	7,32	7,45	6,95	106 <i>L. wel.</i>	8,65	8,26	8,65	8,30
50 Bac.	7,42	7,23	7,26	7,04	25 <i>L. seel.</i>	8,59	8,32	8,62	8,38
52 Bac.	7,91	6,77	7,40	6,54	54 <i>L. seel.</i>	8,65	8,57	8,43	8,34
60 Bac.	7,62	7,45	7,58	7,34	89 <i>L. seel.</i>	8,36	8,34	8,34	8,30
61 Bac.	7,81	6,62	7,00	6,08	100 <i>L. wel.</i>	8,59	8,56	8,56	8,54
77 Bac.	7,56	7,34	7,45	6,94	91 <i>L. grayi</i>	8,45	8,34	8,42	8,30
81 Bac.	7,34	6,56	7,30	6,15	84 Gr+çb.	8,43	8,36	8,23	8,04
102 Bac.	6,43	6,38	5,81	5,75	63 maya	6,20	6,11	6,15	6,08
64 Staph.	7,49	7,34	3,78	3,42	65 maya	6,26	5,81	6,18	5,56
74 Staph.	7,40	6,62	7,30	6,58	66 maya	6,54	6,46	6,52	6,42
83 Staph.	7,38	7,04	3,57	2,34	67 maya	6,51	6,40	6,46	6,18

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp., Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

4.2.2 Amfoterisin B'nin *L. monocytogenes* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

Amfoterisin B'nin maya izolatlarına karşı MİK ve MBK değerlerinin belirlendiği makrodilüsyon çalışmasınının 24. ve 48. saatindeki tüplerdeki bulanıklık ve 540 nm'deki spektrofotometre sonuçları Çizelge 4.6'da ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Amfoterisin B'nin maya izolatlarına karşı MİK ve MBK değerleri ise Çizelge 4.7'de verilmiştir. Ayrıca gelişme olmayan tüplerden SDA'a ekim yapılarak sonuçlar doğrulanmıştır.

Çizelge 4.6 Amfoterisin B'nin maya izolatlarına etkisi 24. saat makrodilüsyon sonuçları

	63 Maya			65 Maya			66 Maya			67 Maya		
	24. s.		48. s.	24. s.		48. s.	24. s.		48. s.	24. s.		48. s.
Amfot. B	B	B	Abs	B	B	Abs	B	B	Abs	B	B	Abs
0	+	+	0,486	+	+	0,450	+	+	0,371	+	+	0,500
0,0019	+	+	0,460	+	+	0,438	+	+	0,307	+	+	0,494
0,0039	+	+	0,444	+	+	0,436	+	+	0,201	+	+	0,492
0,0078	+	+	0,308	+	+	0,434	-	+	0,043	+	+	0,484
0,0156	-	+	0,012	+	+	0,416	-	+	0,008	+	+	0,464
0,032	-	-	<u>0,000</u>	-	+	0,004	-	-	<u>0,000</u>	+	+	0,110
0,0625	-	-	0,000	-	-	<u>0,000</u>	-	-	0,000	-	+	0,044
0,125	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	+	0,004
0,25	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	<u>0,000</u>
0,5	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000
1,0	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000
2,0	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000
4,0	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000
8,0	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000
16,0	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000	-	-	0,000

B: bulanıklık Abs: Absorbans



Şekil 4.2 63 nolu maya izolatu için makrodilüsyon yöntemiyle MİK değerinin belirlenmesi

Çizelge 4.7. Mayalar için MİK ve MBK değerleri

İzolat	MİK µg/mL	MBK µg/mL
63 Maya	0,032	0,0625
65 Maya	0,0625	0,0625
66 Maya	0,032	0,0625
67 Maya	0,125	0,25

Amfoterisin B'nin katı besiyerindeki etkisinin mayalar üzerine nasıl olduğunu belirlemek için 6 farklı oranda Sabouraud-% 2 Dextrose Agar (SDA) ve PALCAM (PA) agarda ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. SDA ile PALCAM arasında oldukça farklı zon çapları oluşmuştur. Bu nedenle Amfoterisin B'nin PALCAM Agarda kullanılan diğer antibiyotiklerle etkisinin arttığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.8 Amfoterisin B'nin mayalar üzerine etkisi 24. ve 48. saat (µg/disk; mm zon çapı)

24. saat	0,16		0,32		0,625		1,25		2,5		10,0	
	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA
63	–	19	7	20	8	21	10	23	12	26	12	29
65	7	21	9	22	10	23	11	24	11	27	13	29
66	7	18	8	19	9	20	9	21	10	22	12	29
67	–	20	9	21	10	22	11	23	12	25	13	30
48. saat	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA	SDA	PA
63	7	20	10	21	11	23	11	25	12	26	12	30
65	7	24	10	24	10	25	11	26	11	29	13	30
66	7	18	9	21	10	21	10	22	11	23	12	30
67	7	20	10	21	10	23	11	24	12	26	13	30

Amfoterisin B'nin diğer refakatçi bakteriler ve *L. monocytogenes* üzerine etkisi olup olmadığı seçilen 19 izolatta disk difüzyon yöntemiyle TSYE ve PALCAM (PA) Agarda ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. Sadece 10 µg içeren disklerde zon oluşumu gözlemlendiği için çizelgede bu değerlere yer verilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak Amfoterisin B'nin diğer izolatlarla karşı etkisini öğrenmek için 10 µg içeren disklerde 24. ve 48. saat inkübasyon sonunda zon oluşumu belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelge 4.10'da da görüldüğü gibi 24. saat ile 48. saat arasında önemli bir fark olmamıştır.

Çizelge 4.9 Amfoterisin B'nin etkisi (µg/disk; mm zon çapı)

İzolat No	Amfoterisin B (µg/disk, mm zon çapı)						
	0,16	0,32	0,625	1,25	2,5	10	P 10
51 <i>L. m.</i>	–	–	–	–	–	–	7
99 <i>L. m.</i>	–	–	–	–	–	–	7
ATCC <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–	7
86 <i>L. m.</i>	–	–	–	–	–	–	7
92 <i>L. m.</i>	–	–	–	–	–	–	–
5 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–	7
55 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–	7
25 <i>L. seel.</i>	–	–	–	–	–	–	8
73 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–	–	–	7
91 <i>L. grayi</i>	–	–	–	–	–	–	8
64 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–	–	–
74 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–	7	7
83 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–	–	–
24 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	–	–
96 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	–	–
84 Gr+çb.	–	–	–	–	–	7	7
36 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	–	–	–
77 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	–	–	7
102 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac. Bacillus* spp., *Staph. Staphylococcus* spp.,
E. faec. *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

PALCAM Agarda 10 mg/L amfoterisin B kullanımının izolatlarla karşı etkisi sayım yöntemiyle belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Çizelge 4. 11'de de görüldüğü gibi 10 mg/L amfoterisin B kullanımı sonucunda 4 adet maya izolatu inhibe olmuş ve denemede kullanılan 18 *L. monocytogenes* izolatu başta olmak üzere diğer

refakatçi bakterilere karşı etkisi istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Sonuçta selektif katı besiyerinde 10 mg/L amfoterisin B kullanımına karar verilmiştir.

Çizelge 4.10 Amfoterisin B'nin *L. monocytogenes* ve diğer bakteriler üzerine etkisi 24. ve 48. saat (10 µg/disk; mm zon çapı)

Amfoterisin	24. saat		48. saat		İzolot No	24. saat		48. saat	
	TSYE	PA	TSYE	PA		TSYE	PA	TSYE	PA
43 <i>L.m.</i>	–	7	–	8	5 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
44 <i>L.m.</i>	–	7	–	–	6 <i>L. inn.</i>	–	7	–	–
48 <i>L.m.</i>	–	8	–	8	7 <i>L. inn.</i>	–	7	–	–
51 <i>L.m.</i>	–	7	–	7	22 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
56 <i>L.m.</i>	–	7	–	–	27 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
58 <i>L.m.</i>	–	7	–	7	41 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
62 <i>L.m.</i>	–	7	–	7	42 <i>L. inn.</i>	–	7	–	–
78 <i>L.m.</i>	–	7	–	–	47 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–
86 <i>L.m.</i>	–	7	–	7	55 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
92 <i>L.m.</i>	–	–	–	7	87 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
99 <i>L.m.</i>	–	7	–	7	88 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
101 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	104 <i>L. inn.</i>	–	7	–	7
103 <i>L.m.</i>	–	7	–	8	105 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–
107 <i>L.m.</i>	–	7	–	–	8 <i>L. wel.</i>	–	7	–	–
Lm ATCC	–	7	–	8	57 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–
Lm Viy.	–	8	–	8	59 <i>L. wel.</i>	–	7	–	–
Lm RSMH	–	8	–	8	73 <i>L. wel.</i>	–	7	–	7
Lm 1483	–	8	–	8	80 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–
31 <i>Bac.</i>	7	–	–	–	85 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–
36 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	97 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–
45 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	98 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–
46 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	106 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–
50 <i>Bac.</i>	–	8	–	7	25 <i>L. seel.</i>	–	8	–	–
52 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	54 <i>L. seel.</i>	–	7	–	7
60 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	89 <i>L. seel.</i>	–	–	–	–
61 <i>Bac.</i>	7	–	7	–	100 <i>L. seel.</i>	–	7	–	7
77 <i>Bac.</i>	–	7	–	7	91 <i>L. grayi</i>	–	8	–	8
81 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	84 Gr+ çb.	7	7	–	8
102 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	13 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–
64 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	19 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–
74 <i>Staph.</i>	7	–	–	–	24 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–
83 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	32 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–
90 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	96 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–

TSYE: Triptik soy yeast ekstrakt agar PA: PALCAM Agar
L. m. Listeria monocytogenes, *L. inn. Listeria innocua*, *L. wel. Listeria welshimeri*,
L. seel. Listeria seeligeri, *Bac. Bacillus spp.*, *Staph. Staphylococcus spp.*,
E. faec. Enterococcus faecalis, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Çizelge 4.11 10mg/L Amfoterisin B içeren PALCAM Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	PALCAM	10 mg/LAmp.B	İzolat No	PALCAM	10 mg/LAmp.B
43 <i>L.m.</i>	8,99	8,99	5 <i>L. inn.</i>	8,28	8,28
44 <i>L.m.</i>	8,51	8,48	6 <i>L. inn.</i>	8,40	8,40
48 <i>L.m.</i>	8,67	8,66	7 <i>L. inn.</i>	8,30	8,32
51 <i>L.m.</i>	8,70	8,72	22 <i>L. inn.</i>	8,80	8,81
56 <i>L.m.</i>	8,99	8,99	27 <i>L. inn.</i>	8,49	8,49
58 <i>L.m.</i>	8,04	8,11	41 <i>L. inn.</i>	8,26	8,28
62 <i>L.m.</i>	8,71	8,69	42 <i>L. inn.</i>	8,68	8,67
78 <i>L.m.</i>	8,83	8,81	47 <i>L. inn.</i>	8,67	8,68
86 <i>L.m.</i>	8,28	8,30	55 <i>L. inn.</i>	8,52	8,53
92 <i>L.m.</i>	8,11	8,11	87 <i>L. inn.</i>	8,08	8,08
99 <i>L.m.</i>	8,11	8,08	88 <i>L. inn.</i>	8,49	8,43
101 <i>L.m.</i>	8,56	8,54	104 <i>L. inn.</i>	8,18	8,18
103 <i>L.m.</i>	8,30	8,28	105 <i>L. inn.</i>	7,78	7,77
107 <i>L.m.</i>	8,04	8,08	8 <i>L. wel.</i>	8,97	8,97
ATCC <i>L.m.</i>	8,70	8,70	57 <i>L. wel.</i>	7,96	7,97
RSHM <i>L.m.</i>	8,36	8,30	59 <i>L. wel.</i>	8,26	8,28
Viyana <i>L.m.</i>	8,98	8,98	73 <i>L. wel.</i>	8,28	8,26
1483 <i>L.m.</i>	8,59	8,59	80 <i>L. wel.</i>	8,54	8,52
31 <i>Bac.</i>	7,11	7,23	85 <i>L. wel.</i>	8,72	8,72
36 <i>Bac.</i>	7,11	7,20	97 <i>L. wel.</i>	8,69	8,62
45 <i>Bac.</i>	7,43	7,40	98 <i>L. wel.</i>	8,45	8,43
46 <i>Bac.</i>	7,45	7,48	106 <i>L. wel.</i>	8,79	8,79
50 <i>Bac.</i>	6,93	6,93	25 <i>L. seel.</i>	8,30	8,30
52 <i>Bac.</i>	7,64	7,60	54 <i>L. seel.</i>	8,34	8,34
60 <i>Bac.</i>	7,45	7,38	89 <i>L. seel.</i>	8,15	8,11
61 <i>Bac.</i>	7,93	7,91	100 <i>L. seel.</i>	8,49	8,49
77 <i>Bac.</i>	7,79	7,80	91 <i>L. grayi</i>	8,85	8,84
81 <i>Bac.</i>	8,42	8,42	84 Gr+ çb.	8,99	8,97
102 <i>Bac.</i>	5,90	5,89	63 maya	7,70	<1,00
64 <i>Staph.</i>	4,20	4,20	65 maya	6,61	<1,00
74 <i>Staph.</i>	8,15	8,18	66 maya	7,28	<1,00
83 <i>Staph.</i>	3,74	3,71	67 maya	7,34	<1,00

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp.,
 Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

4.2.3 Seftazidimin *L. monocytogenes* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

İnhibisyon çalışmasının birinci aşamasında kullanılan seftazidimin disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyogram test sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde *L. monocytogenes* 'in bütün suşlarının seftazidime karşı duyarlılıklarının

aynı olmadığı görülmüş bu farklılığın istatistik olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. *L. innocua* ise seftazidimden hiç etkilenmemiştir. Seftazidim *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* gelişimini etkilememiştir. Çizelge 4.12'de de görüldüğü gibi seftazidim daha çok *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. ve kısmen de *Enterococcus* spp. üzerine etkilidir. NCCLS'ye göre 30µg seftazidim içeren disklerle yapılan antibiyogram sonucunda *Staphylococcus* spp. için ≤ 14 mm zon çapı dirençli, 15-17 mm orta derece duyarlı, ≥ 18 mm duyarlıdır (NCCLS 2002). Buna göre 100 mg/L seftazidim kullanımının *Listeria* türleri ve maya hariç diğer bütün refakatçi flora üzerine etkili olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.12 Seftazidim antibiyogram test sonuçları (µg/disk; mm zon çapı)

İzolat No	Seftazidim (µg/disk, mm zon çapı)									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
51 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
99 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L.m</i> ATCC.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
86 <i>L.m.</i>	7	8	10	11	12,5	13	13,5	14	14,5	15
92 <i>L.m.</i>	7	8	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	14
5 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
55 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25 <i>L. seel.</i>	–	7	8	9	10	10,5	11	11,5	11,5	12
73 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–	8	8	8	8	9	10
91 <i>L. grayi</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
64 <i>Staph.</i>	7	10	13	14	14	18	19	19	20	21
74 <i>Staph.</i>	15	16	18	20	21	24	25	26	27	28
83 <i>Staph.</i>	14	19	20	21	22	22	23	24	25	26
24 <i>E. faec.</i>	–	9	10	12	13	13	14	15	16	16
96 <i>E. faec.</i>	–	–	8	10	11	12	13	14	15	16
84 Gr+ çb.	7	9	10	11	13	14	14,5	15	16	17
36 <i>Bac.</i>	–	8	9,5	11	12	12	12	12	12	13
77 <i>Bac.</i>	–	8	9	10	10	10	10	10	10	11
102 <i>Bac.</i>	–	7	8	9	10	14	15	15	16	18
63 maya	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp.,
E. faec. *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Farklı oranlarda (20-60-100 mg/L) seftazidim içeren PALCAM Agarda sayım sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir. Buna göre, refakatçi flora sayısının 20 ve 60 mg/L seftazidim varlığında azaldığı, 100 mg/L'de ise refakatçi floranın tamamen inhibe olduğu, *L. monocytogenes* 'in ise 100 mg/L seftazidimden etkilenmediği görülmüştür.

Çizelge 4.13 Kontrol (20 mg/L), 60 mg/L ve 100 mg/L seftazidim içeren PALCAM Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	Kontrol	S 60	S 100	İzolat No	Kontrol	S 60	S 100
51 <i>L.m.</i>	8,58	8,58	8,58	73 <i>L. wel.</i>	7,81	7,66	6,65
99 <i>L.m.</i>	7,26	7,26	7,21	91 <i>L. grayi</i>	8,43	8,32	8,32
ATCC <i>L.m.</i>	7,67	6,91	6,91	36 <i>Bac.</i>	7,18	5,04	2,3
5 <i>L. inn.</i>	8,40	8,40	8,40	64 <i>Staph.</i>	3,04	2,71	<1,0
25 <i>L. seel.</i>	8,78	8,51	8,46	84 Gr+ çb.	9,34	3,48	<1,0

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp.,
Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakterisi

Bu sonuçlara göre seftazidimin PALCAM Agar besiyerine 100 mg/L oranda katılmasına karar verilmiştir. Kontrol ve 100 mg/L seftazidim içeren PALCAM Agardaki sayım sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir. Bu verilerin istatistik analizleri sonucunda PALCAM Agarda 100 mg/L seftazidim kullanımının *L. monocytogenes* izolatlarına karşı etkisinin önemli olmadığı ancak 57, 59, 73, 85, 98 ve 106 nolu *L. welshimeri* ve 54, 89 ve 100 nolu *L. seeligeri* izolatlarının kontrol ile S 100 arasındaki farkları istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Selektif katı besiyerinde 100 mg/L oranında seftazidim kullanımının *L. welshimeri* ve *L. seeligeri*'nin bazı suşları üzerine inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür. Bu sonuç inhibisyon çalışmasının ikinci aşaması için önemli bulunmuştur.

Fraser Broth besiyerinde seftazidimin hangi oranda kullanılacağını belirlemek için 92 nolu *L. monocytogenes* izolatı ile yürütülen çalışmada 6 farklı oranda seftazidim ile kontrol kullanılmış ve sonuçta TSYE, PALCAM ve S 60 Agar besiyerlerinin her üçünde de 30 mg/L'den sonra farkın istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.15). TSYE, PALCAM ve S 60 Agarda kontrol ile 10 ve 20 mg/L seftazidim kullanımı arasındaki fark ile seftazidimin 10, 20 ve 30 mg/L kullanımı arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmamış ancak 40 mg/L seftazidimin kontrol ve diğer ilk üç konsantrasyon (10, 20, 30 mg/L) ile aralarındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bu nedenle Fraser Brothta seftazidimin kullanımı 30 mg/L ile sınırlandırılmıştır.

Çizelge 4.14 Kontrol 20 mg/L ve 100mg/L seftazidim içeren PALCAM Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	Kontrol	S 100	İzolat No	Kontrol	S 100
43 <i>L.m.</i>	8,99	8,98	5 <i>L. inn.</i>	8,28	8,23
44 <i>L.m.</i>	8,51	8,49	6 <i>L. inn.</i>	8,40	8,36
48 <i>L.m.</i>	8,67	8,66	7 <i>L. inn.</i>	8,30	8,28
51 <i>L.m.</i>	8,70	8,68	22 <i>L. inn.</i>	8,80	8,79
56 <i>L.m.</i>	8,99	8,99	27 <i>L. inn.</i>	8,49	8,45
58 <i>L.m.</i>	8,04	8,04	41 <i>L. inn.</i>	8,26	8,26
62 <i>L.m.</i>	8,71	8,68	42 <i>L. inn.</i>	8,68	8,57
78 <i>L.m.</i>	8,83	8,82	47 <i>L. inn.</i>	8,67	8,56
86 <i>L.m.</i>	8,28	6,70	55 <i>L. inn.</i>	8,52	8,51
92 <i>L.m.</i>	8,11	6,70	87 <i>L. inn.</i>	8,08	8,00
99 <i>L.m.</i>	8,11	8,04	88 <i>L. inn.</i>	8,49	8,40
101 <i>L.m.</i>	8,56	8,52	104 <i>L. inn.</i>	8,18	8,18
103 <i>L.m.</i>	8,30	7,48	105 <i>L. inn.</i>	7,78	7,76
107 <i>L.m.</i>	8,04	8,04	8 <i>L. wel.</i>	8,97	8,89
ATCC <i>L.m.</i>	8,70	8,70	57 <i>L. wel.</i>	7,96	6,93
RSHM <i>L.m.</i>	8,36	8,30	59 <i>L. wel.</i>	8,26	7,94
Viyana <i>L.m.</i>	8,98	8,97	73 <i>L. wel.</i>	8,28	7,78
1483 <i>L.m.</i>	8,59	8,56	80 <i>L. wel.</i>	8,54	8,53
31 <i>Bac.</i>	7,11	<1,00	85 <i>L. wel.</i>	8,72	8,65
36 <i>Bac.</i>	7,11	<1,00	97 <i>L. wel.</i>	8,69	8,68
45 <i>Bac.</i>	7,43	<1,00	98 <i>L. wel.</i>	8,45	8,04
46 <i>Bac.</i>	7,45	<1,00	106 <i>L. wel.</i>	8,79	8,65
50 <i>Bac.</i>	6,93	<1,00	25 <i>L. seel.</i>	8,30	8,20
52 <i>Bac.</i>	7,64	<1,00	54 <i>L. seel.</i>	8,34	7,54
60 <i>Bac.</i>	7,45	<1,00	89 <i>L. seel.</i>	8,15	7,67
61 <i>Bac.</i>	7,93	<1,00	100 <i>L. seel.</i>	8,49	8,11
77 <i>Bac.</i>	7,79	<1,00	91 <i>L. grayi</i>	8,85	8,81
81 <i>Bac.</i>	8,42	<1,00	84 Gr+ çb.	8,99	<1,00
102 <i>Bac.</i>	5,90	<1,00	63 maya	7,70	7,65
64 <i>Staph.</i>	4,20	<1,00	65 maya	6,61	6,59
74 <i>Staph.</i>	8,15	<1,00	66 maya	7,28	7,23
83 <i>Staph.</i>	3,74	<1,00	67 maya	7,34	7,32

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp., Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakterisi

Seftazidimin MİK değerleri BSAC'de Enterobacteriaceae için 0,004-128 mg/L, *Pseudomonas* spp. için 0,25-128 mg/L, *Bacillus fragilis* için 4-128 mg/L, *Staphylococcus* spp. için 2-128 mg/L ve *Enterococcus* spp. için de 0,12-128 mg/L olarak verilmiştir (Andrews 2001b).

Çizelge 4.15 92 nolu *L. monocytogenes* izolatının farklı oranlarda seftazidim içeren Fraser Brothtaki sayım sonuçları S 60 (60 mg/L seftazidim içeren PALCAM)

İzolat No	TSYE log kob/mL	PALCAM log kob/mL	S 60 log kob/mL
Kontrol	8,56	8,56	8,56
92/10	8,54	8,54	8,48
92/20	8,53	8,56	8,43
92/30	8,51	8,53	8,43
92/40	8,43	8,43	8,15
92/50	8,46	8,43	8,08
92/60	8,43	8,42	8,08

4.2.4 Fosfomisin *L. monocytogenes* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

Fosfomisin'in inhibisyon etkisi *Listeria* türleri arasında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle fosfomisin kullanımının *L. monocytogenes* analizinde diğer *Listeria* türlerinin inhibisyonu için önemli olduğu düşünülmüştür. Çizelge 4.16'da fosfomisin'in antibiyogram test sonuçları verilmiştir. Fosfomisin'in 50 µg kullanımı, 25 nolu *L. seeligeri*, 73 nolu *L. welshimeri*, 83 nolu *Staphylococcus* spp., 24 ve 96 nolu *E. faecalis* ve 36, 77 ve 102 nolu *Bacillus* spp. izolatları için etkili olmuş ve bu etki istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Fosfomisin kullanımını *L. monocytogenes* analizinde diğer *Listeria* türlerinin inhibisyonu için önemlidir. Yapılan ön deneme sonucunda fosfomisin'in *L. seeligeri* sayısında yaklaşık 2 log birimlik bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Çizelge 4.17'de fosfomisin ön denemesinin sonuçları verilmiştir. Fosfomisin'in inhibisyon etkisi *Listeria* türleri arasında değişiklik göstermektedir.

Çizelge 4.16 Fosfomisinin antibiyogram test sonuçları ($\mu\text{g}/\text{disk}$; mm zon çapı)

İzolot No	Fosfomisin ($\mu\text{g}/\text{disk}$, mm zon çapı)					
	10	50	100	150	200	250
51 <i>L.m.</i>	–	11	12	14	15	18
99 <i>L.m.</i>	–	–	–	11	12	13
ATCC. <i>L.m</i>	–	11	14	16	18	20
86 <i>L.m.</i>	–	–	–	14	15	18
92 <i>L.m.</i>	–	–	–	11	16	19
5 <i>L. inn.</i>	–	13	15	16	17	19
55 <i>L. inn.</i>	–	–	11	14	17	19
25 <i>L. seel.</i>	10	22	24	30	32	34
73 <i>L. wel.</i>	9	20	25	26	27	28
91 <i>L. grayi</i>	–	12	17	18	19	20
64 <i>Staph.</i>	–	9	10	12	12	12
74 <i>Staph.</i>	7	7	7	7	7	7
83 <i>Staph.</i>	17	22	24	28	30	32
24 <i>E. faec.</i>	12	20	24	25	26	27
96 <i>E. faec.</i>	14	22	26	28	30	32
84 Gr+ çb.	–	–	–	–	–	–
36 <i>Bac.</i>	20	22	24	25	26	28
77 <i>Bac.</i>	20	21	23	24	26	28
102 <i>Bac.</i>	–	14	16	18	19	20
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp.,
E. faec. *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Çizelge 4.17 Kontrol, 50 mg/L ve 100 mg/L fosfomisin içeren Fraser Broth ve PALCAM Agar besiyerlerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

İzolot No	Fraser Broth	log/mL			
		TSYA	PALCAM	P+50 Fs	P+100 Fs
51 <i>L.m</i>	FB	8,63	8,62	8,62	8,62
	FB+50 Fs	8,28	8,26	8,23	8,18
	FB+100 Fs	7,86	7,76	7,75	7,74
25 <i>L. seel.</i>	FB	8,58	8,57	8,26	8,23
	FB+50 Fs	7,34	7,30	7,28	7,23
	FB+100 Fs	6,30	6,28	6,18	6,18
73 <i>L. wel.</i>	FB	8,58	8,57	8,53	8,51
	FB+50 Fs	7,32	7,28	7,23	7,18
	FB+100 Fs	6,52	6,48	6,48	6,43
91 <i>L. grayi</i>	FB	8,61	8,60	8,58	8,28
	FB+50 Fs	8,20	8,18	8,15	8,11
	FB+100 Fs	7,53	7,51	7,48	7,45

L.m. *Listeria monocytogenes*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*

51 nolu *L. monocytogenes* izolatu için zenginleştirme besiyeri olarak 50 mg/L fosfomisin içeren Fraser Broth (FB+50 Fs) veya 100 mg/L fosfomisin içeren Fraser Broth (FB+100 Fs) kullanıldığı zaman TSYA ile 100 mg/L fosfomisin içeren PALCAM (P+100 Fs) katı besiyerleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuş ($p<0,05$) ancak PALCAM, 50 mg/L fosfomisin içeren PALCAM (P+50 Fs) ve P+100 Fs arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Kontrol amaçlı olarak fosfomisin ilave edilmeden kullanılan Fraser Broth için katı besiyerleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Bütün izolatlarda P+50 Fs veya P+100 Fs kullanıldığı zaman kontrol Fraser Broth, FB+50 Fs ve FB+100 Fs arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.17'de görüldüğü gibi 25 nolu *L. seeligeri* izolatu için FB+50 Fs ve FB+100 Fs için TSYA ile PALCAM arasındaki fark önemsizken P+50 Fs ve P+100 Fs ile diğer iki besiyeri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Benzer şekilde P+50 Fs veya P+100 Fs kullanıldığı zaman kontrol Fraser Broth, FB+50 Fs ve FB+100 Fs arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

73 nolu *L. welshimeri* izolatu için FB+50 Fs için TSYA, PALCAM ve P+50 Fs arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmazken P+100 Fs ile TSYA ve PALCAM arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

91 nolu *L. grayi* izolatında ise FB+50 Fs için PALCAM, P+50 ve P+100 arasındaki fark önemsiz bulunmuş ancak FB+100 Fs için PALCAM ile P+100 arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Bu çalışmanın sonuçları ışığında fosfomisin antibiyotığının katı besiyerinde 100 mg/L'den daha yüksek oranda kullanılabileceği görülmüş ve 200 mg/L oranında selektif besiyerinde kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda her iki besiyeri arasında *L. monocytogenes* için önemli bir fark oluşmamış ancak 25, 54, 89 ve 100 nolu *L. seeligeri* izolatları ve 73, 87 nolu *L. welshimeri* izolatları için PALCAM ile 200 mg/L fosfomisin içeren selektif besiyeri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.18 200 mg/L Fosfomisin kullanımının katı besiyerinde *Listeria* spp. üzerine etkisi (log kob/mL)

İzolot No	PALCAM	Fosf-200	İzolot No	PALCAM	Fosf-200
43 <i>L.m.</i>	8,48	8,48	27 <i>L. inn.</i>	8,74	8,62
44 <i>L.m.</i>	8,52	8,45	41 <i>L. inn.</i>	8,94	8,94
48 <i>L.m.</i>	8,53	8,48	47 <i>L. inn.</i>	8,71	8,73
51 <i>L.m.</i>	8,61	8,60	87 <i>L. inn.</i>	8,77	8,69
56 <i>L.m.</i>	8,54	8,52	88 <i>L. inn.</i>	8,78	8,77
58 <i>L.m.</i>	8,68	8,52	104 <i>L. inn.</i>	8,82	8,83
62 <i>L.m.</i>	8,46	8,45	8 <i>L. wel.</i>	8,45	8,11
78 <i>L.m.</i>	8,46	8,43	57 <i>L. wel.</i>	8,71	8,59
86 <i>L.m.</i>	8,48	8,45	59 <i>L. wel.</i>	8,38	8,38
92 <i>L.m.</i>	8,48	8,26	73 <i>L. wel.</i>	8,59	7,26
99 <i>L.m.</i>	8,58	8,51	80 <i>L. wel.</i>	8,36	7,76
101 <i>L.m.</i>	8,75	8,72	85 <i>L. wel.</i>	8,74	8,61
103 <i>L.m.</i>	8,52	8,49	97 <i>L. wel.</i>	8,20	8,18
107 <i>L.m.</i>	7,26	7,20	98 <i>L. wel.</i>	8,20	8,11
ATCCL. <i>m.</i>	8,11	8,15	106 <i>L. wel.</i>	8,45	8,43
RSHM <i>L.m.</i>	8,78	8,77	25 <i>L. seel.</i>	8,58	2,30
Viyana <i>L.m.</i>	8,52	8,49	54 <i>L. seel.</i>	8,40	2,70
1483 <i>L.m.</i>	8,48	8,45	89 <i>L. seel.</i>	8,43	2,30
7 <i>L. inn.</i>	8,85	8,84	100 <i>L. seel.</i>	8,41	2,48
22 <i>L. inn.</i>	8,83	8,83	91 <i>L. grayi</i>	8,45	8,51

Ancak denemeler sonucunda fosfomisin seftazidim ile birlikte kullanıldığı zaman selektif katı besiyerinde *L. monocytogenes* 'i inhibe ettiği görülmüştür. Bu yüzden tek başına kullanımı denenmiş ancak fosfomisinin refakatçi florayı baskılayamaması nedeniyle selektif katı besiyerinde kullanılamamıştır.

4.2.5. Diğer antibiyotiklerin etkisi

Moksalaktam da sefalosporin grubu bir antibiyotiktir ve bazı Gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olmakla birlikte daha çok Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkilidir. Moksalaktamın antibiyogram test sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir. Moksalaktamın PALCAM Agarda seftazidim yerine 20 mg/L oranında kullanılabileceği belirtilmiştir. *Enterococcus* spp.'nin hepsi bu antibiyotiğe dirençlidir. NCCLS'ye (2002) göre 30 µg moksalaktam içeren disklerle yapılan antibiyogram sonucunda Enterobacteriaceae ve *Staphylococcus* spp. için ≤ 14 mm zon çapı dirençli, 15-22 mm orta derece duyarlı, ≥ 23 mm ise duyarlıdır. Bu bilgiler ışığında

Çizelge 4.19 incelendiği zaman moksalaktamın refakatçi bakteriye inhibisyon etkisinin iyi olduğu söylenebilir. Moksalaktamın *L. monocytogenes* 'e etkisi sınırlı iken 36, 77 ve 102 nolu *Bacillus* spp. izolatlarına, 64 ve 74 nolu *Staphylococcus* spp.'ye karşı etkisinin istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ancak seftazidimden beklenen etki görüldüğü için moksalaktamın ancak seftazidime alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.19 Moksalaktamın antibiyogram test sonuçları ($\mu\text{g/disk}$; mm zon çapı)

İzolot No	Moksalaktam ($\mu\text{g/disk}$, mm zon çapı)					
	20	30	40	50	60	70
51 <i>L.m.</i>	–	7	8	9	10	12
99 <i>L.m.</i>	8	9	11	12	14	15
<i>L.m</i> ATCC	–	8	10	11	12	14
86 <i>L.m.</i>	8	9	10	11	12	13
92 <i>L.m.</i>	7	8	9	10	13	15
5 <i>L. inn.</i>	–	–	7	9	10	12
55 <i>L. inn.</i>	–	9	10	11	13	15
25 <i>L. seel.</i>	9	10	12	13	14	16
73 <i>L. wel.</i>	–	7	8	9	11	13
91 <i>L. grayi</i>	–	7	8	9	11	13
64 <i>Staph.</i>	12	13	14	15	16	20
74 <i>Staph.</i>	19	21	23	24	25	29
83 <i>Staph.</i>	8	11	12	13	15	17
24 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	12
96 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	–
84 Gr+ çb.	9	10	11	14	15	16
36 <i>Bac.</i>	18	18,5	19	19,5	20	21
77 <i>Bac.</i>	15	17	19	20	21	22
102 <i>Bac.</i>	21	22	23	23,5	24	25
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp.,
E. faec. *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Genel olarak Gram negatif mikroorganizmaların inhibisyonu için kullanılan nalidiksik asit antibiyogram test sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir. Nalidiksik asit Fraser Broth besiyerinde 10-20 mg/L oranında kullanılmaktadır. Çizelge 4.20'de de görüldüğü gibi nalidiksik asidin *L. monocytogenes* 'e karşı herhangi bir inhibisyon etkisi bulunmamaktadır. Nalidiksik asidin 36, 77 ve 102 nolu *Bacillus* spp. izolatlarına karşı inhibisyon etkisi istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Yapılan Duncan testi

sonucunda 36 ve 102 nolu izolatlar için 20 µg ile 30 µg arasındaki fark önemli bulunmazken 20 µg ile 40 µg arasındaki fark önemli bulunmuştur. 77 nolu izolat için ise 20 µg ile 30 µg arasındaki fark önemli bulunmuştur. NCCLS'ye göre 30µg nalidiksik asit içeren disklerle yapılan antibiyogram sonucunda Enterobacteriaceae için ≤ 13 mm zon çapı dirençli, 14-18 mm orta duyarlı ve ≥ 19 mm iken *Enterococcus* spp. için ≤ 17 mm zon çapı dirençli, ≥ 18 mm ise duyarlıdır. Nalidiksik asidin *Bacillus fragilis* için MİK değeri ise 32-64 mg/L'dir (NCCLS 2002). İzolasyon çalışmaları sırasında Gram negatif mikroorganizmaya rastlanmadığı için nalidiksik asit kullanım oranının yeterli olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.20 Nalidiksik asidin antibiyogram test sonuçları (µg/disk; mm zon çapı)

İzolat No	Nalidiksik asit (µg/disk, mm zon çapı)				
	20	30	40	50	100
51 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–
99 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–
<i>L.m</i> ATCC	–	–	–	–	–
86 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–
92 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–
5 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–
55 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–
25 <i>L. seel.</i>	–	–	–	–	–
73 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–	–
91 <i>L. grayi</i>	–	–	–	–	–
64 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–
74 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–
83 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–
24 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–
96 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–
84 Gr+ çb.	–	–	–	–	–
36 <i>Bac.</i>	16	19	20	23	26
77 <i>Bac.</i>	15	18	19	21	27
102 <i>Bac.</i>	14	15	16	17	20
63 maya	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac. Bacillus* spp., *Staph. Staphylococcus* spp., *E. faec.* *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Polimiksin B sülfat daha çok Gram negatif bakteriler için etkili olduğu için çalışmada kullanılan Gram pozitif izolatlar için önemli bir etki beklenmemiştir. Ancak izolatların polimiksin B sülfattan ne oranda etkilendiğini belirlemek için antibiyogram testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.21'de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi

polimiksin B sülfatın *L. monocytogenes* gelişimine etkisi yok denecek kadar azdır. Özellikle kullanımı düşünülen aralık olan 50 ve 100 µg polimiksin B sülfatın hiç zon oluşturmadığı görülmüştür. Yapılan istatistik analiz sonucunda özellikle 74 ve 64 nolu *Staphylococcus* spp izolatları, 25 nolu *L. seeligeri* ve 84 nolu Gram pozitif çubuk bakteri için polimiksin B sülfatın etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$). İzolasyon çalışmaları sırasında Gram negatif mikroorganizmaya rastlanmadığı için nalidiksik asitte olduğu gibi polimiksin B sülfatın da kullanım oranının yeterli olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.21 Polimiksin B sülfatın antibiyogram test sonuçları (µg/disk; mm zon çapı)

İzolat No	Polimiksin B Sülfat (IU/disk, mm zon çapı)					
	50	100	150	200	250	300
51 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	7	7
99 <i>L.m.</i>	–	7	8	9	9,5	10
<i>L.m</i> ATCC	–	–	–	7	8	9
86 <i>L.m.</i>	–	–	7	8	9	10
92 <i>L.m.</i>	–	–	7	8	10	10,5
5 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–
55 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	8
25 <i>L. seel.</i>	10,5	11	11,5	12	14	16
73 <i>L. wel.</i>	–	–	7	8	9	11
91 <i>L. grayi</i>	–	–	–	–	8	11
64 <i>Staph.</i>	9	12	13	14	15	16
74 <i>Staph.</i>	15	17,5	18	19	20	23
83 <i>Staph.</i>	–	7	9	10	11	12
24 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	–
96 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	–
84 Gr+ çb.	10	12	13	14	15	16
36 <i>Bac.</i>	–	6,5	8	9,5	10	11
77 <i>Bac.</i>	–	7	8	8,5	9	10
102 <i>Bac.</i>	–	–	7	7	7,5	8
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac. Bacillus* spp., *Staph. Staphylococcus* spp., *E. faec.* *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Sefiksimin antibiyogram test sonuçları Çizelge 4.22'de verilmiştir. Sefiksimin *L. monocytogenes* izolatlarına karşı inhibisyon etkisi görülmemiştir. Özellikle 24 ve 96 nolu *E. faecalis* izolatları için sefiksimin etkisi istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Sefiksimin refakatçi bakteri inhibisyonu açısından etkisi zayıf bulunmuştur. Ancak 128 µg'dan sonra refakatçi bakteri inhibisyonu görülmeye başlanmıştır.

Çizelge 4.22 Sefiksimin antibiyogram test sonuçları (µg/disk; mm zon çapı)

İzolat No	Sefiksim (µg/disk, mm zon çapı)					
	4	8	16	32	64	128
51 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
99 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
<i>L.m.</i> ATCC	–	–	–	–	–	–
86 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
92 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
5 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–
55 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–
25 <i>L. seel.</i>	–	–	–	–	–	–
73 <i>L. wel.</i>	–	–	8	10	12	14
91 <i>L. grayi</i>	–	–	–	–	9	11
64 <i>Staph.</i>	8	9	10	12	13	20
74 <i>Staph.</i>	7	8	9	12	13	16
83 <i>Staph.</i>	–	–	9	12	14	16
24 <i>E. faec.</i>	12	14	15	16	19	22
96 <i>E. faec.</i>	10	12	14	16	18	20
84 Gr+ çb.	–	–	–	–	–	15
36 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	–	–
77 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	–	14
102 <i>Bac.</i>	–	–	–	–	–	15
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp.,
E. faec. *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Çizelge 4.23'de sefiksim tellurit antibiyogram test sonuçları verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi sefiksim tellurit kullanımının *Listeria* spp. izolatları üzerine inhibisyon etkisi olmamıştır. Yapılan istatistik analiz sonucunda 36, 77 ve 102 nolu *Bacillus* spp. izolatları için sefiksim tellurit etkisi önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Sefiksim tellurit 36, 77 ve 102 nolu *Bacillus* spp. izolatları için her konsantrasyondaki etkisi diğerinden Duncan testi sonucunda önemli bulunmuştur.

Seftazidim gibi 3. kuşak sefalosporin grubunda yer alan sefiksim ve sefiksim-tellurit ile ilgili antibiyogram test sonuçlarının verildiği Çizelge 4.22 ve Çizelge 4.23 incelendiğinde, sefiksim tek başına 128 mg/L oranında kullanıldığında bazı *Staphylococcus* spp. ve *Enterococcus* spp. üzerine etkili olurken tellurit ile birlikte kullanıldığında sadece *Bacillus* spp. üzerine etkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle sefiksimin ve sefiksim-tellurit karışımının refakatçi bakterinin inhibisyonunda kayda değer bir etkisi yoktur. NCCLS'ye göre 5µg sefiksim içeren disklerle yapılan

antibiogram sonucunda *Streptococcus* spp. için ≤ 19 mm zon çapı dirençli, ≥ 20 mm ise duyarlıdır (NCLLS 2002).

Çizelge 4.23 Sefiksim telluritinin antibiogram test sonuçları ($\mu\text{g}/\text{disk}$; mm zon çapı)

İzolot No	Sefiksim tellurit ($\mu\text{g}/\text{disk}$, mm zon çapı)					
	0,0125	0,025	0,05	0,625	0,125	0,25
51 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
99 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
<i>L.m</i> ATCC	–	–	–	–	–	–
86 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
92 <i>L.m.</i>	–	–	–	–	–	–
5 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–
55 <i>L. inn.</i>	–	–	–	–	–	–
25 <i>L. seel.</i>	–	–	–	–	–	–
73 <i>L. wel.</i>	–	–	–	–	–	–
91 <i>L. grayi</i>	–	–	–	–	–	–
64 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–	–
74 <i>Staph.</i>	7	7	7	7	7	8
83 <i>Staph.</i>	–	–	–	–	–	–
24 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	9	11
96 <i>E. faec.</i>	–	–	–	–	–	–
84 Gr+ çb.	–	–	–	7	7	7
36 <i>Bac.</i>	10	13	15	16	17	20
77 <i>Bac.</i>	12	14	15	16	19	24
102 <i>Bac.</i>	11	15	16	18	21	26
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac.* *Bacillus* spp., *Staph.* *Staphylococcus* spp., *E. faec.* *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Akriflavinin antibiogram test sonuçları Çizelge 4.24'de verilmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda 51 ve 99 nolu *L. monocytogenes* izolatları için akriflavinin etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca farklı konsantrasyonların etkisinin araştırıldığı duncan testi sonucunda her konsantrasyonun etkisinin diğerinden farklı olarak önemli olduğu görülmüştür. 25 μg akriflavin kullanımının 86, 92 ve ATCC *L. monocytogenes* izolatları için inhibisyon etki görülmezken diğer konsantrasyonlar için oluşan etki istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Akriflavinin Gram pozitif koklar özellikle de *Enterococcus* spp. üzerine inhibisyon etkisi olmakla birlikte bu etki stabil değildir. 24 ve 92 nolu *E. faecalis* izolatları için de akriflavinin etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 74 nolu *Staphylococcus* spp. izolatı için 25 ve 50 μg akriflavin

kullanımının inhibisyon etkisi görülmemiştir. Ayrıca 36, 77 ve 102 nolu *Bacillus* izolatları için de akriflavinin inhibisyon etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.24 Akriflavinin antibiyogram test sonuçları ($\mu\text{g/disk}$; mm zon çapı)

İzolat No	Akriflavin ($\mu\text{g/disk}$, mm zon çapı)					
	25	50	100	200	300	400
51 <i>L.m.</i>	6,5	7	8	10	12	13
99 <i>L.m.</i>	6,5	7	9	11	12	13
ATCC <i>L.m</i>	–	–	8	10	11	12
86 <i>L.m.</i>	–	–	8	10	11	13
92 <i>L.m.</i>	–	7	9	10	11	12
5 <i>L. inn.</i>	–	7	8	10	11	12
55 <i>L. inn.</i>	–	–	7	10	12	14
25 <i>L. seel.</i>	–	7	8	9	11	12
73 <i>L. wel.</i>	–	7	7	8	9	10
91 <i>L. grayi</i>	7	8	9	10	12	14
64 <i>Staph.</i>	7	8	9	10	12	14
74 <i>Staph.</i>	–	–	8	9	12	14
83 <i>Staph.</i>	8	10	14	16	17	18
24 <i>E. faec.</i>	11	13	15	18	19	20
96 <i>E. faec.</i>	13	14	15	18	19	20
84 Gr+ çb.	19	20	24	26	29	32
36 <i>Bacillus</i>	9	11	12	13	15	17
77 <i>Bacillus</i>	–	11	12	13	15	17
102 <i>Bacillus</i>	7	8	10	11	12	13
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*,
L. seel. *Listeria seeligeri*, *Bac. Bacillus* spp., *Staph. Staphylococcus* spp.,
E. faec. *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Çalışmanın bundan sonrasında inhibisyonun ikinci aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada hedef bakteri olan *L. monocytogenes* dışında kalan diğer *Listeria* türlerinin (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*) inhibisyonu için fosfomisin, fusidik asit ve rifampisin antibiyotikleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.25'de fusidik asidin antibiyogram test sonucu verilmiştir. Fusidik asidin 51, 99, ATCC, 86 ve 92 nolu *L. monocytogenes* izolatlarına karşı etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 51 ve ATCC izolatları için 4 ve 8 μg fusidik asit kullanımı arasındaki fark önemli bulunmazken 4 ile 16 μg fusidik asit kullanımı

arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 99 nolu izolat için ise her konsantrasyon arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 5 nolu *L. innocua* ve 25 nolu *L. seeligeri*, 73 nolu *L. welshimeri* ve 91 nolu *L. grayi* izolatlarına karşı oluşan etki ve konsantrasyonlar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Fusidik asit 74 ve 83 nolu *Staphylococcus* spp. ve 84 nolu Gram pozitif çubuk bakteri izolatları için oldukça etkili olduğu görülmüştür. Ancak *L. monocytogenes* gelişimini etkilemesi kullanımını sınırlandırmaktadır.

Çizelge 4.25 Fusidik asidin etkisi ($\mu\text{g/disk}$; mm zon çapı)

İzolat No	Fusidik asit ($\mu\text{g/disk}$, mm zon çapı)					
	4	8	16	32	64	128
51 <i>L.m.</i>	11	14	16	18	19	20
99 <i>L.m.</i>	12	13	14	15	17	18
ATCC. <i>L.m</i>	11	12	13	14	15	16
86 <i>L.m.</i>	12	14	16	17	18	20
92 <i>L.m.</i>	10	12	16	20	22	24
5 <i>L. inn.</i>	16	19	20	21	22	24
55 <i>L. inn.</i>	12	15	17	19	20	22
25 <i>L. seel.</i>	14	16	18	19	20	22
73 <i>L. wel.</i>	16	20	21	23	24	25
91 <i>L. grayi</i>	8	10	11	12	14	15
64 <i>Staph.</i>	12	15	16	17	19	20
74 <i>Staph.</i>	21	22	23	24	25	26
83 <i>Staph.</i>	29	30	31	32	33	34
24 <i>E. faec.</i>	10	12	15	16	17	18
96 <i>E. faec.</i>	15	19	20	21	22	23
84 Gr+ çb.	19	20	22	24	25	26
36 <i>Bacillus</i>	10	12	14	17	18	20
77 <i>Bacillus</i>	11	13	14	16	18	20
102 <i>Bacillus</i>	10	11	13	15	16	17
63 maya	–	–	–	–	–	–

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac. Bacillus* spp., *Staph. Staphylococcus* spp., *E. faec.* *Enterococcus faecalis*, Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Rifampisin antibiyotiğinin de etkisi *Listeria* türleri arasında değişiklik göstermektedir. Rifampisinin inhibisyon etkisinin belirlenmesi için daha önce yapılan ön çalışma sonuçlarına göre solüsyon şeklinde olan rifampisinin etkisinin değişken olduğu ve 2 deneme sonucunun tutarlı olmadığı görülmüş ve solüsyon yerine kapsül kullanımına karar verilmiştir. Kapsül şeklindeki rifampisin antibiyotiğinin de bazı *L. monocytogenes* suşları üzerine inhibisyon etkisi görüldüğü için inhibitör sisteme dahil edilmemiştir.

4.3 Geliştirilen Besiyerinden İzolatların Geri Alım Sonuçları

Bütün denemelerden elde edilen veriler ve literatür bilgileri ışığında hazırlanan zenginleştirme besiyerlerinin bileşimleri Çizelge 4.26'da, selektif katı besiyerinin ise 4.27'de verilmiştir. Daha önce yapılan deneme sonuçlarında seftazidimin 100 mg/L kullanımının bazı *L. monocytogenes* suşlarının gelişiminde indirgeyici etkisi olduğu görülmüştü. Bunun için denemede seftazidim iki farklı oranda kullanılmıştır. Bu besiyerlerinden elde edilen izolatların geri alma sonuçları Çizelge 4.28'de verilmiştir. Çizelge 4.28'den de görüldüğü gibi 100 mg/L seftazidim kullanımının *L. monocytogenes* 'i inhibe etmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.26 Bu çalışmada geliştirilen besiyerleri ve Fraser Brothun bileşenleri

Bileşenler g/L	Ön Zenginleştirme	Selektif Zenginleştirme	Fraser Broth
Kazein pepton	5,0	5,0	5,0
Et pepton	5,0	5,0	–
Proteoz pepton	–	–	5,0
NaCl	5,0	5,0	20,0
D+Glikoz	1,0	1,0	–
Maya ekstraktı	6,0	6,0	5,0
Et ekstraktı	5,0	5,0	5,0
Na-pirüvat	2,0	2,0	–
Na ₂ HPO ₄	9,2	9,2	9,6
KH ₂ HPO ₄	2,0	2,0	1,35
Eskulin	–	–	1,0
Fe(III) NH ₄ sitrat	0,5	0,5	0,4
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0	2,0	–
LiCl	3,0	10,0	3,0
Nalidiksik Asit (mg/L)	10,0	20,0	10-20
Fosfomisin (mg/L)	25,0	50,0	–
Seftazidim (mg/L)	15,0	30,0	–
Akriflavin HCl (mg/L)	–	–	12,5-25

Besiyeri bileşiminde bulunan MgSO₄.7H₂O ile Na₂HPO₄ otoklav sonrası besiyerinde çökelmeye neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle MgSO₄.7H₂O otoklav sonrası besiyeri soğuduktan sonra besiyerine eklenmiştir. Amonyum Fe(III) sitrat ise otoklav

sonrası besiyerinin rengini değiştirmekte ve bulanıklık vermektedir. Bu nedenle Amonyum Fe(III) sitrat da besiyeri soğuduktan sonra eklenmiştir. Benzer şekilde selektif zenginleştirme besiyeri bileşiminde yer alan 10 g/L oranındaki LiCl'de otoklav sırasında çökelti oluşturmaktadır. Bunun önlenmesi için de LiCl besiyerinden ayrı otoklavlanmış ve otoklav sonrası besiyerine eklenmiştir.

Çizelge 4.27 Bu çalışmada geliştirilen selektif katı besiyeri (SKB) ve PALCAM Agar bileşenleri

Bileşenler (g/L)	SKB (g/L)	PALCAM (g/L)
Et pepton	18,0	23,0
Kazein pepton	6,0	–
NaCl	5,0	5,0
Maya ekstraktı	6,0	3,0
Et ekstraktı	4,0	–
Na-pirüvat	2,0	–
D+ Glikoz	2,0	0,5
Nişasta	–	1,0
Mannitol	–	10,0
Na ₂ HPO ₄	2,5	–
MgSO ₄ .H ₂ O	0,5	–
Eskulin	0,8	0,8
Amonyum Fe(III) sitrat	0,5	0,5
Fenol red	–	0,08
Agar	13,0	13,0
LiCl	10,0	15,0
Seftazidim (mg/L)	100,0	20,0
Polimiksin B sülfat (U/L)	80.000	10,0 mg
Amfoterisin B (mg/L)	10,0	–
Akriflavin HCl (mg/L)	–	5,0

Çalışmada bileşimden hazırlanan izolasyon besiyerinde çözünme problemi görülmüş ve sebebinin eskulinin iyi çözünmemesi olduğu belirlenmiştir. Çözüm olarak kullanılan eskulin değiştirilmiş ve çalışma başka bir eskulinle tekrarlanmıştır. Sonuçta problem çözülmüştür. Bileşimden besiyeri hazırlarken besiyerine katılan her bileşen çok iyi çözünmeli ve ondan sonra diğer maddenin ilavesi gerekmektedir.

Çizelge 4.28 60 mg/L (S 60) ve 100 mg/L (S 100) seftazidim içeren selektif katı besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

İzolot No	S 60	S 100	İzolot No	S 60	S 100
43 <i>L.m.</i>	8,72	8,70	5 <i>L. inn.</i>	9,11	9,15
44 <i>L.m.</i>	9,15	9,16	6 <i>L. inn.</i>	8,94	9,14
48 <i>L.m.</i>	9,11	9,18	7 <i>L. inn.</i>	9,08	9,23
51 <i>L.m.</i>	9,08	9,15	22 <i>L. inn.</i>	9,04	9,04
56 <i>L.m.</i>	9,08	9,06	27 <i>L. inn.</i>	8,88	8,85
58 <i>L.m.</i>	9,15	9,08	41 <i>L. inn.</i>	9,10	9,08
62 <i>L.m.</i>	8,84	8,82	42 <i>L. inn.</i>	8,91	8,08
78 <i>L.m.</i>	9,20	9,18	47 <i>L. inn.</i>	8,92	8,78
86 <i>L.m.</i>	8,85	8,84	55 <i>L. inn.</i>	9,15	9,10
92 <i>L.m.</i>	8,82	8,77	87 <i>L. inn.</i>	8,97	8,91
99 <i>L.m.</i>	8,90	8,88	88 <i>L. inn.</i>	9,38	9,40
101 <i>L.m.</i>	9,04	8,99	104 <i>L. inn.</i>	9,23	9,28
103 <i>L.m.</i>	8,76	8,86	105 <i>L. inn.</i>	9,11	9,08
107 <i>L.m.</i>	8,49	8,58	8 <i>L. wel.</i>	8,97	9,00
ATCC <i>L.m.</i>	9,11	9,15	57 <i>L. wel.</i>	8,88	8,92
RSHM <i>L.m.</i>	9,08	8,99	59 <i>L. wel.</i>	9,23	9,28
Viyana <i>L.m.</i>	9,08	9,08	73 <i>L. wel.</i>	8,15	8,08
1483 <i>L.m.</i>	9,11	9,08	80 <i>L. wel.</i>	9,00	9,04
31 <i>Bac.</i>	3,73	<1,00	85 <i>L. wel.</i>	9,08	9,11
36 <i>Bac.</i>	2,60	<1,00	97 <i>L. wel.</i>	8,99	8,96
45 <i>Bac.</i>	3,78	<1,00	98 <i>L. wel.</i>	8,15	8,04
46 <i>Bac.</i>	3,68	<1,00	106 <i>L. wel.</i>	9,18	9,28
50 <i>Bac.</i>	3,81	<1,00	25 <i>L. seel.</i>	8,88	8,76
52 <i>Bac.</i>	2,80	<1,00	54 <i>L. seel.</i>	8,99	8,81
60 <i>Bac.</i>	4,36	<1,00	89 <i>L. seel.</i>	8,95	8,85
61 <i>Bac.</i>	1,70	<1,00	100 <i>L. seel.</i>	9,11	9,23
77 <i>Bac.</i>	2,18	<1,00	91 <i>L. grayi</i>	8,97	8,82
81 <i>Bac.</i>	3,72	<1,00	84 Gr+ çb.	<1,00	<1,00
102 <i>Bac.</i>	3,08	<1,00	63 maya	<1,00	<1,00
64 <i>Staph.</i>	2,00	<1,00	65 maya	<1,00	<1,00
74 <i>Staph.</i>	<1,00	<1,00	66 maya	<1,00	<1,00
83 <i>Staph.</i>	<1,00	<1,00	67 maya	<1,00	<1,00
13 <i>Ent.</i>	4,11	2,04	32 <i>Ent.</i>	3,04	1,18
19 <i>Ent.</i>	4,18	1,73	90 <i>Ent.</i>	4,15	1,57
24 <i>Ent.</i>	3,08	1,36	96 <i>Ent.</i>	4,23	2,10

L. m. *Listeria monocytogenes*, *L. inn.* *Listeria innocua*, *L. wel.* *Listeria welshimeri*, *L. seel.* *Listeria seeligeri*, *Bac. Bacillus* spp., *Staph. Staphylococcus* spp., *Ent. Enterococcus* spp. Gr+çb. Gram pozitif çubuk bakteri

Çizelge 4.28'de de görüldüğü gibi 18 adet *L. monocytogenes* izolatının S 60 ve S 100 besiyerlerindeki gelişimleri arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. *E. faecalis* 'in gelişimi açısından S 60 ve S 100 besiyerleri arasındaki fark ise istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0,05). Ayrıca refakatçi bakterilerden biri olan *Bacillus*

spp. ve *Staphylococcus* spp.'nin gelişimi de S 100 besiyerinde inhibe olmuştur. Refakatçi bakterilerin birinci aşama inhibisyonunda seftazidimin 100 mg/L kullanılmasınn büyük etkisi olmuştur.

4.4 Piyasa Taraması Sonuçları

Piyasadan toplanan 100 adet gıdada çalışmada oluşturulan sisteme ve ISO 11290-1 yöntemine göre *Listeria* analizi yapılmış ve sonuçları izelge 4.29'da, bu 100 gıdadan izole edilen 219 *Listeria* 'nın tanımlamaları ise izelge 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.29 incelendiğinde toplam 100 örneğin 63'nde *Listeria* spp.'ye rastlanmıştır. ISO yöntemiyle 33 örnekte, kurulan sistemle ise 63 örnekte *Listeria* spp. belirlenmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi bazı örneklere sadece kurulan yeni sistemde *Listeria* spp. belirlenmiştir. 100 örneğin 33'nde ISO yöntemi ve kurulan sistemin her ikisinde de *Listeria* spp. ve 6'sında da *L. monocytogenes* belirlenmiştir. 30 örnekte ise sadece kurulan sistemde *Listeria* spp.'ye rastlanmış PALCAM besiyerinde *Listeria* spp. belirlenememiştir. Sadece kurulan sistemle belirlenmiş 30 *Listeria* spp.'nin 11'i *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Sadece kurulan sistemde *Listeria* spp. belirlenme oranı % 48 iken *L. monocytogenes* bulunma oranı ise % 37'dir.

Bu sonuçlara göre kurulan sistem, ISO yöntemine göre daha iyi çalışmaktadır. Ancak istenmeyen bazı *Bacillus* spp. gelişiminin baskılanması gerektiği düşünülmektedir.

Çizelge 4.29 Piyasadan toplanan örneklerdeki *Listeria* analiz sonuçları

Gıda	Ö.No	FB	F.B.1/2	Ö. Z.	F.B.1/1 24.s	S. Z. 24.s	F.B.1/1 48.s	S. Z. 48.s
Çiğ süt 1	50	+/-/-	B	Lin	-	Lin	-	Lin
Çiğ Süt 2	51	+/+/+	B+Ls	Ls	Ls	Lm	Ls	Lm
Çiğ Süt 3	52	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Çiğ Süt 4	53	-/-/+	-	-	-	Lm	-	Lm
Çiğ Süt 5	54	-/+/+	B+L	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin
Çiğ Süt 6	55	+/+/+	RF	Lin	-	B	RF	Lin
Çiğ Süt 7	56	+/+/+	Ls	Ls	-	Ls	Ls	Ls
Çiğ Süt 8	57	+/+/+	B	Lm	-	-	-	Lm
Çiğ Süt 9	58	+/+/+	B	Lin	Lin	Lin	Lin	-
Çiğ Süt 10	59	-/+/+	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin
Çiğ Süt 11	60	-/+/+	Ls	Lm	Ls	Lm	Ls	Lm
Pastörize Süt	61	-/-/-	-	-	-	-	-	-
Beyaz Peynir 1	11	-/+/+	RF	RF	-	B	-	B
Beyaz Peynir 2	29	-/-/-	-	-	-	-	B	-
Beyaz Peynir 3	80	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Kaşar Peyniri 1	22	+/+/+	B	B	-	-	-	-
Kaşar Peyniri 2	46	+/-/-	-	-	-	-	-	-
Kaşar Peyniri 3	64	+/-/-	-	-	-	-	-	-
Tulum Peyn. 1	21	+/-/+	-	-	-	-	-	-
Tulum Peyn. 2	28	+/-/+	-	-	-	-	-	-
Lor Peyniri	19	+/-/+	B	-	-	-	B	-
Dondurma sade	72	-/+/+	-	Lin	B	-	-	-
Dond. Kakaolu	100	-/-/+	RF	-	B	-	B	-
Alman Pasta	39	+/+/+	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin
Meyveli Pasta	40	+/+/+	B	B	B	Lin	B	Lin
Kestaneli Pasta	41	-/+/+	RF	Ls	-	Ls	RF	Ls
Muzlu Pasta	65	+/+/+	B	B	B	Lw	B	Lw
Pasta fıstıklı	75	-/+/+	B	-	B	-	B	-
Pasta frambuazlı	76	-/-/+	B	-	B	-	B	-
Pasta fındıklı	77	-/+/+	B	-	B	-	B	-
Pasta çikolatalı	78	-/+/+	B	-	B	-	B	-
Pasta kivi-muz	79	-/+/+	-	-	-	-	-	-
Krokantlı F. Ezme	42	+/-/-	RF	Lin	-	Lin	-	Lin
Kakaolu F. Ezme	43	-/-/-	RF	-	B	Lin	B	Lin
İtalyan Salata 1	1	-/-/-	RF	-	-	-	RF	-
Rus Salatası 1	2	-/-/-	-	-	-	-	RF	RF
Arnavut çiğeri 1	3	-/-/-	RF	Lm	RF	Lm	RF	Lm
İtalyan Salata 2	32	-/-/-	-	-	-	-	-	-
Rus Salatası 2	31	+/+/+	Ls	Ls	Ls	Ls	Ls	Ls
Arnavut çiğeri 2	34	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Arnavut çiğeri 3	62	+/+/+	-	-	-	-	-	-

RF: refakatçi flora Ö.Z.: ön zenginleştirme S.Z. :selektif zenginleştirme F.B.:Fraser Broth
L. m. L. monocytogenes, L. inn. L. innocua, L. wel. L. welshimeri,
L. seel. L. seeligeri, L. g. L. grayi B.:Bacillus spp.

Çizelge 4.29 Piyasadan toplanan örneklerdeki *Listeria* analiz sonuçları (devam)

Gıda	Ö.No	FB	F.B.1/2	Ö. Z.	F.B.1/1 24.s	S. Z. 24.s	F.B.1/1 48.s	S. Z. 48.s
Arnavut ciğeri 4	74	+/-/+	B	B	B	-	B	-
Midye Dolma	33	-/-/-	-	-	-	-	-	-
Kadın budu köfte	35	+/+/+	RF	Ls	RF	-	B	-
Hazır Salata	48	+/-/-	RF	B	-	Lin	-	Lin
Salam 1	4	+/-/-	-	-	-	-	-	Lin
Salam 2	81	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Salam 3	86	+/+/+	B	Lin	B	-	B	Lin
Salam 4	88	+/+/+	-	-	-	-	Lw	Ls
Sosis 1	5	-/+/+	Lw	Lm	Lw	Lm	Lw	Lm
Sosis 2	82	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Sosis 3	89	+/+/+	-	Lin	Lin	Lin	Lm	Lm
Sucuk 1	12	-/+/+	-	Ls	-	-	-	-
Sucuk 2	49	+/-/-	-	-	-	-	-	-
Sucuk 3	83	+/+/+	B	-	B	Lw	B	Lg
Pastırma	45	+/-/+	-	Lw	-	Lw	-	Lw
Tavuk Döner pş1	9	-/-/+	-	-	-	-	-	Lw
Tavuk Döner pş2	66	-/-/+	-	-	-	-	-	-
Hindi Döner	73	-/+/+	B	Lw	B	Lg	B	Ls, Lg
Tavuk ciğer 1	24	+/+/+	Lm	Lm	Lm	Lm	Lm	Lm
Tavuk ciğer 2	85	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Tavuk ciğer 3	87	+/+/+	Lin	Lin	Lw	Lin	Lin	Lin
Tavuk taşlık 1	25	+/+/+	-	RF	Ls	Ls	Ls	Ls
Tavuk taşlık 2	84	+/-/+	-	-	-	-	-	-
Tavuk kanat	90	+/+/+	Lg	Lin	Lin	Lin	Lw	Lw
Tavuk but	91	+/+/+	Lin	Lw	Lin	Lin	Lw	Lw
Tavuklu salata	6	-/+/+	Ls	Ls	Ls	Ls	Ls	Ls
Dana Döner pşm.	10	-/-/+	-	-	-	-	-	Lw, Lin
Dana Kıyma 2	30	-/+/+	-	Lm	-	Lm	-	Lm
Dana Şiş	20	-/+/+	-	-	-	-	-	Lg
Dana Kıyma	23	-/-/-	RF	Lm	B	Lm	-	Lm
Kuzu Kuşbaşı	69	-/+/+	RF	Lm	B	Lm	-	Lm
Kuzu şiş pşm	8	-/+/+	-	-	-	Y	-	Y
İnegöl köfte 1	26	+/+/+	Lm	Lm	Lm	Lm	Lm	Lm
İnegöl köfte 2	36	+/+/+	RF	B	B	Lin	B	Lin
İnegöl köfte 3	37	+/+/+	Ls	Lm	B	Lm+B	Ls	Lm
Izgara köfte	38	+/+/+	-	Lm+B	-	Lm+B	-	Lm
Izgara köfte pşm.	7	-/+/+	RF	RF	RF	RF	RF	RF
Patates 1	13	-/+/+	B	Lw+B	Lw	B	Lw	Lw
Patates 2	47	-/-/+	RF	Lw	-	Lw	-	Lw
Patates 3	70	-/-/+	RF	RF	-	Lin	-	Lin
Salatalık 1	14	+/-/+	B	RF	B	Lin+B	B	Lin+B

RF: refakatçi flora Ö.Z.: ön zenginleştirme S.Z. :selektif zenginleştirme F.B.:Fraser Broth
L. m. L. monocytogenes, L. inn. L. innocua, L. wel. L. welshimeri,
L. seel. L. seeligeri, L. g. L. grayi B.:Bacillus spp.

Çizelge 4.29 Piyasadan toplanan örneklerdeki *Listeria* analiz sonuçları (devam)

Gıda	Ö.No	FB	F.B.1/2	Ö. Z.	F.B.1/1 24.s	S. Z. 24.s	F.B.1/1 48.s	S. Z. 48.s
Salatalık 2	71	+/-/-	B	-	B	-	B	-
Marul 1	16	+/-/-	B	-	-	Lin	-	Lin
Marul 2	63	+/-/-	B	Y	-	Lin	-	Lin
Lahana	15	+/-/-	RF	Ls	-	Ls	B	Ls
Turp	17	-/-/+	RF	Lm	RF	Lm+B	RF	Lm+B
Domates	18	+/-/+	RF	RF	-	-	-	Lw
Soya filizi	27	+/+/+	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin	Lin
Alabalık 1	67	+/+/-	B	Lm	B	Lm	B	-
Çipura 1	44	+/-/-	B	Lm	B	Lm	B	Lm
Çipura 2	68	+/-/-	-	-	-	-	-	-
İstavrit	92	+/+/+	Lg	Lg	Lin	Lin	Lw	Lw
Hamsi	93	+/+/+	-	Lm	-	Lm	-	-
Palamut 1	94	+/+/+	-	-	-	-	-	-
Barbunya	95	+/+/+	Lg	Lm	Lm	Lm	Lin	Lm
Sardalye	96	+/+/+	Lm	Lm	Lg	Lm	Lg	Lm
Palamut 2	97	+/+/+	-	Lm	Lg	Lm	Lg	Lm
Alabalık 1	98	+/+/+	Lm	Lm	Lm	Lm	Lin	Lm
Alabalık 2	99	+/+/+	B	-	B	-	B	-

RF: refakatçi flora Ö.Z.: ön zenginleştirme S.Z. :selektif zenginleştirme F.B.:Fraser Broth
L. m. L. monocytogenes, *L. inn. L. innocua*, *L. wel. L. welshimeri*,
L. seel. L. seeligeri, *L. g. L. grayi* B.:*Bacillus* spp.

Çizelge 4.30 *Listeria* spp.'nin tanımlama sonuçları

Örnek	Ö.No	İzolas. Aşama.	Ksiloz	Ramnoz	Mannitol	α-D MP	Hemoliz CAMP	Bakteri
Ç. Süt1	50	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç. Süt1	50	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç. Süt1	50	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 2	51	FB1/2	+	-	-	+	+(+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 2	51	FB 24s	+	-	-	+	+(+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 2	51	FB 48 s	+	-	-	+	+(+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 2	51	Ö.Z.	+	-	-	+	+(+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 2	51	S.Z 24s	-	+	-	+	+(+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt 2	51	S.Z 48s	-	+	-	+	+(+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt 4	53	S.Z 24s	-	+	-	+	+(+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt 4	53	S.Z 48s	-	+	-	+	+(+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt 5	54	FB1/2	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 5	54	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 5	54	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 5	54	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 5	54	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 5	54	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 6	55	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 6	55	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 7	56	FB1/2	+	-	-	+	+(+/-)	<i>L. seeligeri</i>

Çizelge 4.30 *Listeria* spp.'nin tanımlama sonuçları (devam)

Örnek	Ö.No	İzolas. Aşama.	Ksiloz	Ramnoz	Mannitol	α-D MP	Hemoliz CAMP	Bakteri
Ç Süt 7	56	FB 48 s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 7	56	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 7	56	S.Z 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 7	56	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt 8	57	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt 8	57	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt 9	58	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 9	58	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 9	58	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt 9	58	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ç Süt10	59	FB1/2	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt10	59	FB 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt10	59	FB 48 s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt10	59	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt10	59	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt10	59	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt11	60	FB1/2	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt11	60	FB 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt11	60	FB 48 s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Ç Süt11	60	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt11	60	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ç Süt11	60	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
D. sade	72	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 1	39	FB1/2	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 1	39	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 1	39	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 1	39	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 1	39	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 1	39	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 2	40	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 2	40	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Pasta 3	41	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Pasta 3	41	S.Z 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Pasta 3	41	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Pasta 4	65	S.Z 24s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Pasta 4	65	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Kr.F. Ez	42	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Kr.F. Ez	42	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Kr.F. Ez	42	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ka.F.E	43	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Ka.F.E	43	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>

Çizelge 4.30 *Listeria* spp.'nin tanımlama sonuçları (devam)

Örnek	Ö.No	İzolas. Aşama.	Ksiloz	Ramnoz	Mannitol	α-D MP	Hemoliz CAMP	Bakteri
Ar.cğ 1	3	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ar.cğ 1	3	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Ar.cğ 1	3	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
RSlt 2	31	FB1/2	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
RSlt 2	31	FB 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
RSlt 2	31	FB 48 s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
RSlt 2	31	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
RSlt 2	31	S.Z 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
RSlt 2	31	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Kbkfte	35	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
HZR Slt	48	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
HZR Slt	48	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Salam1	4	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Salam3	86	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Salam3	86	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Salam4	88	FB 48 s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Salam4	88	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Sosis 1	5	FB1/2	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Sosis 1	5	FB 24s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Sosis 1	5	FB 48 s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Sosis 1	5	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sosis 1	5	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sosis 1	5	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sosis 3	89	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Sosis 3	89	FB 48 s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sosis 3	89	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Sosis 3	89	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Sosis 3	89	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sucuk1	12	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Sucuk3	83	S.Z 24s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Sucuk3	83	S.Z 48s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Pastma	45	Ö.Z.	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Pastma	45	S.Z 24s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Pastma	45	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
TvkD1	9	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
HindiD	73	Ö.Z.	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
HindiD	73	S.Z 24s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
HindiD	73	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
HindiD	73	S.Z 48s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Tvk c 1	24	FB1/2	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>

Çizelge 4.30 *Listeria* spp.'nin tanımlama sonuçları (devam)

Örnek	Ö.No	İzolas. Aşama.	Ksiloz	Ramnoz	Mannitol	α-D MP	Hemoliz CAMP	Bakteri
Tvk c 1	24	FB 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Tvk c 1	24	FB 48 s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Tvk c 1	24	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Tvk c 1	24	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Tvk c 1	24	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Tvk c 3	87	FB1/2	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk c 3	87	FB 24s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Tvk c 3	87	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk c 3	87	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk c 3	87	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk c 3	87	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk t 1	25	FB 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Tvk t 1	25	FB 48 s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Tvk t 1	25	S.Z 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Tvk t 1	25	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Tvk k	90	FB1/2	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Tvk k	90	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk k	90	FB 48 s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Tvk k	90	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk k	90	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvk k	90	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Tvkbut	91	FB1/2	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvkbut	91	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvkbut	91	FB 48 s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Tvkbut	91	Ö.Z.	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Tvkbut	91	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Tvkbut	91	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
TvkSlT	6	FB1/2	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
TvkSlT	6	FB 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
TvkSlT	6	FB 48 s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
TvkSlT	6	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
TvkSlT	6	S.Z 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
TvkSlT	6	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
D.Dn	10	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
D.Dn	10	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
D.Kym	23	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
D.Kym	23	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
D.Kym	23	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
KKşb.	69	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
KKşb.	69	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
KKşb.	69	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ. kfte1	26	FB1/2	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ. kfte1	26	FB 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ. kfte1	26	FB 48 s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ. kfte1	26	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ. kfte1	26	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>

Çizelge 4.30 *Listeria* spp.'nin tanımlama sonuçları (devam)

Örnek	Ö.No	İzolas. Aşama.	Ksiloz	Ramnoz	Mannitol	α-D MP	Hemoliz CAMP	Bakteri
İ. kfte1	26	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ.kfte 2	36	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
İ.kfte 2	36	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
İ.kfte 3	37	FB1/2	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
İ.kfte 3	37	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ.kfte 3	37	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İ.kfte 3	37	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Izgfkte	38	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Izgfkte	38	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Izgfkte	38	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Patats1	13	FB 24s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Patats1	13	FB 48 s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Patats1	13	Ö.Z.	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Patats1	13	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Patats2	47	Ö.Z.	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Patats2	47	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Patats3	70	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Patats3	70	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Salat1	14	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Marul1	16	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Marul1	16	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Marul2	63	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Marul2	63	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Lahana	15	Ö.Z.	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Lahana	15	S.Z 48s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Lahana	15	S.Z 24s	+	-	-	+	+ (+/-)	<i>L. seeligeri</i>
Turp	17	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Turp	17	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Turp	17	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Domat	18	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Soya fz	27	FB1/2	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Soya fz	27	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Soya fz	27	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Soya fz	27	Ö.Z.	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Soya fz	27	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Soya fz	27	S.Z 48s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Alblk1	67	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Alblk1	67	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Çipur1	44	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Çipur1	44	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Çipur1	44	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
İstavrit	92	FB1/2	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
İstavrit	92	FB 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
İstavrit	92	FB 48 s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
İstavrit	92	Ö.Z.	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
İstavrit	92	S.Z 24s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>

Çizelge 4.30 *Listeria* spp.'nin tanımlama sonuçları (devam)

Örnek	Ö.No	İzolas. Aşama.	Ksiloz	Ramnoz	Mannitol	α-D MP	Hemoliz CAMP	Bakteri
İstavrit	92	S.Z 48s	+	+	-	+	-	<i>L. welshimeri</i>
Hamsi	93	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Hamsi	93	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Barbun	95	FB1/2	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Barbun	95	FB 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Barbun	95	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Barbun	95	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Barbun	95	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Barbun	95	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sardaly	96	FB1/2	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sardaly	96	FB 24s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Sardaly	96	FB 48 s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Sardaly	96	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sardaly	96	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Sardaly	96	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Palam2	97	FB 24s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Palam2	97	FB 48 s	-	-	+	+	-	<i>L. grayi</i>
Palam2	97	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Palam2	97	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Palam2	97	S.Z 48s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Alblk2	98	FB1/2	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Alblk2	98	FB 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Alblk2	98	FB 48 s	-	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>
Alblk2	98	Ö.Z.	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Alblk2	98	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>
Alblk2	98	S.Z 24s	-	+	-	+	+ (+/-)	<i>L. monocytogenes</i>

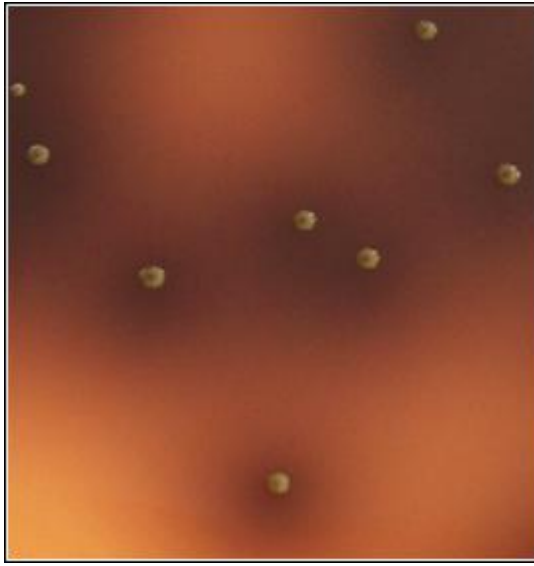
5. TARTIŞMA

PALCAM Agarda gelişen *Listeria* türlerinin hepsi ve bazı refakatçi bakteriler (*Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. vb.) eskulin siyahlaşmasına neden olmakta ve *L. monocytogenes* 'in teşhisini zorlaştırmaktadır. Ayrıca besiyerinde yoğun gelişen *Bacillus* spp. *L. monocytogenes* kolonilerini kapatmakta ve özellikle *L. monocytogenes* 'in az sayıda olduğu örneklerde sahte negatif sonuçlara neden olmaktadır. PALCAM Agar besiyerinin en önemli dezavantajlarından biri de *L. innocua*'nın besiyerinde *L. monocytogenes* 'den daha hızlı gelişmesi sonucunda *L. monocytogenes* 'in Petri kutusunda belirlenememesidir. Çalışma sırasında 1/2 Fraser Brothtan PALCAM Agara geçildiğinde gelişebilen ancak 1/1 Fraser Brothun 24. saat ve/ veya 48. saat inkübasyonundan sonra PALCAM Agara geçildiğinde gelişemeyen bakteriler olduğu görülmüştür. Bu özellikte 41 adet bakteri bulunmakta olup bu bakteriler daha çok *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakterilerden oluşmaktadır. 1/1 Fraser Brothun 48. saat inkübasyonundan PALCAM Agara geçildiğinde ise daha çok *Listeria* spp., *E. faecalis* başta olmak üzere *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., maya ve tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakterilerin bazıları çok iyi gelişme göstermektedir. 107 izolatın 66'sı 1/1 Fraser Brothun 48. saat inkübasyonu sonunda bile gelişme göstermektedir. Bu 66 mikroorganizmanın 40 adedi *Listeria* spp.'dir. Geri kalan 26 izolatın 11'i *Bacillus* spp., 6'sı *E. faecalis*, 4'ü maya, 3'ü *Staphylococcus* spp. ve 2'si de tanımlanamayan Gram pozitif çubuk bakteridir.

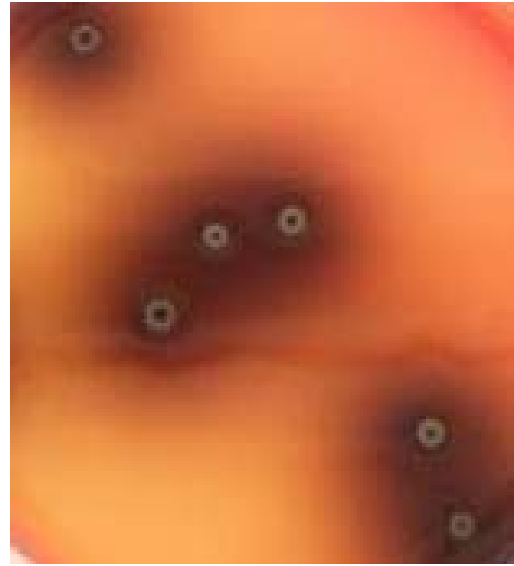
Fraser Broth ve PALCAM Agar sonuçları incelendiği zaman Fraser Broth'ta 26 (% 33) örnekte sahte pozitif, 3 (% 4) örnekte ise sahte negatif sonuç elde edilmiştir. Diğer araştırmacılar da Fraser Broth besiyerinden farklı oranlarda sahte pozitif sonuç almıştır (Capita *et al.* 2000, Koçan ve Halkman 2007). Johansson *et al.* (2000) Fraser Brothtan sahte negatif sonuç alım oranının *L. monocytogenes* için % 11 ve *Listeria* türleri için % 6 olduğunu belirtmiştir. Capita *et al.* (2000) ise % 1 sahte negatif, % 60 sahte pozitif sonuç almıştır. Bu diferansiyel sistemin duyarlılığı % 98,95 ve negatif örnek belirleme yeteneği yani spesifikliğı % 40 olarak bulunmuştur. Sahte pozitif örneklerde *Bacillus* spp. izole edilmiştir. Fraser and Sperber'in (1988) yaptıkları çalışmada sahte negatif

sonuca rastlanmazken kültürlerin % 12'sinde diğer *Listeria* türlerinden kaynaklanan sahte pozitif sonuç alınmıştır. Ayrıca Fraser Broth'ta 24 saatlik inkübasyon sonunda siyahlaşmanın gerçekleşmesi için en az 10^3 *Listeria* hücresi /mL olması gerektiği bildirilmiştir. Fraser Broth besiyerinde kullanılan eskulin-amonyum demir sitrat indikatör sisteminin kullanımının gereksiz olduğu düşünülmektedir. Çünkü analizler sırasında pek çok tüpte siyahlaşma gerçekleşmiş ancak *Listeria* 'ya rastlanamamıştır. Benzer şekilde Hitchins (1995), bu sistemin kullanımını gereksiz olduğunu belirtmiştir.

PALCAM Agar besiyerinde *E. faecalis* bakterileri *L. monocytogenes* 'e benzer koloniler vermekte ancak *L. monocytogenes* 'e özgü çökük merkezin varlığıyla koloniler ayırt edilebilmektedir. Şekil 5.1'de PALCAM Agarda *Enterococcus faecalis* 'in Şekil 5.2'de ise *L. monocytogenes* 'in görünümü verilmiştir.



Şekil 5.1 PALCAM Agarda
Enterococcus faecalis 'in görünümü



Şekil 5.2 PALCAM Agarda
L. monocytogenes 'in görünümü

Yarı konsantre Fraser Brothtan sonra pozitif örneğin % 55,9'unun kaybolduğu bunun *L. innocua*'nın aşırı gelişiminden kaynaklandığını laboratuvarlar arası çalışmada belirlenmiştir. Selektif besiyerinde *L. innocua* *L. monocytogenes* 'ten daha hızlı gelişmekte ve bu durum *L. monocytogenes* 'in teşhisinde sahte negatif sonuçlara neden olmaktadır (Johansson *et al.* 2000).

LiCl'ün Fraser Broth besiyerinde en ideal kullanım oranı 10 g/L olarak belirlenmiştir. İlk izolasyon besiyerlerinde LiCl oranı 0,5 g/L iken daha sonraları oranı 15 g/L'ye kadar çıkarılmıştır. Mendonca and Knabel (1994) Fraser Brothta 35 °C'de sağlıklı *L. monocytogenes* hücreleri için LiCl'ün MİK değeri 12 g/L iken *E. faecium* için 7 g/L'dir. Refakatçi floranın inhibisyonu ve ısıl işleme hasar görmüş *L. monocytogenes* hücrelerinin geri alımı için LiCl'ün en uygun kullanım oranının 7 g/L olmasını tavsiye etmiştir. Besiyerindeki konsantrasyonu 8-10 g/L olduğunda etkisi tamamen bakteriyostatiktir. LiCl *Enterococcus* spp. gelişimini inhibe ederek sahte pozitif sonuçları azaltmaktadır. PALCAM Agardan izole edilen *E. faecalis*'in daha sonra PALCAM Agarda gelişmemesinin bundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Fraser and Sperber (1988) inkübasyon sıcaklığı ve süresinin *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* tarafından siyah renk oluşumunu etkilediğini belirtmiştir. LiCl konsantrasyonu 3 g/L olduğunda az sayıda bulunan *L. monocytogenes* 'in (10^3 /mL) renk dönüşümü gerçekleşirken daha yüksek sayıda olan *E. faecalis* 'in (10^6 /mL) renk dönüşümü LiCl tarafından engellenmektedir. Siyah renk oluşumu 37 °C'de 30 °C'den daha iyi olmakta ve 24 saat inkübasyon sonunda gözlenebilmektedir.

Fraser Brothta LiCl'ün etkisini belirlemek için spektrofotometre ile yürütülen çalışmada elde edilen sonuçların düzensizliğinin sebebinin Fraser Brothun içerdiği yüksek orandaki tuzlardan (20 g/L NaCl ve 3 g/L LiCl) kaynaklandığı düşünülmektedir. Partis *et al.* (1994) accuprobe test uygulamasında UVM ve Fraser Broth besiyerlerinin yüksek konsantrasyonda tuz içermelerinden dolayı sahte negatif sonuçlar alındığını ve besiyeri bileşiminde bulunan eskulin ve akriflavin HCl'nin sinyalde azalmaya neden olduğunu belirtmiştir.

Akriflavin ilk *Listeria* zenginleştirme besiyerinden günümüzde kullanılan besiyerlerine kadar pek çok besiyerinde farklı oranlarda kullanılmıştır. Ancak son zamanlarda akriflavinin *L. monocytogenes* teşhisinde kullanımı tartışılmaktadır. Akriflavin daha çok Gram pozitif koklar özellikle de *Enterococcus* spp. üzerine inhibisyon etkisi olmakla birlikte bu etki stabil değildir. Analize alınan gıdadaki proteine bağlanmakta ve inhibitör etkisi % 19-79 arasında değişmektedir. Ayrıca gıdanın pH'sına bağlı olarak etkinliği değişmektedir (Beumer *et al.* 1996). Buemer and Hazeleger (2003). Akriflavin

konsantrasyonunun artışının *L. monocytogenes* 'in hem lag hem de generasyon zamanını etkilediğini *L. innocua*'ya ise hemen hemen hiçbir etkisi olmadığını belirtmiştir. Doyle *et al.* (2001) ise besiyerinin içerdiği akriflavinin sıcaklıkla hasar görmüş hücrelerin geri alımına zarar verdiğini bulmuştur. Ayrıca Beumer *et al.* (1988) de akriflavinin bazı *L. monocytogenes* suşları için inhibitör etkili olduğunu belirlemiştir. Bu sebeplerden dolayı oluşturulacak yeni besiyeri bileşiminden akriflavin çıkarılmıştır.

İnhibisyon çalışmasının birinci aşamasında kullanılan seftazidim *Listeria* spp. dışında kalan refakatçi floranın pek çoğunu inhibe etmiştir. Seftazidim yıllar boyunca geliştirilen pek çok izolasyon besiyerlerinde 20-50 mg/L oranında kullanılmış ancak zenginleştirme besiyerlerinde daha önce hiç kullanılmamıştır. Bu çalışmada seftazidim ön zenginleştirme besiyerinde 15 mg/L, zenginleştirme besiyerinde ise 30 mg/L oranında kullanılmış ve refakatçi floranın baskılanmasında oldukça etkili olduğu görülmüştür. Troxler *et al.* (2000) ve Ertan (2000) *Listeria* türlerinin içinde seftazidimin de olduğu modern sefalosporinlere dirençli veya orta dirençli olduğunu belirtmiştir. Larsson *et al.* (1985) *L. monocytogenes* 'in seftazidim için MİK₉₀ değerini >128 µg/mL olarak bulmuştur. Çalışmamızda da benzer olarak izolasyon besiyerinde 100 mg/L seftazidimin 18 *L. monocytogenes* izolatının gelişimini önemli oranda etkilemediği sonucuna varılmıştır.

PALCAM Agarda daha önce yapılan ve 100 mg/L seftazidimin etkisinin belirlendiği çalışmada 86, 92 ve 103 nolu *L. monocytogenes* izolatının sayısında yaklaşık 1,5 log birimlik düşüş yaşanmış ancak çalışmanın son aşamasında geri alma denemelerinde ön zenginleştirme ve selektif zenginleştirme sonrasında 100 mg/L seftazidim içeren selektif katı besiyerinde aynı düşüş görülmemiştir. Bu sonuç deneme sonuçlarında hazırlanan besiyeri bileşim farklılığı ve zenginleştirme ortamının etkisi olarak yorumlanmıştır.

Fosfomisin inhibisyon etkisi *Listeria* türleri arasında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle fosfomisin kullanımının *L. monocytogenes* analizinde diğer *Listeria* türlerinin inhibisyonu için önemli olduğu düşünülmüştür. Fosfomisin, Oxford Agarda 10 mg/L oranında kullanılmıştır. Ancak fosfomisin zenginleştirme ortamında daha önce hiç kullanılmamıştır. Bu çalışmada ön zenginleştirme besiyerinde 25 mg/L ve selektif

zenginleştirme ortamında ise 50 mg/L fosfomisin kullanılmış *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* 'nin bazı suşlarını inhibe etmesi beklenmiştir. İzolasyon besiyerinde 200 mg/L fosfomisin kullanıldığı zaman bütün *L. seeligeri* suşlarının sayısında yaklaşık 6 log birimlik indirgenme sağlanmıştır. Benzer şekilde Troxler *et al.* (2000) 128 mg/L fosfomisin kullanımının *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'ya herhangi bir etkisi olmadığı ancak *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* 'nin (32 suş) % 34'ünü (11 suş), *L. grayi* 'nin (10 suş) %70'ini (7 suş) ve *L. ivanovii* 'nin (19 suş) ise tamamını inhibe ettiğini bulmuştur. Fosfomisin izolasyon besiyerinde seftazidimle birlikte yüksek oranda kullanıldığı zaman *L. monocytogenes* 'i inhibe ettiği için kullanılamamıştır. 250 mg/L fosfomisinin, seftazidim olmadan diğer inhibitör sistemle birlikte kullanıldığı ön deneme sonucunda refakatçi floranın inhibe edilemediği görülmüştür. Barry *et al.* (1993) *Enterococcus* spp.'nin fosfomisine karşı antimikrobiyel direnci olduğunu belirtmiştir.

Hitchins (2003) siklohegzimidin toksik olduğunu belirttiği için yerine Amfoterisin B, kullanılmıştır. Amfoterisin B, ALOA agar besiyerinde de 10 mg/L oranında kullanılmış ve bilinen bir toksik etkisi bulunmamaktadır.

Refakatçi floranın inhibisyonunda karşılaşılan en önemli sorun kullanılan antibiyotiğe karşı *Listeria* spp.'nin farklı suşlarının etkilenme derecelerinin de farklı olmasıdır. Troxler *et al.* (2000) yaptığı çalışmada 4 mg/L fusidik asidin *L. ivanovii* 'nin (19) % 79'unu (15) 8 mg/L fusidik asidin ise *L. seeligeri* 'nin (21 suşun) % 90'ının (19 suşun) inhibe ettiğini belirtmiştir. *L. ivanovii* fosfomisine ve fusidik aside ise en duyarlı olan türdür. Ancak 8 mg/L oranında fusidik asidin içinde *L. monocytogenes* 'in de dahil olduğu diğer *Listeria* türlerinde de % 14'lük inhibisyona neden olmaktadır. Bunun için fusidik asit 4 mg/L ve 8 mg/L oranlarında kullanıldığı ön deneme sonucunda *L. innocua* 'ya inhibitör etkili olmazken *L. monocytogenes* izolatlarını inhibe ettiği için fusidik asit çalışmaya dahil edilememiştir.

Besiyerlerinin bileşimleri hazırlanırken gıdada hasar görmüş olarak bulunabilen *L. monocytogenes* 'in geri alımını teşvik etmek için bazı gelişim faktörleri belirlenip besiyerine eklenmiştir. Bunlardan biri olan Na-pirüvat hasar görmüş *L. monocytogenes* 'in kendini toparlayıp, besiyerinde üreyebilmesi için Buffered *Listeria* Enrichment

Broth, ALOA Agar, OCLA Agar ve Harlequin Agar besiyerlerinde 0,5-2,0 mg/L arasında değişen oranlarda kullanılmıştır. Martin and Katz (1993) ise canlandırma besiyeri bileşiminde bulunan pirüvatın reaktif oksijen türlerini nötrale ettiğini belirtmiştir. Curtis (1999), Hae-Suh and Knabel (2000), Besse (2002), Foong and Dickson (2004) tarafından % 1-3 sodyum pirüvatın besiyerine eklenmesinin ısıl işleme zarar görmüş *L. monocytogenes* 'in geri kazanılmasını artırdığı belirlenmiştir. Busch and Donnelly (1992), Martin and Katz (1993), Besse (2002) Tryptic Soy broth (TSB) besiyerine % 0,5 yeast ekstrakt ilave edilmesinin ısıl işleme zarar görmüş *L. monocytogenes* 'in canlanmasında etkili olduğunu bildirmiştir (5 saat sonra 0,5 log kob/mL artış). Yeast ekstrakt *Listeria* için gerekli olan B-kompleks vitaminleri bakımından önemli bir kaynaktır ve besin bileşenlerini sağlayarak hücre membranının hızlı bir şekilde onarılmasını sağlar. Ayrıca besiyerine eklenen magnezyum iyonlarının da stres altındaki bakterinin geri alımında pozitif etkisi vardır. Teo and Knabel (2000) ve Besse (2002) Mg iyonlarının hücre membranı ve ribozomların stabilizasyonunda enzimlerin aktivasyonunda rol oynadığını belirlemişlerdir. Zenginleştirme ve izolasyon besiyeri bileşimine alınan demir iyonları ise redoks reaksiyonları için gerekli bir hücre bileşiğidir ve *L. monocytogenes* 'in gelişimini arttırıcı etkisi vardır. Fraser and Sperber (1988) amonyum demir sitratın eskulin hidrolizini göstermesinin yanında *L. monocytogenes* 'in gelişimini teşvik edici etkisi olduğunu bildirmiştir.

Çalışmada 0,02 mg/ L ve 0,03 mg/L oranlarında rifampisin, inhibisyonun ikinci aşaması olan *L. monocytogenes* haricindeki diğer *Listeria* spp.'nin inhibisyonu için denenmiş ancak 18 *L. monocytogenes* izolatının 4'ünde bakteri sayısında indirgenmeye neden olmuştur. Ancak Troxler *et al.* (2000) 0,03 mg/L oranında rifampisin kullanımının *L. monocytogenes* (21 suş), *L. innocua* (21 suş) ve *L. grayi* 'ye (10 suş) herhangi bir etkisi olmadığını ancak *L. seeligeri* 'nin (21 suş) % 38'ini (8 suş) ve *L. welshimeri* 'nin (11 suş) % 82'sini (9 suş), *L. ivanovii* 'nin (19 suş) ise tamamını inhibe ettiğini bildirmiştir.

Piyasa taraması sonuçlarına göre ISO yöntemiyle 33 örnekte, kurulan sistemle ise 63 örnekte *Listeria* spp. belirlenmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi bazı örneklerde sadece kurulan yeni sistemde *Listeria* spp. belirlenmiştir. 30 örnekte sadece kurulan sistemde *Listeria* spp.'ye rastlanmış PALCAM besiyerinde *Listeria* spp. belirlenememiştir.

Sadece kurulan sistemle belirlenmiş 30 *Listeria* spp.'nin 11'i *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Sadece kurulan sistemde *Listeria* spp. belirlenme oranı % 48 iken *L. monocytogenes* bulunma oranı ise % 37'dir.

Bu sonuçlara göre kurulan sistem, ISO yöntemine göre daha iyi çalışmaktadır. Ancak istenmeyen bazı *Bacillus* spp. gelişiminin baskılanması gerektiği düşünülmektedir. 71 örneğin 30'unda sadece kurulan sistemde *Listeria* 'ya rastlanırken PALCAM besiyerinde *Listeria* belirlenmemiştir. Sadece kurulan sistemde *Listeria* bulunma oranı % 42 olarak belirlenmiştir.

Kurulan sistemin daha iyi çalışmasının nedenleri olarak;

- Ön zenginleştirme ortamının hasar görmüş *Listeria*'nın kendini toplamasına izin vermesi
- Selektif besiyerindeki inhibitör madde dengesi ve besiyeri bileşiminin farklı olması
- Selektif katı besiyerindeki inhibisyon sisteminin dengesi olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

-*L. monocytogenes* teşhisinde kullanılan besiyerlerinde görülen ortak sorun başta *L. innocua* olmak üzere diğer *Listeria* türleridir. Diğer refakatçi bakteriler önemli ölçüde inhibe edilirken *Listeria* spp. inhibisyonunda *L. monocytogenes* 'in duyarlılığı inhibitör kullanımını sınırlandırmaktadır.

-Fosfomisin pek çok *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* suşunun indirgenmesinde başarılı sonuçlar vermiştir. Ancak fosfomisinin seftazidim haricinde başka bir antibiyotik ile birlikte kullanılması gerekmektedir. Fosfomisin 250 mg/L oranında kullanıldığı zaman bile petride pek çok refakatçi bakteri gelişimi olmuştur. Bu nedenle fosfomisin ile birlikte kullanılacak olan antibiyotiğin *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. gibi refakatçi bakterileri inhibe etmesi gerekmektedir.

-Gıdalarda bulunan *L. monocytogenes* 'in büyük çoğunluğu gıda işlenirken hasar görmekte ve analiz sırasında sahte negatif sonuçlar alınmaktadır. Bu nedenle besiyerinde mutlaka gelişimi teşvik edici yeast ekstrakt, sodyum pirüvat, magnezyum iyonları, demir iyonları gibi bileşenlerin bulunması gerekmektedir.

-Seftazidim *Listeria* spp. dışındaki refakatçi bakterilerin inhibisyonunda çok başarılı sonuçlar vermiştir. Bu nedenle besiyerinde seftazidim kullanımı yararlı görülmektedir.

-Analizler sırasında hiçbir örnekte Gram negatif bakteriye rastlanmaması nalidiksik asidin, polimiksin B sülfatın ve seftazidimin Gram negatif bakterilerin inhibisyonu için yeterli olduğunun kanıtıdır.

-Besiyerinde bir maya-küf inhibitörünün bulunması gerekmektedir. Besiyerinde gelişen maya ve küfler Petri kutusunu kaplamakta ve *L. monocytogenes* 'in teşhisi zorlaşmakta hatta bazen imkansız hale gelmektedir. Seçilen inhibitörün toksik olmamasına da özen gösterilmelidir.

-Son yıllarda geliştirilen Kromojenik besiyerlerinde *Listeria* türlerinin ayrımı yapılabilmektedir. Ancak bu besiyerleriyle yapılan analizlerin maliyetleri, içerdikleri kromojenik maddeler yüzünden oldukça yüksek olmaktadır. Aynı şekilde geliştirilen hızlı yöntemlerde de kısa sürede sonuç alınabilmekte ancak başlangıçta ciddi yatırımların yapılması gerekmektedir. Bu durum sanayi için pek tercih edilmemektedir.

Son 30 yıldır *L. monocytogenes* 'in belirlenmesi amacıyla pek çok sayıda zenginleştirme ve izolasyon besiyeri geliştirilmiş ve bunların karşılaştırılmaları üzerine çok yoğun araştırmalar yapılmıştır. Günümüzde bu konu üzerinde hâlâ çalışılmakta olup analiz süresinin kısaltılması ve sistemin hassasiyetinin arttırılmasına dair çalışmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, S.M.N. and Halkman, A.K. 2004. Antimicrobial effect of water Extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. Int. J. Food Microbiol. 97, 63-69.
- Abuin, C.M.F., Fernandez, E.J.Q., Sampayo, C.F., Otero, J.L.R., Rodriguez, L.D. and Saez, A.C. 1994. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemoth. 38 (7) 1655-1657.
- Akkaya, L., Alişarlı, M., Kara, R. ve Telli, R. 2006. Afyonkarahisar'da tüketime sunulan kremalı pastalarda *Listeria* türlerinin varlığının belirlenmesi. YYÜ Vet. Fak. Derg. 17 (1-2), 93-97.
- Akman, D., Duran, N. and Dığrak, M. 2004. Prevalence of *Listeria* species in ice creams sold in the cities of Kahramanmaraş and Adana. Turk J. Med. Sci. 34, 257-262.
- Allerberger, F. 2003. Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35, 183-189
- Andrews, J.M. 2002. The British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) Disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. 46s. *Version 2.1.1.*
- Andrews, J.M. 2001.a Determination of minimum inhibitory concentrations. J. Antimicrob. Chemoth. 48, Suppl. S1, 5-16.
- Andrews, J.M. 2001.b BSAC standardized disc susceptibility testing method. Antimicrob. Chemoth. 48, Suppl. S1, 43-57.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M. ve Diker, K.S. 1999. Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi. Ankara. 362s.
- Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji. 2. baskı. Medisan Yayınevi. Ankara, 80-92.
- Arslan, F. 1997. Antibiyotiklerin ve antibiyotik kombinasyonlarının *Listeria monocytogenes* üzerine in vitro etkileri. Uzmanlık tezi (basılmamış). Erciyes Üniversitesi, 50 s., Kayseri.
- Asperger, H., Hestinger, H., Wagner, M., Lehner, A. and Brandl, E. 1999. A contribution of *Listeria* enrichment methodology – growth of *Listeria monocytogenes* under varying conditions concerning enrichment broth composition, cheese matrices and competing microbial flora. Food Microbiol. 16, 419-431.
- Atlas, R.M. 1996. Microbiological Culture Media. 2nd Ed. CR Press, NewYork, 1706 p.

- Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M. and Guillier, L. 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1019-1042.
- Aznar, R. and Solis, I. 2006. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in different food products compared with the mini-VIDAS LMO system and the standard procedure ISO 11290-1. *J. Verbr. Lebensm.* 1, 115-120.
- Bailey, J.S., Fletcher, D.L. and Cox, N.A. 1990a. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 53(6), 473-477.
- Bailey, J.S., Fletcher, D.L. and Cox, N.A. 1990b. Effect of enrichment media and sampling protocol on recovery of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 53(6), 505-507.
- Balamurugan, J., Bhilegaonkar, K.N. and Agarwal, R.K. 2006. A study on suitability of four enrichment broths for PCR-based detection of *Listeria monocytogenes* from raw meat. *J. Food Safety* 26, 16-29.
- Banada, P.P., Liu, Y., Yang, L., Bashir, R. and Bhunia, A.K. 2006. Performance evaluation of a low conductive growth medium (LCGM) for growth of healthy and stressed *Listeria monocytogenes* and other common bacterial species. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 12-20.
- Barmpalia, I.M., Geornaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. *J. Food Protect.* 67(11), 2456-2464.
- Baron, E.J. and Finegold, S.M. 1990. *Diagnostic Microbiology*. 8th edition, Bailey & Scott's, USA, 171-194.
- Barry, A.L., Pfaller, M.A., Fuchs, P.C., Tenover, F.C., Reller, L.B., Allen, S.D., Hardy, D.J. and Gerlach, E.H. 1993. Interpretive criteria and quality control parameters for determining bacterial susceptibility to fosfomycin tromethamine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12, 352-356.
- Beckers, H.J., Soentoro, P.S.S. and Delfgou-van Asch, E.H.M. 1987. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 249-256.
- Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alişarlı, M. ve Güdücüoğlu, H. 2006. Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes* izolasyonu. *Van Tıp Dergisi* 13(2), 36-41.
- Besse, N.G., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M. and Colin, P. 2006. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 43-51.

- Besse, N.G. 2002. Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: a review. *Food Microbiol.* 19, 221-234.
- Besse, N.G., Brissonnet, F.D., Lafarge, V. and Leclerc, V. 2000. Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid damaged *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 944-950.
- Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *J. Food Sci.* 55(3), 755-758.
- Beumer, R.R. and Hazeleger, W.C. 2003. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 191-197.
- Beumer, R.R., te Giffel, M.C. and Cox, L.J. 1997. Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA)- a Selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 421-425.
- Beumer, R.R., te Giffel, M.C., Anthonie, S.V.R. and Cox, L.J. 1996. The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. *Food Microbiol.* 13, 137-148.
- Beverly RL. 2004. The control, survival, and growth of *Listeria monocytogenes* on food products. Ph.D thesis (unpublished), Graduate Faculty of the Louisiana State University, 126 p., USA.
- Bhatti, M., Veeramachaneni, A., Shelef, L.A. 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 215-219.
- Boisivon, A., Guiomar, C. and Carbon, C. 1990. In vitro bactericidal activity of amoxicillin, gentamicin, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole alone or in combination against *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 9, 206-209.
- Bonnet, M. and Montville, T.J. 2005. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 237-242.
- Boyapalle, S., Wesley, I.V. and Mendonca, A.F. 2005. Evaluation of reverse transcriptase 5' nuclease polymerase chain reaction assay for the detection of viable heat-injured and resuscitated *Listeria monocytogenes* in ground pork. Health/food safety. <http://www.ipic.iastate.edu/reports/02swinereports/asl-1815.pdf> (21.04.2005)

- Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1989. Methods and media for the isolation and cultivation of *Listeria monocytogenes* from various foods. *Int. J. Food Microbiol.* 8, 219-223.
- Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M. and Twedt, R.M. 1987. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J. Food Protect.* 50(7), 543-544.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Bencivengo, M.M. and Del Corral, F. 1989. Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified vogel Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(3), 599-603.
- Buncic, S., Avery, S.M., Rocourt, J. and Dimitrijevic, M. 2001. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and ½ a, of *Listeria monocytogenes*? *Int. J. Food Microbiol.* 65, 201-212.
- Burtscher, C. and Wuertz, S. 2003. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8), 4618-4627.
- Busch, S. and Donnelly, C. W. 1992. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. 58(1), 14-20.
- Griffiths, M.W. 2004. *Listeria* properties and occurrence, detection, listeriosis. Encyclopedia of food sciences and nutrition. Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (eds), Academic press, pp.3562-3587, UK.
- Capita, R., Calleja, C.A., Prieto, M., Fernandez, M.C.G. and Moreno, B. 2001. Comparison of PALCAM and modified Oxford plating media for isolation of *Listeria* species in poultry meat following UVM II or Fraser secondary enrichment broths. *Food Microbiol.* 18, 555-563.
- Capita, R., Calleja, C.A., Garcia-Arias, M.T., Moreno, B. and Garcia Fernandez, M.C. 2000. Evaluation of Fraser Broth to isolate *Listeria* from poultry. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 33(8), 560-563.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985. Epidemiologic notes and reports listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese – California. *Morbidity and Mortality Weekly Reports.* 34(24):357-359.
- CDC. 1998. Multistate outbreak of listeriosis – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Reports.* 47:1085-1086.
- CDC. 2000. Multistate outbreak of listeriosis – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Reports.* 49(50):1129-1130.

- CDC. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Carolina, October 2000-January 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*. 50(26):560-562.
- CDC. 2002. Public Health Dispatch: Outbreak of listeriosis – Northeastern United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*. 51(42): 950-951.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). 2001. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Jan 2001. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisksu.html> Erişim Tarihi: 01.05.2005.
- Charpentier, E. and Courvalin, P. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Minireview. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(9), 2103-2108.
- Cassiday, P.K., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1989. Evaluation of three newly developed direct plating media to enumerate *Listeria monocytogenes* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6), 1645-1648.
- Chasseignaux, E., Gerault, P., Toquin, M.T., Salvat, G., Colin, P. and Ermel, G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 271-275.
- Chawla, C.S., Chen, H. and Donnelly, C.W. 1996. Mathematically modeling the repair of heat- injured *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH, and salt concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 231-242.
- Chhabra, A.T., Carter, W.H., Linton, R.H. and Cousin, M.A. 2002. A predictive model that evaluates the effect of growth conditions on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 235-243.
- Cordano, A. and Rocourt, J. 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 175-178.
- Cornu, M., Kalmokoff, M. and Flandrois, J.P. 2002. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 261-274.
- Cox, T., Frazier, C., Tuttle, J., Flood, S., Yagi, L., Yamashiro, C.T., Behari, R., Paszko, C. and Cano, R.J. 1998. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy samples utilizing a PCR-based fluorogenic 5' nuclease assay. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 21, 167-174.
- Cox, L.J., Siebenga, A. and Pedrazzini, C. 1991. Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths. *Food Microbiol.* 8, 51-62.

- Crawford, R.G., Beliveau, C.M., Peeler, J.T., Donnelly, C.W. and Bunning, V.K.1989. Comparative recovery of uninjured and heat-injured *Listeria monocytogenes* cells from bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6), 1490-1494.
- Curtis, G.D.W., Mitchell, R.G., King, A.F. and Griffin, E.J. 1989. A Selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 95-98.
- Curtis, G.D.W. 1999. Detection by classical cultural techniques. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Batt, C.A., Patel, P.D., Robinson, R.K. (eds), Academic Press, pp.1199-1207, UK.
- Dallas, H.L., Tran, T.T., Poindexter, C.E., Hitchins, A.D. and Romanell, L.J. 1991. Competition of food bacteria with *Listeria monocytogenes* during enrichment culture. *J. Food Safety* 11, 293-301.
- Davis, C. Lithium. XPharm. 2006. http://www.xpharm.com/citation?Article_ID=8801, Erişim Tarihi: 24.04.2006.
- De Vries H. and Kroo, A.M. 1970. Euflavin and ethidium bromide; inhibitors of mitochondriogenesis in regenerating rat liver. *FEBS Letters*, 7(4), 347-350.
- Doğan, H. B. 2000. *Listeria monocytogenes*. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. 2.baskı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını. *Sim Mat.* Ankara, 373-386.
- Doğanay, M. 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*35, 173-175.
- Donnelly, C.W. 2002. Detection and isolation of *Listeria monocytogenes* from food samples: Implications of sublethal injury. *J. AOAC. Int.* 85(2), 495-500.
- Donnelly, C.W., Briggs, E.H. and Donnelly, L.S.1987. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. *J. Food Protect.* 50(1), 14-17.
- Donnelly, C.W. and Baigent, G.J. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(4), 689-695.
- Donnelly, C.W. and Briggs, E.H. 1986. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J. Food Protect.* 49(12), 994-998.
- Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiselman, D.W. and Scott, V.N. 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. food Protect.* 64(2), 410-429.

- Doyle, M.E. 1999. Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. FRI Briefings, Food Research Institute, pp.1-24. <http://www.wisc.edu/fri/briefs.htm/listeria.pdf> Erişim Tarihi: 05.01.2006.
- Doyle, M.P. 1988. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technology 4, 169-171.
- Doyle, M.P. and Schoeni, J.L. 1987. Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened cheese. J. Food Protect. 50(1), 4-6.
- Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D.J. and Schultz, R.D. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl. Environ. Microbiol. 53(7), 1433-1438.
- Doyle, M.P. 1986. Selective-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. Appl. Environ. Microbiol. 51(5), 1127-1129.
- Duh, Y.H. and Schaffner, D.W. 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 56(3), 205-210.
- Eleinin, A.M., Ryser, E.T. and Donnelly C.W. 2000. Incidence and seasonal variation of *listeria* species in bulk tank goat's milk. J. Food Protect. 63(9), 1208-1213.
- El Marrakchi, A., Boum'handi, N. and Hamama, A. 2005. Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. Lett. Appl. Microbiol. 40, 87-91.
- Entis, P. and Lerner, I. 2000. Twenty-Four-Hour direct presumptive enumeration of *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples using the ISO-GRID method with LM-137 agar. J. Food Protect. 63(3), 354-363.
- Erdenlig, S., Ainsworth, A.J. and Austin, F.W. 2000. Pathogenicity and production of virulence factors by *Listeria monocytogenes* isolates from channel catfish. J. Food Protect. 63(5), 613-619.
- Ermolaeva, S., Karpova, T., Novella, S., Wagner, M., Scotti, M., Tartakovskii, I. and Boland, J.A.V. 2003. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. Int. J. Food Microbiol. 82, 87-94.
- Erol, İ. ve Şireli, U. T. 1999. Donmuş broiler karkaslarında *Listeria monocytogenes* ' in varlığı ve serotip dağılımı. Turk J. Vet. Anim. Sci. 23 : 765-770.
- Ertan, M. 2000. Kemoterapötik ilaçlar. Farmasötik Kimya, 2. Cilt, Irmak Mat., Ankara. 991-1146.

- Faleiro, M.L., Andrew, P.W. and Power, D. 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 207-216.
- Farber, J.M. 1993. Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. *J. Food Protect.* 56(7), 640-643.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55(3), 476-511.
- Farber, J.M. 1989. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 8, 285-291.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Speirs, J.I., D'Aoust, J.Y., Emmons, D.B. and McKellar, R. 1988. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 277-286.
- Firstenberg-Eden, R. and Shelef, L.A. 2000. A new rapid automated method for the detection of *Listeria* from environmental swabs and sponges. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 231-237.
- Foong, S.C.C. and Dickson, J.S. 2004. Survival and recovery of viable but nonculturable *Listeria monocytogenes* cells in a nutritionally depleted medium. *J. Food Protect.* 67(8), 1641-1645.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. and Debevere, J. 2006. Effect of environmental parameters (temperature, pH and a_w) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 108(3), 326-335.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Cools, I., Van Impe, J.F. and Debevere, J. 2005. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1503-1515.
- Fraser, J.A. and Sperber, W.H. 1988. Rapid detection of spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J. Food Protect.* 51(10), 762-765.
- Fu, A.H., Sebranek, J.G. and Murano, E.A. 1995. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* O157:H7 and quality changes after irradiation of beef steaks and ground beef. *J. Food Sci.* 60(5), 972-977.
- Gahan, C.G.M. and Hill, C. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 93-100.
- Gandhi, M. and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 1-15.

- Garayzabal, J.F. and Genigeorgis, C. 1990. Quantitative evaluation of three selective enrichment broths and agars used in recovering *Listeria* microorganisms. J. Food Protect. 53(2), 105-110.
- Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P.M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiol. Rev. 29, 851-875.
- Gençer, V.K. ve Kaya, M. 2004. Yaprak dönerin mikrobiyolojik kalitesi ve kimyasal bileşimi. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28, 1097-1103.
- George, S.M., Lund, B.M. and Brocklehurst, T.F. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 6, 153-156.
- Gerner-Smidt, P., Ethelberg, S., Schiellerup, P., Christensen, J.J., Engberg, J., Fussing, V., Jensen, A., Jensen, C., Petersen, A.M. and Bruun, B.G. 2005. Invasive listeriozsis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,11(8), 618-624.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1988a. Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze-injured *Listeria monocytogenes* from foods. Appl. Environ. Microbiol. 54(6), 1451-1456.
- Golden, D.A., Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1988b. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. Food Microbiol. 5, 17-23.
- Golden, D.A., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1990. Efficacy of direct plating media for recovering *Listeria monocytogenes* from foods. Int. J. Food Microbiol. 10, 143-156.
- Gorski, L., Flaherty, D. and Mandrell, R.E. 2006. Competitive fitness of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2 a and 4b strains in mixed cultures with and without food in the U.S. Food and Drug Administration enrichment protocol. Appl. Environ. Microbiol. 72(1), 776-783.
- Gorski, L., Palumbo, F.D. and Mandrell, R.E. 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. Appl. Environ. Microbiol. 69(1), 258-266.
- Gracieux, P., Roche, S.M., Pardon, P. and Velge, P. 2003. Hypovirulent *Listeria monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid'L. mono media. Int. J. Food Microbiol. 83, 133-145.

- Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G. and Pathak, K. 2005. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1340-1345.
- Griffiths, M.W. 2003. *Listeria* properties and occurrence, detection, listeriosis. Encyclopedia of food sciences and nutrition. Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (eds), Academic press, pp.3562-3587, UK.
- Hae-Suh, J. and Knabel, J. 2001. Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat- injured *Listeria monocytogenes* whole milk. *J. Food Protect.* 64(1), 30-36.
- Hae-Suh, J. and Knabel, J. 2000. Comparison of different reducing agents for enhanced detection of heat- injured *Listeria monocytogenes* . *J. Food Protect.* 63(8), 1058-1063.
- Han, Y. and Linton, R.H. 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperatures. 2004. *J. Food Protect.* 67(11), 2443-2449.
- Han, Y., Linton, R.H. and Nelson, P.E. 2004. Effects of recovery, plating, and inoculation methods on quantification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from strawberries. *J. Food Protect.* 67(11), 2436-2442.
- Hansen, J.M., Gerner-Smidt, P. and Bruun, B. 2005. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS* 113, 31-36.
- Heisick, J.E., Harrell, F.M., Peterson, E.H., McLaughlin, S., Wagner, D.E., Wesley, I.V., Bryner, J. 1989a. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. *J. Food Protect.* 52(3), 154-157.
- Heisick, J.E., Wagner, D.E., Nierman, M.L. and Peeler, J.T. 1989b. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8), 1925-1927.
- Hitchins, A.D. 2003. Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods Bacteriological Analytical Manual Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> Erişim Tarihi: 10.03.2005.
- Hitchins, A.D. 1989. Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from inoculated ice cream. *J. Food Protect.* 52(12), 898-900.
- Hitchins, A.D. 1995. Chapter 11. Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes* FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th edition.10.01-13.
- Hitchins, A.D. and Duvall, R.E. 2000. Feasibility of a defined microflora challenge method for evaluating the efficacy of foodborne *Listeria monocytogenes* selective enrichments. *J. Food Protect.* 63(8), 1064-1070.

- Hitchins, A.D. 2003. Chapter 10 Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods Bacteriological Analytical Manual Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> Erişim Tarihi: 10.03.2005.
- Hof, H., Nichterlein, T. and Kretschmar, M. 1997. Management of Listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 10(2), 345-357.
- Hof, H. 2003. Therapeutic options. FEMS Immunol. Med. Microbiol.35, 203-205.
- Hoffmann, A., Pag, U., Wiedemann, I. and Sahl, H.G. 2001. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. Il Farmaco 57, 685-691.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition. Williams&Wilkins, 787 p., Baltimore.
- Hughes, D., Dailianis, A., Duncan, L., Briggs, J., McKintyre, D.A. and Silbernagel, K. 2003. Modification of enrichment protocols for TECRA *Listeria* Visual Immunoassay Method 995.22: Collaborative study. J. AOAC Int. 86(2), 340-354.
- In 't Veld, P.H. and de Boer, E. 1991. Recovery of *Listeria monocytogenes* on selective agar media in a collaborative study using reference samples. Int. J. Food Microbiol. 13, 295-300.
- ISO 11290-1. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method.
- Istafanos, P. and James, L. 2002. Comparison of Visual immunoassay and chromogenic culture medium for the presence of *Listeria* spp. in foods. J. AOAC. Int. 85(5), 1201-1203.
- Jacobsen C.N. 1999. The influence of commonly used selective agents on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 50, 221-226.
- Jinneman, C.K., Hunt, J.M., Eklund, C.A., Wernberg, J.S., Sado, P.N., Johnson, J.M., Richter, R.S., Torres, S.T., Ayotte E., Eliasberg S.J., Istafanos, P., Bass, D., Calabresa, N.K., Lin, W. and Barton, C.N. 2003. Evaluation and interlaboratory validation of a selective agar for phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity using a chromogenic substrate to detect *Listeria monocytogenes* from foods. J. Food Protect. 66(3), 441-445.
- Johansson, T., Ahola-Luttilla, H., Pirhonen, T., Taimisto, A.-M., Haario, H., Laine, M. and Salkinoja, S. 2000. Improved detection of *Listeria monocytogenes* in soft mould-ripened cheese. J. Appl. Microbiol. 88, 870-876.

- Johansson, T. 1998. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 77-85.
- Kang, D.H. and Fung, D.Y.C. 1999. Thin agar layer method for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 62(11), 1346-1349.
- Kara, A.A., Algur, Ö.F. ve Kaya, M. 1999. Erzurum piyasasından temin edilen beyaz ve civil peynirlerinden *Listeria* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu. *Tr. J. of Biology* 23, 331-337.
- Kiiyukia, C. 2003. Laboratory manual of food microbiology for Ethiopian health and nutrition research institute. 96-110. http://www.unido.org/file-storage/download/?file_id=32081 Erişim Tarihi: 24.03.2006
- Kim, J.G. and Yousef, A.E. 2000. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *JFS: Food Microbiol. Safety* 65(3), 521-528.
- King, T., Ferenci, T. and Szabo, E.A. 2003. The effect of growth atmosphere on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive exposure to acid, proteolytic enzymes and bile salts. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 133-143.
- Knabel, S.J. 2002. Optimized, one-step, recovery-enrichment broth for enhanced detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk and hot dogs. *J. AOAC Int.* 85(2), 501-504.
- Knabel, S.J., Walker, H.W., Hartman, P.A. and Mendonca, A.F. 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(2), 370-376.
- Koçan, D., Polat, G. ve Halkman, A.K. 2005. *Listeria monocytogenes* Analizinde Oxford Agar Besiyerinde Gelişen Refakatçi Floranın Belirlenmesi. 4. Gıda Mühendisliği Kongresi Kitabı, TMMOB Gıda Mühendisliği Odası 400s. Sayfa: 255-259.
- Koçan, D. ve Halkman, A.K. 2006. *Listeria monocytogenes* ve Listeriozis. *Gıda Dergisi, Gıda Teknolojisi Derneği (GTD)* 31(3) 133-140.
- Koçan, D. ve Halkman, A.K. 2007. *Listeria monocytogenes* : Teşhis problemleri. *Gıda Mühendisliği 5. Kongresi*, basımda.
- Kornacki, J.L., Evanson, D.J., Reid, W., Rowe, K. and Flowers, R.S. 1993. Evaluation of the USDA protocol for detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 56(5), 441-443.
- Lalitha, M.K. 2004. Manual on Antimicrobial susceptibility testing <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc> Erişim Tarihi: 23.03.2006.

- Lammerding, A.M. and Doyle, M.P. 1989. Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 249-268.
- Larsson, S., Walder, M.H., Cronberg, S.N., Forsgren, A.B. and Moestrup, T. 1985. Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 1958 to 1982 in Sweden. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28(1), 12-14.
- Lauer, W.F., Facon, J.P. and Patel, A. 2005. Evaluation of a chromogenic medium for identification and differentiation of *Listeria monocytogenes* in selected foods. *J. AOAC Int.* 88(2), 511-517.
- Leclercq, A. 2004. Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *J. Microbiol. Meth.* 57, 251-258.
- Lee, W.H. and McClain, D. 1986. Improved *Listeria monocytogenes* Selective Agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(5), 1215-1217.
- Li Q, Sherwood, J.S. and Logue, C.M. 2006. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. Recovered from processed bison. *Lett. Appl. Microbiol.* 44(1), 86-91.
- Loessner, M.J., Bell, R.H., Jay, J.M. and Shelef, L.A. 1988. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12), 3003-3007.
- Lou, Y. and Yousef, A.E. 1997. Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4), 1252-1255.
- Lucore, L.A., Shellhammer, T.H. and Yousef, A.E. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *J. Food Protect.* 63(5), 662-664.
- Lund, A.M., Zottola, E.A. and Pusch, D.J. 1991. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. *J. Food Protect.* 54(8), 602-606.
- Lunden, j., Tolvanen, R., and Korkeala, H. 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J. Dairy Sci.* 87: (E. Suppl.), E6-E11.
- MacGowan, A.P., Holt, H.A., Bywater, M.J. and Reeves, D.S. 1990. In vitro antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated in the UK and other *Listeria* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 767-770.
- Mackey, B.M., Boogard, E., Hayes, C.M. and Baranyi, J. 1994. Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 22, 227-237.

- Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 205-218.
- Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C. and Comi, G. 2000. *J. Food Protect.* 63(5), 659-661.
- Marco, F., Almela, M., Salas, J.N., Coll, P., Gasser, I., Ferrer, M.D., de Simon, M. and collaborative study group of Listeriosis of Barcelona. 2000. In vitro activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains isolated in Barcelona, Spain. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 259-261.
- Martin, A. and Katz, S.E. 1993. Rapid determination of *Listeria monocytogenes* in foods using a resuscitation / selection / kit system detection. *J. AOAC Int.* 76(3), 632-636.
- Martinez, B. and Rodriguez, A. 2005 Antimicrobial susceptibility of Nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 67-72.
- Mayrhofer, S., Paulsen, P., Smulders, F.J.M. and Hilbert, F. 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 23-29.
- Mazzotta, A.S. 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vegetables: evaluation of blanching processes. *J. Food Protect.* 64(3), 385-387.
- Mazzotta, A.S. and Gombas, D.E. 2001. Heat resistance of an outbreak strain of *Listeria monocytogenes* in hot dog batter. *J. Food Protect.* 64(3), 321-324.
- Mazzotta, A. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and acid adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J. Food Protect.* 64(3), 315-320.
- McCarthy, S.A. 1991. Pathogenicity of nonstressed, heat- stressed, and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8), 2389-2391.
- McClain, D. and Lee, W.H. 1988. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(3), 660-664.
- McKellar, R.C., Butler, G. and Stanich, K. 1997. Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiol.* 14, 617-626.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. and Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 15-33.

- McLauchlin, J. 1997. The identification of *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 77-81.
- Mendonca, A.F. and Knabel, S.J. 1994. A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(11), 4001-4008.
- Meadows, B.A. 2004. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and lactic acid bacteria species in chill brines. Master thesis (unpublished), Virginia Polytechnic Institute and State University, 54 p., Blacksburg, VA.
- Merck Gıda Mikrobiyolojisi, <http://www.mikrobiyoloji.org> Erişim Tarihi: 04.12.2004.
- Mossel, D.A.A. 1989. *Listeria monocytogenes* in foods. Isolation, characterization and control. *Int. J. Food Microbiol.* 8, 183-195.
- Murphy, R.Y., Marks, B.P., Johnson, E.R. and Johnson, M.G. 2000. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat and liquid medium. *Food Microbiol. Safety.* 65(4), 706-710.
- Murphy, R.Y., Johnson, E.R., Marcy, J.A. and Johnson, M.G. 2001. Survival and growth of *Salmonella* and *Listeria* in the chicken breast patties subjected to time and temperature abuse under varying conditions. *J. Food Protect.* 64(1), 23-29.
- Neamatallah, A.A.N., Dewar, S.J. and Austin, B. 2003. An improved selective isolation medium for the recovery of *Listeria monocytogenes* from smoked fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 230-233.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCLLS). 2002. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement. *M2-A7, M7-A5.* 22(1), 117p. Wayne, PA. USA.
- Nelson, K.E., Fouts, D.E., Mongodin, E.F., Ravel, J., Deboy, R.T., Kolonay, J.F., Rasko, D.A., Angiuoli, S.V., Gill, S.R., Paulsen, I.T., Peterson, J., White, O., Nelson, W.C., Nierman, W., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Haft, D.H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forbeger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling, L.D., Uhlir, G.A., Bayles, D.O., Luchansky, J.B. and Fraser, C.M. 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* 32(8), 2386-2395.
- Norton, D.M. 2002. Polymerase Chain Reaction- based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.* 85(2), 505-515.

- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P. and Chackraborty, T. 1998. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 61(2), 244-248.
- Parish, M.E. and Higgins, D.P. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. J. Food Protect. 52(3), 144-147.
- Partis, L., Newton, K., Murby, J. and Wells, R.J., 1994. Inhibitory effects of enrichment media on the accuprobe test for *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 60(5), 1693-1694.
- Pearson, L.J. and Marth, E.H. 1990. *Listeria monocytogenes* -Threat to a safe food supply: a review. J. Dairy Sci. 73, 912-928.
- Petran, R.L. and Swanson, K.M.J. 1993. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. J. Food Protect. 56(7), 616-618.
- Pinto, M., Burri, S., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2001. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. Food Control. 12, 511-514.
- Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Lashbrook, L.C., Peterson, M.E., Pelroy, G.A. and Eklund, M.W. 1993. Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. J. Food Protect. 56(4), 326-329.
- Rasch, M., Metris, A. and Baranyi, J. and Budde, B.B. 2007. The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. Int J. Food Microbiol. 113, 35-40.
- Reissbrodt, R. 2004. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.- an overview. Int J. Food Microbiol. 95, 1-9.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Irbe, R.M., Schabert, G. and Spitz, H. 1999. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. J. Food Protect. 62(3), 244-251.
- Rosenow, E.M. and Marth, E.H. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35 °C. J. Food Protect. 50(6), 452-459.
- Rxlist 2005. Clinical Pharmacology, Polymyxin B Sulfate. http://www.rxlist.com/cgi/generic3/polymyxin_cp.htm Erişim Tarihi: 01.05.2005
- Ryan, M., Zaikova, T.O., Keana, J.F.W., Goldfine, H. and Griffith, O.H. 2002. *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C: activation and allostery. Biophys. Chem. 101-102, 347-358.

- Ryser, E.T., Arimi, S.M., Bunduki, M.M. and Donnelly, C.W. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62(5), 1781-1787.
- Sabanadesan, S., Lammerding, A.M. and Griffiths, M.W. 2000. Survival of *Listeria innocua* in salmon following cold-smoke application. J. Food Protect. 63(6) 715-720.
- Safdar, A. and Armstrong, D. 2003. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). J. Clin. Microbiol. 41 (1), 483-485.
- Salzer, W., Samuel Prgram, P. and Mccall, C.E. 1983. Clinical evaluation of moxalactam: evidence of decreased efficacy in gram-positive aerobic infections. Antimicrob. Agents CH. 23(4), 565-570.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. and Smith, G.C. 2005. Combination of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork Bologna stored at 4 °C in vacuum packages. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 38, 21-28.
- Sarımehmetoğlu, B. 1995. Sütte ve peynirde *Listeria monocytogenes* 'in bulunuşu ve önemi. Gıda Dergisi, 20(5) 259-264.
- Schell, R.F., Smith, B.R., Lefrock, J.L. and Francisco, M. 1983. Antimicrobial activity of cefmenoxime compared with those of other cephalosporins. Antimicrob. Agents CH. 23(5), 774-777.
- Schönberg, A. 1989. Method to determine virulence of *Listeria* strains. Int. J. Food Microbiol. 8, 281-284.
- Scotter, S.L., Langton, S., Lombard, B., Schulten, S., Nagelkerke, N., In't Veld, P.H., Rollier, P. and Lahellec, C. 2001. Validation of ISO method 11290 Part 1- Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Int. J. Food Microbiol. 64, 295-306.
- Sewell, A.M., Warburton, D.W., Boville, A., Daley, E.F. and Mullen, K. 2003. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. Int. J. Food Microbiol. 81, 123-129.
- Sharif, A. 1990. Çeşitli yörelere ait çiğ sütlerin ve Ankara piyasasında satılan pastörize sütlerin *Listeria monocytogenes* açısından değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 44s. Ankara.

- Sharif, A. 1993. Hayvansal kökenli pişirilmiş tüketime hazır, yarı pişirilmiş ve dondurulmuş gıdalardan *Listeria monocytogenes* 'in izolasyonu ve tanımlanması. Doktora tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, 69s. Ankara.
- Silbernagel, K.M., Carver, C.N. and Jechorek, R.P. 2004. Evaluation of Vidas *Listeria monocytogenes* II (LM02) Immunoassay method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study. J. AOAC Int. 87(5), 1123-1132.
- Silk, T.M., Roth, T.M.T. and Donnelly, C.W. 2002. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. J. Food Protect. 65(8), 1333-1337.
- Skovgaard, N. and Morgen, C.A. 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 6, 229-242.
- Smith, P.A., Mellors, D., Holroyd, A. and Gray C. 2001. A new chromogenic medium for the isolation of *Listeria* spp. Lett. Appl. Microbiol. 32, 78-82.
- Soumet, C., Ragimbeau, C. and Maris, P. 2005. Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. Lett. Appl. Microbiol. 41, 291-296.
- Soyutemiz, E. 2000. Vakumla paketlenen İnegöl köftelerin farklı derecelerde buzdolabında saklanması sırasında bakteri florasında ve *Listeria monocytogenes* sayısındaki değişiklikler. Gıda Dergisi 25(2) 79-86.
- Şireli, U. T., Erol, İ., Şahin, S., Terzi, G. ve Gürbüz, O. A. 2002. Tavuk kıyma, köfte ve burgerlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. Turk J. Vet. Anim. Sci. 26, 1271-1276.
- Teo, A.Y.L. and Knabel, S.J. 2000. Development of a simple recovery-enrichment system for enhanced detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. J. Food Protect. 63(4), 462-472.
- Teo, A.Y.L., Ziegler, G.R. and Knabel, S.J. 2001. Optimizing detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. J. Food Protect. 64(7), 1000-1011.
- Teuber, M. 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 56, 755-763.
- Tosun, H. ve Gönül, Ş. 2002. Bakterilerde çevresel streslere adaptasyon. Gıda Teknolojisi 6(1), 49-54.
- Tosun, H. ve Gönül, Ş. 2004. Bazı patojen bakterilerin aside tolerans kazanması ve gıda sanayisindeki önemi. Dünya Gıda 9(1), 78-83.

- Troxler, R., Von Graevenitz, A., Funke, G. and Wiedemann, B. and Stock, I. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* strains. Clin. Microbiol. Infect. 6 (10), 525-535.
- Tsai, H.N. and Hodgson, D.A. 2003. Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 69(11), 6943-6945.
- Tunail, N. 2000. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları. 2.baskı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını. Sim Mat. Ankara, 92-98.
- Turunç, T., Demiroğlu, Y.Z., Uncu, H. ve Arslan, H. 2004. İmmün sistemi sağlam bir kişide gelişen *Listeria monocytogenes* 'e bağlı menenjit olgusu. Mikrobiyoloji-Enfeksiyon Dergisi 3 (1) http://www.turkiyeklinikleri.com/abstract_tr.php?id=34437 Erişim Tarihi: 23.04.2007.
- Tunçel, G. ve Göktaş, D. 1989. Gıda kaynaklı listeriozis ve önemi. Ege Üniversitesi Müh. Fak. Dergisi, Seri B, 7(1), 111-119.
- Turantaş, F. 2001. Ozonun mikroorganizmalar üzerine etkisi (I). Gıda 6 (8) 97.
- Twedt, R.M., Hitchins, A.D. and Prentice, G.A. 1994. Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. J. AOAC Int. 77(2), 395-402.
- Üner, Y., Aksu, H. ve Ergün H. 2006. Baharatın çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkileri. <http://www.istanbul.edu.tr/fakulteler/veteriner/vetfakdergi/yayinlar/2000-1/Makale%201.pdf>, Erişim Tarihi: 25.04.2007.
- Van Netten, P., Perales, I., Van de Moosdijk, A., Curtis, G.D.W. and Mossel, D.A.A. 1989. Liquid and solid Selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 8, 299-316.
- Van Netten, P., Perales, I. and Mossel, D.A.A. 1988a. An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria* spp. in heavily contaminated foods. Lett. Appl. Microbiol. 7, 17-21.
- Van Netten, P., Van de Ven, A., Perales, I. and Mossel, D.A.A. 1988b. A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria* spp. in foods. Int. J. Food Microbiol. 6, 187-198.
- Vaz-Velho, M., Duarte, G. and Gibbs, P. 2001. Comparison of two pre-enrichments broths for recovering *Listeria* spp. from salmon (*Salmo salar*) and salmon-trout (*Oncorhynchus mykiss*) Food Control 12, 357-359.

- Vlaemyneck, G., Lafarge, V. and Scotter, S. 2000. Improvement of the *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostik, chromogenic isolation medium. J. Appl. Microbiol. 88, 430-441.
- Vlaemyneck, G. and Moermans, R. 1996. Comparison of EB and Fraser Enrichment Broths for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw-milk dairy products and environmental samples. J. Food Protect. 59(11), 1172-1175.
- Waak, E., Tham, W. and Danielsson-Tham, M.L. 1999. Comparison of the ISO and IDF methods for detection of *Listeria monocytogenes* in blue veined cheese. Int. Dairy J. 9, 149-155.
- Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. J. Appl. Microbiol. 90, 517-522.
- Walker, S.J., Archer, P. and Appleyard, J. 1990. Comparison of the Listeria-Tek ELISA kit with cultural procedures for the detection of Listeria species in foods. Food Microbiol. 7, 335-342.
- Warburton, D.W., Farber, J.M., Armstrong, A., Caldeira, R., Hunt, T., Messier, S., Plante, R., Tiwari, N. P. and Vinet, J. 1991a. A comparative study of the 'FDA' and 'USDA' methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Int. J. Food Microbiol. 13, 105-118.
- Warburton, D.W., Farber, J.M., Armstrong, A., Caldeira, R., Tiwari, N. P., Babiuk, T. and Lacasse, P., Read, S. 1991b. A Canadian comparative study of modified versions of the 'FDA' and 'USDA' methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 54(9), 669-676.
- Warburton, D.W., Farber, J.M., Powell, C., Tiwari, N. P., Read, S., Plante, R., Babiuk, T., Laffey, P., Kauri, T., Mayers, P., Champagne, M.J., Hunt, T., LaCasse, P., Viet, K., Smando, R. and Coates, F. 1992. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 9, 127-145.
- Warburton, D., Boville, A., Pagotto, F., Daley, E. and Chow, C. 2003. The detection of *Listeria* spp. In foods and environmental samples using PALCAM Broth. Government of Canada health products and food branch Ottawa. HPB Method. 11s. <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>. Erişim Tarihi: 21.04.2005.
- Westöö, A. and Peterz, M. 1992. Evaluation of methods for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: NMKL collaborative study. J. AOAC Int. 75(1), 46-52.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D. and McDermott, P.F. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes and Infection 4, 405-412.

- Wiedmann, M. 2002. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. J. AOAC Int. 85 (2), 524-531.
- Williams, D. A. and Lemke, T. L. 2002. Antibiotics and antimicrobial agents. Foye's Principles of medicinal chemistry. Fifth edition. Lippincott Williams&Wilkins, USA. 819,866.
- Wu, V.C.H. and Fung, D.Y.C. 2006. Simultaneous recovery and detection of four heat-injured foodborne pathogens in ground beef and milk by a four-compartment thin agar layer plate. J. Food Safety 26, 126-136.
- Yde. M. and Genicot, A. 2001 In vitro antimicrobial susceptibility testing in *Listeria monocytogenes*: the Belgian study. Scientific Institute of Public Health Reports. <http://www.iph.fgov.be/> Erişim Tarihi: 20.04.2005.
- Yokoyama, E., Maruyama, S. and Katsube, Y. 1998. Production of bacteriocin-like – substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 40, 133-137.
- Yoon, K.S., Burnette, C.N., Abou-Zeid, K.A. and Whiting, R.C. 2004. Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refrigeration and frozen storage. J. Food Protect. 67(11), 2465-2471.
- Yücel, N., Çıtak, S. and Önder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiology 22, 241-245.
- Zhang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A.A. and Meng, J. 2007. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. Int. J. Food Microbiol. 113, 47-53.
- Zhao, T. and Doyle, M.P. 2001. Evaluation of universal preenrichment broth for growth of heat-injured pathogens. 2001. J.Food Protect. 64(11), 1751-1755.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Deniz KOÇAN
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 25.05.1973
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Lisesi (1987-1990)
Lisans : Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü
(1991-1995)
Yüksek Lisans : Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enst. Süt Teknolojisi ABD
(1996-1999)
Doktora : Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enst. Gıda Mühendisliği
ABD (1999-2007)

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl

Arolez Dondo Dondurma, Üretim Müdürü (1997-2003)
TSE Mamul Gıdalar Hazırlık Grubu- Raportör (2004-2005)

Yayınları:

- 01) Koçan, D. 2002. Dondurma Üretiminde Kullanılan Farklı Stabilizörlerin Dondurma Yapısına Etkisi. Türkiye 7. Gıda Kongresi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Teknolojisi Derneği, Sayfa: 767-770. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- 02) Koçan, D., C. Koçak 2002. Vanilyalı Dondurma Üretiminde Quest Admul MG 4143 Emülgatörünün Farklı Kullanım Oranlarının Dondurma Niteliklerine Etkisi. Gıda 27(5) 369-377.
- 03) Çelik, E., Göksu, C., Keçecioğlu, H. Koçan, D., Halkman, A.K. 2004 Gıdalarda MUG Yöntemi ile *E. coli* Aranmasında Farklı UV Lamba Kaynaklarının Kullanılması. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Cilt: 02 Sayı:07 16-24. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040703.pdf
- 04) Koçan, D., Polat, G., Halkman, A.K. 2005. *Listeria monocytogenes* Analizinde Oxford Agar Besiyerinde Gelişen Refakatçi Floranın Belirlenmesi. 4. Gıda Mühendisliği Kongresi Kitabı, TMMOB Gıda Mühendisliği Odası, Ankara. Sayfa: 255-259.
- 05) Polat, G., Koçan, D., Halkman, A.K. 2005. CT-SMAC Agar Besiyerinde *E. coli* O157:H7 Dışında Gelişen Refakatçi Bakteriler. (Özet) 4. Gıda Mühendisliği Kongresi Kitabı, TMMOB Gıda Mühendisliği Odası, Ankara. Sayfa: 253.

- 06) Koçan, D. 2006. Daidzein, Genistein ve EquPol'un İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Türkiye 9. Gıda Kongresi Kitabı, GTD Yayın No: 33, Ankara. Sayfa: 999-1002.
- 07) Koçan, D., Polat, G., Halkman, A.K. 2006. Sosislerde Görülen Bir Sorunun Araştırılması. Türkiye 9. Gıda Kongresi Kitabı, GTD Yayın No: 33, Ankara. Sayfa: 737-740.
- 08) Polat, G., Koçan, D. 2006. Propolis ve Antimikrobiyal Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi Kitabı, GTD Yayın No: 33, Ankara. Sayfa: 1003-770.
- 09) Koçan, D., Halkman, A.K. 2006. *Listeria monocytogenes* ve Listeriozis. Gıda 31(3) Sayfa: 133-140.
- 10) Koçan, D., Halkman, A.K. 2007. *Listeria monocytogenes*: Teşhis Problemleri. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi kitabı, (basımda).