

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr.Müzeyyen Mamal Torun

**"SÜTÜN ISITILARAK KABARTILMASI"
YÖNTEMİ İLE SÜTLERİN LİSTERİYOZ YÖNÜNDEN
TEHLİKESİZ HALE GETİRİLİP GETİRİLEMeyeCEĞİ
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

111628

Yüksek Lisans Tezi

111628

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Biyolog Rabia Sevme

Ö N S Ö Z

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren yetişmemde büyük emeği geçen, bilgilerinden daima yararlandığım sayın hocam Prof.Dr.Ekrem Kadri UNAT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, değerli bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Prof.Dr.Ayhan YÜCEL'e teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaya başladığımızdan bu yana büyük yardımlarını gördüğüm, çalışmalarım süresince bana destek olan ve değerli bilgilerini bana aktaran danışman hocam Doç.Dr.Müzeyyen Mamal TORUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalı'ndaki çalışmam süresince daima yardımlarını gördüğüm, değerli hocalarım sayın Prof.Dr.Kemal ALTAŞ'a, sayın Prof.Dr.Yaşar BAĞDATLI'ya, sayın Doç.Dr.Mustafa SAMASTI'ya, sayın Yard.-Doç.Dr.Recep ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Ayrıca araştırmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma ve Anabilim Dalı'mızın çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
BULGULAR.....	34
TARTIŞMA.....	40
SONUÇ.....	53
ÖZET.....	55
SUMMARY.....	57
KAYNAKLAR.....	59

G İ R İ Ő

Süt her yaştaki insanın faydalandığı vücuda yararlı ve lüzumlu maddeleri taşıyan bir besindir. Buna karşılık süt bazı hastalıkların bazı koşullarda halk kitlelerine yayılmasında ve bulaşmasında önemli bir rol oynar. Listeriyoz, süt ve süt ürünleri yoluyla insana bulaşan önemli hastalıklar arasında bulunur.

İnsan için mükemmel bir besin olan süt, tüketiciye çiğ süt şeklinde veya belirli ısı uygulamaları yapılarak (Pastörizasyon-UHT gibi) dayanıklı hale getirildikten sonra sunulur(33).

Ülkemizde sütler genel olarak evlerde sütü ısıtarak kabartma veya kaynatma yöntemi uygulandıktan sonra daha az olarak da pastörlenmiş halde tüketilir. Çiğ süt içme alışkanlığı yurdumuzda pek yerleşmiş değildir. Sütü ısıtarak kabartma metodu Türkiye'nin en basit köylerinden en büyük şehirlerine kadar her tarafta şimdiye kadar kullanılagelmıştır. Hocamız Prof.Dr.Ekrem Kadri Unat ve Dr.Virjin Kasparyan yaptıkları bir çalışmada kabartma yöntemi uygulanan sütlerde Mycobacterium tuberculosis, Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B, Shigella schmitzii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus rettgeri, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Enterococcus, Brucella abortus, Brucella melitensis ve Corynebacterium

diphtheriae kökenlerinin öldüğünü göstermişlerdir(54).

Biz buradan yola çıkarak, sütün ısıtılarak kabartılması yöntemiyle sütlerin listeriyoz yönünden tehlikesiz hale getirilip getirilemeyeceğini araştırmak istedik. Bununla ilgili olarak önce çiğ sütlerde, listeria bakterilerinin hangi oranda bulunduğunu tesbit etmeye çalıştık. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda pastörlenmiş sütlerde listeria bakterileri bulunduğunun bildirilmiş olmasını ve pastörize sütlerin genellikle kabartma yöntemi uygulanmadan kullanılmakta olduğunu dikkate alarak pastörlenmiş sütlerde de listeria bakterilerinin bulunup bulunmadığını araştırdık. Bundan sonra içine listeria bakterileri ilave edilmiş sütleri kabarıncaya kadar ısıtarak bu yöntemin listeria'ları öldürüp öldürmediğini görmeye çalıştık. Son olarak da tezimizin başlığının sınırları içinde kalmak şartıyla bazı listeria bakterilerinin ısıya dayanıklılık durumlarını tesbit ettik.

GENEL BİLGİLER

Listeria monocytogenes 1926'da Murray, Webb, Swann tarafından tavşanlardaki monositoz hastalığının etkeni olarak bildirilmiştir. 1929 yılında Danimarka'lı Nyfeld tarafından da bu bakterinin insanlarda hastalık yaptığı yayınlanmıştır(3,53).

Listeria cinsindeki bakteriler 0.4-0.5 μm çapında 0.5- .2 μm uzunluğunda, sporsuz, kapsülsüz, aside dirençsiz, oda sıcaklığındaki kültürlerde hareketli Gram pozitif çomaklardır. Kısa zincirler oluşturabilir ve difteri etkeni gibi X, Y şekilleri de gösterebilirler. Ancak beyin omurilik sıvısında toparlağımsıdır. Üremeleri için en uygun sıcaklık 30-37°C'dir(53). Ayrıca 2-42°C arasında üreyebilirler(30). pH ortalama 7.4-7.8 ise de pH 9.6'ya kadar varan kalevilikte bile ürerler. Ancak ortamın asitliği 5 ve daha altına düşerse 2-3 günde ölürlere(52,53).

Bunlar oksijene ilgisine göre aeropluktan, fakültatif anaeropluga kadar değişik bir durum gösterir(37). % 10 NaCl ve % 40 safra bu bakterilerin üremesini durdurmaz. Bütün bu *listeria* kökenleri % 0.25 talyum asetat, % 3.75 potasyum tiyosiyonat, % 0.4 potasyum tellurit varlığında ürerler, fakat % 0.02 sodyum azid üremelerini durdurur(35).

Özel besiyerinde (*Listeria* agar'da) 0.2-0.4 mm çapında, ufak, sarı, saydam, üstten basık ve düzgün kenarlı koloniler yaparlar. Bu koloni-

ler saydam besiyerinde, yandan verilen ışıktaki mikroskopta incelenirse mavimsi yeşil renkte görünürler(53).

Listeria bakterileri katalaz pozitif, oksidaz negatif, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer reaksiyonları pozitifdir. İndol ve H₂S oluşturmazlar, sitrattan yararlanamazlar, nitratı nitrite indirgemezler (*L.murrayi* hariç). Jelatini eritmez, nişasta ve üreyi hidrolize etmez; fakat eskülin ve hippurattı hidrolizler(45).

Bütün *Listeria* kökenleri 48 saat içinde glukoz, mannoz, salisin, amygladin, sellobioz, eskülin, fruktoz'dan gaz yapmadan asit oluşturur. Asit oluşumu maltoz'dan (4 günde) dextrin'den (8 günde) gliserol'den (10 günde) olabilir. Galaktoz, laktoz, melesitoz, α -metil-D-mannosid, sorbitol, ramnoz, sukroz, trehaloz ve ksiloz'dan asit oluşturmaları bakımından türler arasında farklar vardır(45,52).

Hiçbir zaman adonitol, arabinoz, dulcitol, eritritol, glikojen, inozitol, inülin, mannitol, mellibioz, raffinöz ve sorboz'dan asit oluşturmazlar(45).

Listeria kökenleri, çoğu antibiyotiklere duyarlıdır. *Listeria* bakterilerinin in vitro deneylerinde ampicillin, neomycin, novabiocin, carbenicillin, cephaloridine, chloromphenicol, erythromycin, ticarcillin, azlocillin, daha az olmak üzere chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline, gentamycin, kanamycin, nitrofurantoin, penicillin G ve streptomycin'e, trimetoprim-sülfametoksazol'e duyarlıdır. Ampicillin-sulbactam kombinasyonu ampicillin'e dirençli kökenlerde bile in vitro etkili bulunmuştur. Buna karşılık colistin sülfate, nalidiksik asit, polymyxin B ve sulfonamidlere dirençlidir(13,35,50).

Listeria bakterilerinden yalnızca *Listeria monocytogenes* ve *Listeria ivanovii* in vivo deneylerde fareler için hastalandırıcıdır(35). Bu güne kadar ancak bir *L.seeligeri* kökeni meninjitli bir hastanın beyin omurilik sıvısından ayrılmış ve birkaç gün içinde erişkin fareler canlı kalmışlar-

dır(37).

Listeria monocytogenes'i diğer mikroplarla karışık halde olan muayene maddelerinden ayırmak için seçici besiyeri geliştirme çabaları ilk kez Gray ve arkadaşları tarafından başlatılmıştır(35).

1948'de ilk kez Gray tarafından tarif edilen, kültürleri +4 derecede çoğaltma tekniği, değişik muayene maddelerinden *Listeria monocytogenes*'i ayırmak için tavsiye edilmiş ve kullanılmıştır(35).

Listeria bakterileri +4 derecede üreyebilmekte ve 3-4 sene bu ısıda canlı kalabilmektedir(16,19,22,48,49).

Besiyerine diğer bakterileri baskılayıcı olarak tuz, safra ve çeşitli boyaların belirli yoğunluklarda ilavesi esasına dayanan ayırdetme yöntemleri de bildirilmiştir. Ayrıca ilk kez Henry tarafından tarif edilen ve *Listeria* kolonilerinin saydam besiyerine yandan verilen ışıqla mavi-yeşil rölle vermesi özelliğine dayanan teknik, bakterilerin tanımlanmasında günümüzde de başarıyla kullanılmaktadır(35).

Listeria bakterilerinin doğada yaygın olarak bulunmasına karşılık klinik belirti veren infeksiyonların seyrek oluşu etkenin fırsatçı bir patojen olduğunu düşündürmektedir. Bu sebeple *Listeria monocytogenes* ile oluşan infeksiyonlar, bildirilen salgınlar dışında genellikle seyrek tir.

Listeria infeksiyonlarında gözlenen artış, laboratuvardaki ayırım ve tanımlı yöntemlerinin gelişmesine ve daha güvenilebilir olmasına bağlamışlardır(38).

İnsanda *Listeria monocytogenes* ile oluşan infeksiyonlar gebelerde, yenidoğanlarda ve bağışıklık sistemi herhangi bir sebeple baskılanmış erişkinlerde daha sık olarak görölmektedir(2,7,25,39).

Hayvanlarda özellikle koyun ve sığırlarda düşük, ensefalit ve sep-

tisemi başlıca klinik görünümüdür(33).

Listeria bakterileri ayrıca köpek, kedi, keçi, domuz, at gibi çeşitli memelilerde, kuşlarda, kümes hayvanlarında, kaplumbağalarda, balıklarda ve kenelerde bulunabilmektedir. Kuşlarda taşıyıcılık fazladır ve özellikle lağımlarda beslenen martılarda % 24 kadar *Listeria* taşıyıcılığı bildirilmiştir(34,39).

Listeria monocytogenes, *brucella*, *salmonella* ve mikobakteriler gibi zorunlu olmayan bir hücre içi parazitidir. Makrofajların içine yerleşip çoğalabilirler. *Listeria monocytogenes*'e karşı dirençte timusa bağımlı T limfosit aktivitesi ve makrofajlar önemli rol oynamaktadır(25,52,53).

Özellikle T limfosit ve makrofajları olumsuz etkileyen durumlar, hastalığa zemin hazırlamaktadır. İnsanların çoğunda *Listeria monocytogenes*'e karşı, T hücre aktivitesinin bulunması, hiç olmazsa kısmi bir bağışıklık olduğunu gösterir(27,39,53).

İnfeksiyona dirençte öncelikle hücre aracılığı ile ilgili bağışıklık söz konusu ise de sıvılardaki faktörlerde kısmen etkilidir(25).

Bağışıklık yetersizliğinin bulunduğu durumlarda; fizyolojik şartlarda (prematüre, gebelik, ileri yaşlılık) altta yatan hastalıklarda (limfoma, lösemi, timörler, diyabet, alkolik siroz, aşırı demir yüklenmiş kronik hemodiyaliz ...) veya bağışıklığı baskılayıcı tedavi olanlarda (özellikle böbrek nakli yapılan hastalar) listeriyoza duyarlılık söz konusudur. Bununla birlikte görünürde normal kişilerde de infeksiyon ortaya çıkabilmektedir(2,45,38).

İnsanlar *L. monocytogenes*'i belirtisiz olarak taşırlar ve sağlıklı görünenler içinde taşıyıcılık % 5'dir. Böbrek nakli geçirmiş hastalar, hamile kadınlar, hayvan ürünlerini işleyen insanlar gibi gruplarda bu oranın arttığı görülür(26). Özellikle taşıyıcı hayvan çıkartıları ile kirlenen toprak, su, bitki gibi canlı ve cansızlar *L.monocytogenes*'in doğada yayılmasına ve

kalıcılığına yardım edebilmekte ve diğer yandan taşıyıcı hayvanların kesim işlemi veya listeriyozlu hayvanlardan süt sağılması esnasında bu bakterinin yiyecek ve içeceklere bulaştırılabileceği düşünülmektedir. Bütün bunlar, klinik olarak sağlıklı görünen *L.monocytogenes* ile infekte hayvanlar ve bunların kirlettiği doğal çevrenin insan listeriyozu için güçlü bir birikim oluşturduğunu göstermektedir(35,56).

Listeria cinsi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de (1986) 5 tür olarak gösterilmiştir.

Bu beş tür, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*'dir. Genomları bakımından bu 5 tür ayrı olmasına rağmen ileri derecede fenotipik benzerlikler göstermektedir.

Bu 5 türden başka Bergey'in Manual'inde *Listeria* cinsi içinde kalan 3 tür daha vardır. Bunlar *Listeria denitrificans*, *Listeria grayi* ve *Listeria murrayi*'dir. Son yıllarda yapılan ileri çalışmalarda *Listeria denitrificans*'ın *Jonesia* denen yeni bir cins içinde sınıflandırıldığı görülmektedir. Buna karşılık *L.grayi* ve *L.murrayi* *Listeria* cinsi içinde bırakılmıştır. 1987'de *L.denitrificans*, *Jonesia* adında ayrı bir tür olarak gösterilmiştir(26,45).

İdeal bir sınıflandırma veya taksonomi mümkün olduğu kadar morfoloji, fizyoloji, biyokimya ile olduğu kadar genomu ve genlerle ilgili bilgilere de dayandırılmalıdır. İyi bir sınıflandırmada farklı bilgi çeşitlerine dayanarak yapılan grupta esnasında yüksek derecede uyumluluk söz konusu olmalıdır(26).

Listeria cinsinin diğer cinslerle ilişkili olan taksonomice durumu henüz aydınlanmamıştır. Son zamanlarda elde edilen bilgilerle taksonomi, seroloji, kimya ve nükleik asit bilgileri *Listeria* cinsini *Coryneform* bakterilerden ayırırken bu cinsin *Bacillus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsi ile olan yakın ilişkisini de göstermiştir. Ayrıca hücre duvarı

bileşimine giren kimya maddeleri *Listeria* cinsinin *Brochothrix* cinsi ve *L.grayi*, *L.murrayi* sınıfları ile büyük derecede benzerliğini de ortaya koymuştur(45).

Listeria cinsindeki bazı türlerde hemolizin mevcuttur. Özellikle *L.monocytogenes* için bunun bir virulens faktörü olduğu gösterilmiştir.

1940'da Paterson H ve O antijenlerine göre *Listeria* cinsini serolojice dört tipe ayırmıştır ve bu esasa dayanarak antijen şeması 1972'de Donker-Voet ve 1975-1976 yıllarında Seeligeri tarafından gösterilmiştir(45).

Günümüzde Seeliger ve Donker-Voet tarafından sunulan serolojiye dayanan tablo, 5 kirpik antijeni ile 14 somatik antijen esas alınarak ortaya çıkmıştır. *L.monocytogenes*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.innocua*, *L.ivanovii* olmak üzere (5 tür) bugün 16 serotip içermektedir(37).

CETVEL-1: *Listeria* türlerinin serovarlarının dağılımı

Serovarlar	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.ivanovii</i>
1/2a,b,c	+++	+++	+		
3a,b,c	++	++			
4a,ab,b,c,d,e	+++	+	+	+	
6a,b,A.S		++	++	+++	
5					+++

+ : 1 ile 10 köken

++ : 11 ile 50 köken

+++ : 50 den daha fazla köken

A.S : Anlaşılmayan serovarlar(37)

Cetvel-1 *Listeria* türlerinin (5 tür) serovarlarının dağılımını göstermekte ve ayrıca bu şemaya dahil edilmeyen *L.denitrificans*, *L.grayi*,

L.murrayi serolojice de *Listeria* cinsi üyelerinden farklıdır(45).

Listeria bakterilerinin stafilokoklar, streptokoklar, enterokoklar, *E.coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Bacillus subtilis* gibi değişik cinslerden bazı Gram pozitif bakterilerle ortak antijenleri vardır(45,53).

Listeria cinsi içinde *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* ve *Listeria seeligeri* hemolitik olmasına rağmen yalnızca *L.monocytogenes* ve *L.ivanovii* patojendir. Bundan dolayı hemoliz, *Listeria* cinsinde virulan kökenlerin in vitro göstergesi olarak düşünülmemektedir. Bir patojenik özelliği göstermemekle beraber hemoliz deneyi farklı *Listeria* türleri arasındaki ayırımı ortaya çıkarmak için genellikle kullanılmaktadır(35).

İn vitro deneylerde ortaya çıkan zayıf veya şüpheli hemolitik reaksiyon, hemolitik aktiviteyi arttıran CAMP (Christie, Aktins, Munch-Peterson) deneyi kullanılarak çözülebilmektedir.

Bu deney beta hemoliz oluşturan bir *Staphylococcus aureus* kökeni ile hemolitik aktivitesi incelenen bakterinin birlikte üretilmesi esasına dayanır. Ancak *L.ivanovii*'nin ayırımı için, *Rhodococcus equi* kökeni ile yapılan CAMP deneyi daha uygundur(27,31,35,46).

Türler arası ayırimda faydalanılabilecek deneyler ve bunların sonuçları Cetvel-2'de gösterilmiştir.

CETVEL-2: Çeşitli *Listeria* Türlerinin Bazı Ayırdedici Özellikleri^{a,b(45)}.

	L. mono cytogenes	L. innocua	L. seeligeri	L. welshimeri	L. ivonovi	L. grayi	L. murrayi	L. denitrificans
Düzensiz boyanma	-	-	-	-	-	-	-	+
β -hemoliz	+ ^c	-	+	-	+ ^d	-	-	-
<i>St. aureus</i> ile yapılan CAMP testi	+ ^c	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rho. equi</i> ile yapılan CAMP testi	-	-	-	-	+	-	-	-
ASID oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. Arabinos</i>	(d)	-	-	-	-	+	+	+
Dextrin	(d)	-	-	-	(d)	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	+
Glycogen	(d)	+	-	-	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+	+	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	+	+	-
Mannitol	(d)	-	-	-	(d)	-	-	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	-	+	-	+	+	-
α -Methyl-D-Glukoside	+	+	-	+	-	-	(d)	-
α -Methyl-D-Mannoside	+	(d)	-	(d)	-	-	-	-
<i>L. Rhamnose</i>	(d)	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Eriyebilir nişasta	-	(d)	-	-	(d)	-	-	+
Sukroze	-	-	+	+	+	-	-	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	+
HIDROLİZ	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	+	+	-	-	+	-	-	-
Hippurate	(d)	(d)	-	-	-	-	-	+
Nişasta	(d)	(d)	-	-	+	-	-	-
Lesitinose	+	+	-	-	-	-	-	+
Fosfataz	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrat reduksiyonu	+	-	-	-	-	-	-	+
Fareler için patojenlik	+	-	-	-	+	-	-	+?

a,b; Chatelain ve Second, 1966; Collins ve ark., 1983; Friedler ve Sager, 1983; Rocaout ve Grimont, 1983; Seelyger, 1981; Seeliger ve Welshimer, 1974; Stuart ve Welshimer, 1974; Welshimer ve Meredith, 1971; Wetzel ve ark., 1968; Wilkonson ve Jones, 1977 tarafından elde edilen istatistik sonuçları.

(d); Kökenlerin % 11-89'u pozitif; c; L. monocytogenes'in bütün kökenleri β -hemoliz oluşturmaz; d; L. ivonovi kökenleri tarafından oluşturulan geniş β -hemoliz zonu; e; İncelenen 30 kökenden, bir köken pozitif sonuç vermedi; f; İncelenen 10 kökenden bir köken pozitif sonuç verdi (Rocaout ve Grimont, 1983).

Listeria'ların ısıya dayanıklılık araştırmaları 1926'da bu bakterilerin ortaya çıkarılmasıyla başlamıştır(17). Isıya dayanıklılık deneyleri en fazla Zeller tarafından yapılmıştır(9).

1988 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün bir bülteninde, değişik çalışmalarda L.monocytogenes'in ısıyla inaktivasyonu ile ilgili birbirleriyle çelişen sonuçlar ortaya konmuştur. Bu durum ısıya direnci araştırmak için kullanılan deney yöntemlerindeki farklılıklarla açıklanabileceği bildirilmiştir(56).

Listeria bakterilerinin değişik ısı işlemleri karşısında nasıl etkilendikleri konusunda çok sayıda araştırmacı tarafından farklı sonuçlar bildirilmiştir(9,17,56).

Araştırmacıların bir kısmı Listeria bakterilerini yok etme işlemi için pastörlenmeyi güvenilebilir bir yöntem olarak görürken(11,12,15), diğer bir kısmı da bu bakterilerin pastörizasyon sıcaklığına dayanıklılık gösterdiklerini bildirmişlerdir(19,25).

Lovett 1988'de süt ürünlerinden L.monocytogenes'in ayırđedilmesi için acriflavine, nalidiksik asit ve cxloheximide içeren zenginleştirilmiş buyyonu ve değiştirilmiş Mc Bride agarını kullanmıştır(31).

Bannerman ve Bille diğer mikropları da taşıyan muayene maddelerinden Listeria kökenlerinin ayırđı için yeni bir besiyeri geliştirmeye çalışmışlar. Acriflavine ve Ceftazidime eklenerek hazırlanan besiyerinin, değiştirilmiş Mc Bride agarı ile karşılaştırmasını yapmışlar, süt ve süt ürünlerinde bu yeni besiyerinin daha çabuk sonuç verdiğini göstermişlerdir(6). Kürsümüzde de Dr.Ferda Soysal tarafından gerçekleştirilen bir tez çalışmasında sütlerdeki listeria bakterilerinin varlığını gösterebilecek besiyeri geliştirilmiştir(47).

Son yıllarda dünyada listeriyoz vak'alarında belirgin bir artış gözlenmektedir. Gıdalara bağlı çeşitli Listeria infeksiyonlarından ölüm oranı

oldukça yüksektir(16,28,38,39).

Anneden çocuğa bulaşma dışında genellikle bulaşma, sindirim yolundan gıdalarla olmaktadır. Seyrek olarak da veterinerlerde temas yoluyla cilt infeksiyonu da görülmektedir(1,23,38). Bakteri sindirim sistemi ve vaginada yerleşmektedir(33).

Dünyanın çeşitli ülkelerinde görülen salgınlar bulaşmanın gıda yoluyla olduğunu çiğ süt, pastörize süt, peynir, çiğ et, kümes hayvanları, çiğ balık, ıstıdye, çiğ sebzelerin önemli rol oynadığını ve infeksiyonun kaynağını oluşturdıkları gösterilmiştir(17,28,38,41,43).

Gıda işlemlerinde bulaşmanın önlenmesi, ürünün cinsine ve hazırlanma yöntemlerine bağlıdır. Listeriyozdan korunmada beslenme ve pişirme alışkanlığının büyük önemi vardır(39).

Yurdumuzda ilk kez Özcebe ve Doğruer tarafından 1945 yılında Bandırma Merinos Çiftliği koyunlarında listeriyoz vak'ası tesbit edilmiş ve koyunların beyninden *Listeria monocytogenes* üretilmiştir. 1954 yılında İyigören İnanlı İnekhanesinde iki vak'a tesbit etmiş ve danalarda *Listeria monocytogenes*'i ayırmıştır. Yine 1957 yılında Böğrün, İnanlı İnekhanesi koyunlarında listeriyoz tesbit etmiştir. 1960 yılında Yılmaz, Sungurlu kazasında bir yetiştiriciye ait sürüdeki bir ceninden *Listeria monocytogenes* ayırmıştır(14).

Daha sonraki yıllarda 1968'de abseden(4), 1971 yılında vagina salgısından(1), 1972 yılında bir meninjit vak'asında beyin omurilik sıvısından(5), *Listeria monocytogenes* üretildiği bildirilmiştir.

Anabilim Dalı'mızın protokol defterlerinde beyin omurilik sıvısı ve kandan *Listeria* üretildiğini bildiren kayıtlar vardır.

Potel (1954) adlı bir araştırmacı a tipik mastitisli bir ineğin sütünden *L.monocytogenes*'i ayırmış ve bu ineğin sütünü içen bir gebe kadında

vakitsiz ikiz bebek ölümü meydana gelmiştir. Annenin içtiği çiğ süt ile bu ineğin sütünden elde ettiği *L.monocytogenes*'in aynı serotipte olduğunu görmüştür. Bu vak'a *Listeria* infeksiyonunun sütle geçtiğini gösteren kesin bir delil olmuştur(23,42).

1959 yılında Welshimer ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada Richmond hastanesinde 2 yıl 3 aylık bir zamanda 8 günlük ile 64 yaşları arasında değişen 7 listeriyoz vak'ası tesbit edilmiş ve 9 günlük bir bebek ölümü görülmüştür(55).

1981 yılında Kanada'da listeriyoz salgını görülmüş ve lahana suçlanmıştır. Bir hastanın buzdolabındaki lahana yemeğinden ve hastanın hemokültüründen ayrılan *Listeria* ile aynı serotipte olan *L.monocytogenes* üretilmiştir. Ayrıca Kanada'da ithal peynir ve ev dondurmalarında da listeria kökenleri ayrılmıştır(18,40).

1985 yılında Los Angeles California'da Mexican-style yumuşak peynirinden kaynaklanan vak'a tesbit edilmiştir. İngiltere'de de ithal yumuşak peynir kaynaklı bir vak'a bildirilmiştir(29,41).

1987 yılında İsviçre'deki salgın yumuşak peynire bağlanmıştır(44).

1988 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından yurdumuzda yapılan bir araştırmada Türkiye peynirlerinde *L.monocytogenes* oranı % 1 bulunmuştur. Oysa bu oran Orta ve Batı Avrupa peynirlerinde % 5 kadardır(41,51).

İngiltere'de rapor edilen listeriyoz vak'aları çarpıcı bir artış göstermiştir. 1970'lerin başlarında 25 olan vak'a sayısı 1988 yılında 52 ölüm ve 11 düşük ile sonuçlanan 291 vak'aya ulaşmıştır. 1986 ve 1987 yılları arasında bu sayı iki katına çıkmış, 1989'da ise vak'a sayısı 251'e inmiştir. 1990 yılının ilk 6 ayında 59 vak'a tesbit edilmiş ve bu rakam 1989 yılının ilk 6 ayına göre bir düşüş olduğunu göstermiştir(48,56).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇLER

I. DENEYLERİMİZDE KULLANILAN KÖKENLER

Deneylerimizde Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'mız laboratuvarlarında ayrılıp isimlendirilen *Listeria* cinsine ait 50 tane bakteri kökeni kullanıldı. Bu bakteri kökenlerinden 28 tanesi çiğ süttten, 10 tanesi pastörlenmiş süttten, 12 tanesi de peynirlerden ayrıldı. Çiğ süt ve pastörlenmiş süt örneklerinden ayrılan *Listeria* bakterileri tarafından elde edildi. Peynir kökenlerinden ayrılan *Listeria* bakterileri ise Anabilim Dalı'mızda bu konuyla ilgili çalışma yapan arkadaşımız Biyolog Deniz Parlakgöl'den sağlandı. Deneylere aldığımız bütün *Listeria* cinsi bakterilerden 10 tanesi *L.monocytogenes*, 12 tanesi *L.innocua*, 8 tanesi *L.welschimeri*, 7 tanesi *L.seeligeri*, 3 tanesi *L.ivanovii*, 8 tanesi *L.grayi*, 2 tanesi *L.murrayi*'dir. Bunların tür ve elde edildiği kaynaklarla ilgili dökümü Cetvel-3'de gösterildi.

CETVEL-3: Deneylerimizde kullandığımız Listeria bakterilerinin tür ve elde edildiği kaynaklara göre dağılımı

Kökenler	Çiğ Süt	Pastörleşmiş Süt	Peynir
L.monocytogenes	4	3	3
L.innocua	9	1	2
L.seeligeri	5	1	1
L.welshimeri	4	3	1
L.ivanovii	1	1	1
L.grayi	5	1	2
L.murrayi	-	-	2
Toplam	28	10	12

Gerek kendi ayırdığımız türlerin isimlendirilmesinde gerekse Biyolog D.Parlakgöl'den sağladığımız kökenlerin cins ve tür olarak kontrollerinde aşağıda anlatılan besiyerleri ve yöntemler uygulandı.

Deneylerimizde bakterileri üretmek ve tanımlamak amacıyla aşağıda bildirilen besiyerleri ve ayıraçlar kullanıldı.

II. LİSTERİA'LARI ÜRETMEK VE TANIMINI YAPMAK AMACIYLA KULLANILAN BESİYERLERİ

A. Bakterileri Üretmek İçin Kullanılan Besiyerleri

1- Ana balıklı Buyyon(53)

Bu besiyeri balığın bütün vücudunu kendi enzimlerine hazmettirerek hazırlanır.

Hamsi, istavrit, sardaya, uskumru, palamut ... gibi balıklar kullanılabilirse de deneylerimizde hamsiden hazırladığımız ana balıklı buyyon kullanıldı. Bunların küçük, yağsız ve en tazeleri tercih edilir. Bunlar suda iyice yıkandı ve kıyma makinesinden çekildi. Eğer bunlar kıyma makinasın-

dan çekilemeyecek kadar kalın kemikli iseler bunların omurga ve yüzgeçleri çıkarıldı. Fakat iç organları asla atılmadı. Balık kıyması tartıldı bir balona veya uygun bir kaba kondu. Ağırlığının iki katı % 0.6 sodyum karbonatlı su kondu, karıştırıldı ve içine % 7.5 olacak kadar kloroform katıldı ve 37°C'de 48 saat, arada sırada karıştırılarak hazma uğratıldı.

Bu metodla elde edilen sıvı önce bez torbalardan sonra süzgeç kağıdından süzüldü. HCl ile pH'sı 7.5-7.6'ya ayarlandı. Buğu kazanında 100°C'de bir saat ısıtılarak steril edildi. Tekrar süzgeç kağıdından süzüldü ve 100°C'de 1 saat veya otoklavda 115°C'de 15 dakika ısıtılarak steril edildi. Serin ve karanlık bir yerde saklandı. Elde edilen bu besiyeri (1/2 balıklı besiyeri) ana balıklı besiyeridir. % 0.5 NaCl'lü su ile 5 katı sulandırılarak 1/10 balıklı buyyon, 10 katı sulandırılarak % 1 Peptonlu su yerine kullanıldı. Ayrıca diğer bazı besiyerlerini hazırlamak üzere temel bir besiyeri olarak da ana balıklı besiyerlerinden faydalanıldı.

1-a) 1/5 sulandırılmış balıklı buyyon

1/2 Ana balıklı buyyon	20	ml
% 0.5 Fizyolojik tuzlu su	80	ml

1-b) 1/10 sulandırılmış balıklı buyyon

1/2 Ana balıklı buyyon	10	ml
% 0.5 Fizyolojik tuzlu su	90	ml

1-c) 1/20 sulandırılmış balıklı buyyon

1/2 Ana balıklı buyyon	5	ml
% 0.5 Fizyolojik tuzlu su	95	ml

2- Maya Özlü Eğri Çukulatamsı Agar(53)

1/20 sulandırılmış balıklı buyyon	1000	ml
Maya özü	5	g
Agar agar	10	g

pH'sı 7.4'e ayarlanıp 120°C'de 30 dakika otoklavlandı. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra % 5 olacak şekilde koyun kanı ilave edilip kaynamakta olan suda 2 dakika tutuldu. Soğuduktan sonra tüplere bölünüp eğri olarak katılaştırıldı.

Saf kültür elde etmek ve kökenleri saklamak için kullanıldı.

3- Sıvı Çoğaltıcı - Seçici Besiyeri: Değiştirilmiş Talyum Asetat-Ceftazidimli Besiyeri(47)

1/20 sulandırılmış balıklı buyyon	1000	ml
Maya özü	5	g
Talyum asetat	2	g
Ceftazidime	50 mg/	l
Cycloheximide	100 mg/	l

1/20 sulandırılmış 1000 ml miktarındaki balıklı buyyona 5 g maya özü ve 10 g agar agar ilavesiyle hazırlanan besiyerinin pH'sı 8-8.5'a ayarlandıktan sonra 120°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Besiyeri 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra ceftazidime ve cycloheximide ilave edilip karıştırıldı. Soğuduktan sonra steril şartlarda deney tüplerine 10'ar ml olarak dağıtıldı.

Ceftazidime'nin Hazırlanması (50 mg/ l):

100 mg ceftazidime + 0.5 ml distile su karıştırılır. Eğer 1000 ml'lik sıvı besiyeri hazırlanıyorsa bu karışımdan 0.25 ml alınır. Ceftazidime diğer bakterilerin üremesini önlemek için kullanılmıştır(6).

Cycloheximide'nin Hazırlanması (100 mg/ l):

100 mg Cycloheximide + 10 ml distile su ilave edilir ve karıştırılır. Eğer 1000 ml'lik sıvı besiyeri hazırlanıyorsa bu karışımın tamamı kullanılır. Cycloheximide maya mantarlarının üremesini önlemek için kullanıldı(31,48).

Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri, Listeria bakterilerinin üretilmesi amacıyla kullanıldı.

4- Katı Seçerek - Ayırtıcı Besiyeri: Değiştirilmiş Talyum Asetat - Nalidiksik Asitli Besiyeri(47).

1/20 sulandırılmış balıklı buyyon	1000	ml
Maya özü	5	g
Agar agar	10	g
Defibrine koyun kanı	50	ml
Nalidiksik asit	40	µg/ml
Acriflavin	10	µg/ml

1/20 sulandırılmış 1000 ml miktarındaki balıklı buyyona 5 g maya özü ve 10 g agar agar ilavesiyle hazırlanan besiyerinin pH'sı 8-8.5'a ayarlanıp 120°C'de 30 dakika otoklavlandı. Besiyeri 45-50°C'ye kadar soğutulup % 5 koyun kanı ilave edildi ve kaynamakta olan suda 10 dakika tutuldu. 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine nalidiksik asit ve acriflavin ilave edilip karıştırıldı ve besiyeri Petri kutularına dağıtıldı.

Nalidiksik Asidin Hazırlanması (40 µg/ml):

100 mg Nalidiksik asit, 1 ml % 4'lük NaOH içinde eritildi. Bunun üzerine 9 ml distile su ilave edildi.

Acriflavin'in Hazırlanması (10 µg/ml):

10 mg Acriflavin 1 ml distile su içine ilave edilir ve iyice karıştırılır. Eğer 1000 ml'lik sıvı hazırlanıyorsa bu karışımın tamamı kullanılır.

Listeria katı seçerek-ayırıcı besiyeri listeria kolonilerinin tanımlanması amacıyla kullanıldı.

B. Tanımda Kullanılan Besiyerleri(52).

1- Kanlı agar besiyeri

1/20 sulandırılmış balıklı buyyon	1000	ml
Agar agar	10	g
Defibrine koyun kanı	20	ml
pH 7.2-7.4	20	ml

Agar agar 1/20 balıklı buyyonda ısıtılarak eritildi. pH 7.4'e ayarlandı. Otoklavda 120°C'de 20 dakika steril edildi. 40-45°C'ye soğuduğunda içine 20 ml koyun kanı ilave edildi ve Petri kutularına döküldü. Bu besiyerinde bakterilerin hemoliz yapıp yapmadıkları incelendi.

2- Listeria'ların hareket muayenesi için kullanılan besiyer

1/20 sulandırılmış ana balıklı buyyon	100	ml
Maya özü	0.5	g

Bu karışımın pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra 5 ml olarak tüplere bölündü ve 120°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

3- Karbonhidratlı besiyerleri

Deneylerde kullanılan karbonhidratlı ve benzeri olan maddeler şunlardır:

Monosakkaridler: Glukoz, D-ksiloz, L-ramnoz, galaktoz

Disakkaridler: Laktoz, sukroz, maltoz

Polisakkaridler: Dekstrin

Polihidrik alkoller: Mannitol

Glikozidler: Eskülin

a) Glukozlu besiyeri

Ana balıklı buyyon 20 ml

% 0.5 Fizyolojik tuzlu su 100 ml

% 0.5 İki sodyumlu fosfat 80 ml

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$)

Bromtimol mavisi (% 0.4) 1 ml

(0.4 g Bromtimol mavisi + 12.8 ml 0.05 N NaOH bir havanda ezilir ve damıtık su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanır)

Glukoz 1 g

Sodyum tiyosülfat (suda 1/10) 2 ml

pH 7.2-7.4

Yukarıda adı geçen ilk dört madde karıştırıldı. 100°C'de 1 saat ısıtıldı. Sıcak iken içine glukoz ve 1/10'luk sodyum tiyosülfat eriyiğinden 2 ml konuldu. Tüplere 5'er ml olarak dağıtıldı ve buğu kazanında 100°C'de 30 dakika steril edildi.

Bu besiyeri bakterilerin asit ve gaz oluşturmalarının araştırılması ile birlikte, H_2S yapımının da incelenmesi amacıyla kullanıldı.

Gaz oluşumunu incelemek için bu besiyerinin bulunduğu deney tüplerine bir Durham tüpü konuldu.

b) Diğer Karbonhidratlı Besiyerleri (Laktoz, Maltoz, Sukroz, Mannitol, Dekstrin, Galaktoz):

1/10 sulandırılmış balıklı buyyon 1000 ml

Bromtimol mavisi (% 0.4)
pH 7.2-7.4

10 ml

Buyyon besiyeri ve bromtimol mavisi karıştırıldı. Karbonhidratlar besiyeri içine % 1 oranında konuldu. Tüplere 5'er ml dağıtılarak 100°C'de 30 dakika steril edildi.

Bu besiyerleri bakterilerin laktoz, maltoz, sukroz, mannitol, dekstrin, galaktoz'dan asit oluşturup oluşturmadıklarını anlamak üzere kullanıldı.

c) D-Ksiloz ve L-Ramnoz Besiyerleri:

1/20 sulandırılmış balıklı buyyon	1000 ml
Fenol kırmızısı (% 0.4)	10 ml

Buyyon ve fenol kırmızısı karıştırıldı. L-Ramnoz (D-Ksiloz) besiyeri içine % 1 oranında ilave edildi. Tüplere 5'er ml olarak dağıtıldı. Kaynayan suda 10 dakika tutularak steril edildi.

Yukarıda yapılışı anlatılan 3-a,b,c karbonhidratlı sıvı besiyerleri içine bakterilerin 24 saatlik buyyon kültürlerinden 0,1 ml ilave edildi. 37°C'de bir hafta bekletildi. Bu süre içinde besiyerinde asit oluşumu sebebiyle meydana gelen sarı renk pozitif olarak değerlendirildi.

4- Değiştirilmiş Clark-Lups Besiyeri:

1/5 sulandırılmış balıklı buyyon	1000 ml
Glukoz	5 g
Dipotasyum fosfat	5 g

Yukarıdaki maddeler karıştırıldı. Tüplere 5'er ml olarak dağıtıldı. 100°C'de 30 dakika steril edildi. Bu besiyerinde bakterilerin asetoin yapımı ve metil kırmızısı deneyleri incelendi.

5- Nitratlı Buyyon Besiyeri:

1/5 sulandırılmış balıklı buyyon	1000	ml
Potasyum nitrat	1	g
pH 7.3-7.4		

Maddeler buyyonda eritildi. Tüplere 5'er ml olarak dağıtıldı. 100°C'de 30 dakika steril edildi.

Bu besiyeri nitrat redüktazın varlığını ortaya çıkarmak için kullanıldı.

6- Sitratlı Besiyeri:

Sodyum amonyum fosfat	1.5	g
Monopotasyum fosfat	1	g
Mağnezyum sülfat	0.2	g
Sodyum sitrat	3	g
Distile su	1000	ml

Yukarıdaki maddeler karıştırıldı. pH 6.8'e ayarlandı. Tüplere 5 ml olarak dağıtıldı ve 100°C'de 60 dakika ya da 120°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

Bu bakterilerin karbon kaynağı olarak sitrattan yararlanıp yararlanmadığını ortaya çıkarmak için kullanıldı.

III. DENEYLERİMİZDE KULLANILAN AYIRAÇLAR(53)

1- İndol Ayırıcı:

İndol oluşumu ortaya çıkarmak için H.Braun ve W.Silberstein'in değiştirdiği Ehrlich-Pringsheim eriyiği kullanıldı.

Para-dimetil aminobenzaldehit	5	g
Metanol	50	ml
Fosforik asit	10	ml

Yukarıdaki maddeler karıştırıldı. 5x0.5 cm boyutlarındaki süzgeç kağıtlarına emdirildi. Kurutulduktan sonra kullanıldı.

2- Katalaz Ayırıcı:

Katalaz enziminin varlığını göstermek için % 30 H_2O_2 kullanıldı.

3- Oksidaz Ayırıcı:

Oksidaz göstergesi olarak Kovacs ayırıcı kullanıldı.

Tetrametyl-para-phenylendiamine dihydrochloride	0.1	g
Distile su	10	ml

Yukarıdaki maddeler karıştırılarak hazırlandı. Bu ayıraç az zehirli, çok duyarlıdır. Fakat dayanıklı değildir. Bu sebeple hazırlanır hazırlanmaz hemen kullanıldı.

4- H_2S Ayırıcı:

H_2S teşkilini görmek için kurşun asetat çözeltisi emdirilmiş süzgeç kağıtları kullanıldı.

Kurşun asetat	10	g
Distile su	100	ml

Çözelti hazırlandıktan sonra 5x0.5 cm boyutlarındaki süzgeç kağıtlarına emdirildi. Oda ısısında bekletilerek kurutulduktan sonra besiyerinin bulunduğu tüplerin içine, pamukla cam arasına sıkıştırılarak kullanıldı.

5- Üreaz Ayıracı:

Üre	0.5	g
Fenol ftalein (alkoldeki % 1 eriyikten)	0.2	ml
Distile su	20	ml

Yukarıdaki maddeler karıştırıldı. Tüplere 1'er ml olarak dağıtıldı.

6- Nitrat Ayıracı:

A çözeltisi

Sülfanilik asit	8	g
Asetik asit (5N)	1000	ml

B çözeltisi

Alpha-naphthylamine	5	g
Asetik asit (5 N)	1000	ml

Yukarıdaki maddeer ayrı ayrı karıştırılarak A ve B çözeltileri hazırlanır.

7- Voges-Proskauer Ayıracı (Coblentz Ayıracı):

A çözeltisi

% 85'lik alkol	10	ml
Alfa naftol	5	g

B çözeltisi

KOH	40	g
Distile su	100	ml
Kreatin	0.3	g

Bu çözeltiler ayrı ayrı hazırlandı.

8- Metil Kırmızısı Ayıracı:

Metil kırmızısı	0.1	g
% 95'lik alkol	300	ml
Distile su	200	ml

Metil kırmızısı, alkolde eritildikten sonra damıtık su ilave edildi.

IV. KULLANDIĞIMIZ MUAYENE MADDELERİ

1- Çiğ süt ve pastörlenmiş süt örneklerinden *Listeria* kökenlerinin ayırımı ve tanımlanmasını gerçekleştirmek üzere 50 adet pastörlenmiş süt, 50 adet de güğümlerde satılan çiğ sokak sütü kullanıldı. Pastörlenmiş sütler çeşitli firmalara ait olup 46 tanesi şişelerde, 4 tanesi de kutularda pazarlanmıştı. Çiğ sütler ve pastörlenmiş sütler İstanbul'da değişik semtlerde, farklı zamanlarda tüketime sunulan sütçü, bakkal ve marketlerden temin edildi. Peynirler de çeşitli zamanlarda, çeşitli semt pazarlarından temin edildi.

2- Sütün ısıtılarak kabartılması metodu ile sütlerin listeryoz yönünden tehlikesiz hale getirilip getirilemeyeceğini araştırmak amacıyla değişik semtlerden farklı zamanlarda sağlanan 50 adet 500 ml'lik çiğ süt kullanıldı.

3- *Listeria* bakterilerinin ısıya direncinin incelenmesi için çiğ süt, pastörlenmiş süt, sterillenmiş süt kullanıldı.

YÖNTEMLER

Amacımıza uygun olarak;

I. Sokakta güğümlerde satılan süt (çiğ süt) ve pastörlenmiş süt örneklerinde listeria bakterilerinin üretilmesi ve tanımlanması,

II. Sütün ısıtılarak kabartılması metodu ile sütlerin listeriyoz yönünden tehlikesiz hale getirilip getirilemeyeceğinin araştırılması,

III. Listeria bakterilerin ısıya direncinin incelenmesi planlanıp aşağıda yazıldığı şekilde uygulandı.

I. Sokakta Güğümlerde Satılan Süt (Çiğ Süt) ve Pastörlenmiş Süt Örneklerinde Listeria Bakterilerinin Üretilmesi ve Tanımlanması:

İstanbul'un değişik semtlerindeki market ve bakkallarda satılan 46 adet şişe, 4 adet kutu pastörlenmiş sütlerden ve sokakta güğümlerde satılan 50 adet çiğ sütlerden en az 100 ml olacak şekilde steril cam Erlenmayer'e numuneler alındı. Bu numuneler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmak şartı ile en geç 24 saat içinde laboratuvara getirildi. Bu sütlerin herbirinden iki ayrı santrifüj tüpüne bölündü ve santrifüjlendi (12,36) (üst kısımda krema oluncaya kadar). Üstteki krema kısmından ve altta toplanan çöküntüden toplam olarak 1 ml olacak şekilde örnek alındı.

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan örnekler Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerine 1'er ml olarak ekildi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı(22). Bu besiyerinden 7 gün sonra Listeria katı seçici-ayırıcı çukulatamsı agar besiyerine ilk pasajları alındı. Ortalama 5 ile 7 gün arasında, oda ısısında üremeye bırakıldı. Sıvı besiyerleri yine $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı(11,24).

Listeria katı seçici-ayırıcı çukulatamsı agar besiyerinde üreyen 1-1.5 mm çapında ufak sarı saydam üstten basık ve düzgün kenarlı olan şüpheli kolonilerden maya özlü eğri çukulatamsı agar besiyerine pasajlar alınarak 37°C 'de 24-48 saat tutuldu ve saf kültürleri elde edildi. Üreyen bakteri-

lerden Gram preparasyonu hazırlandı. Düzenli boyanan birbirine paralel veya V, Y şekilleri gösteren sporsuz, kapsülsüz ince gram pozitif çomakcıklar şeklinde görülen bakteriler ileri incelemeye alındı. Bunların 22°C ve 37°C'de hareket özellikleri, katalaz varlığı, eskülini hidrolize etme özellikleri araştırıldı. 22°C'de hareketli, katalaz deneyi pozitif ve eskülini hidrolize eden bakteriler *Listeria* cinsi bakteriler olarak kabul edildi. Bakterilerin bu özellikleri aşağıdaki şekilde araştırıldı.

1- Hareket Deneyi

% 0,5 g maya özü ilave edilen 1/20 sulandırılmış balıklı buyyona, bakterilerin, 24 saatlik buyyon kültüründen bir ekim halkası miktarında ilave edildi. Hem 22°C, hem de 37°C olmak üzere 24 saat üretime bırakıldı. Bu üreme sonucunda, çukur lam kullanılarak yapılan mikroskop incelemesinde 22°C'de ve 37°C'de hareket özellikleri değerlendirildi.

2- Katalaz Deneyi

Bakterilerin katalaz aktivitesini göstermek için temiz lam'a pipetle alınan maya özlü eğri çukulatamsı agar besiyerindeki 24 saatlik bakteri örneği sürüldü. Üzerine bir damla % 30 H₂O₂'den damlatıldı. Karıştırılmadan gaz çıkıp çıkmadığına bakıldı. Gazın çıkması katalaz enziminin varlığını gösterdi.

3- Eskülin Deneyi

Bakterilerin maya özlü eğri çukulatamsı agardaki 24 saatlik ürününden bir ekim halkası miktarı eskülinli balıklı buyyona ekildi. 37°C'de 24 saat üretildi. Besiyerinde oluşan siyah renk eskülin hidrolizini gösterdi.

Eğer bu ilk pasajda *Listeria* cinsi bakteriler ürememiş ise +4°C'de bekletilen sıvı çoğaltıcı seçici besiyerinden ondördüncü günde ikinci pasajı, yirmibirinci günde üçüncü pasaj, yirmisekizinci günde dördüncü pasajlar alınarak inceleme sürdürüldü.

Listeria cinsine ait olduğu tesbit edilen bakterilerin tür tanımı için aşağıdaki diğer özellikleri de incelendi.

1- Oksidaz Deneyi:

Kovacs ayırıcı ile gösterildi. Bir Petri kutusu içine süzgeç kağıdı konarak ortasına 2-3 damla Kovacs ayırıcı damlatıldı. Maya özlü eğri çukulatamsı agardaki 24 saatlik bakteri kültüründen pipetle alınarak kağıt üzerine sürüldü. Pozitif reaksiyonda koyu renk meydana geldi.

2- Voges-Praskauer:

Clark-Lubs besiyerine, bakterilerin 24 saatlik buyyon kültüründen ekildi. 48 saat 37°C'de üretildi. Bu süre sonunda besiyerine 0.6 ml A ve 0.2 ml B olmak üzere Coblentz ayırıcı ilave edildi. Karıştırıldı. 15 dakika içinde meydana gelen kırmızı renk pozitif olarak değerlendirildi.

3- Metil Kırmızısı Deneyi:

Clark-Lubs besiyerine bakterilerin 24 saatlik buyyon kültürlerinden bir ekim halkası miktarı ekildi. 37°C'de 48 saat üretildi. Bu süre sonunda besiyerine 5 damla metil kırmızısı ayırıcı ilave edildi. Karıştırıldı. Kırmızı renk pozitif, sarı renk negatif olarak değerlendirildi.

4- Üreaz Deneyi:

Üreazın varlığını göstermek için hazırladığımız besiyerine bakterilerin maya özlü eğri çukulatamsı agardaki 24 saatlik ürününden tüpün kenarında bol miktarda ekim halkasıyla bastırarak ezmek suretiyle kondu. Ekilmemiş bir kontrol tüpü ile birlikte 37°C'de üretim dolabına kaldırıldı. 24-48 saat içinde rengin kızarması pozitif, rengin değişmeden kalması negatif olarak değerlendirildi.

5- Sitrat Deneyi:

Bakterilerin karbon kaynağı olarak sitrattan yararlanıp yararlanmadığını ortaya çıkarmak için, bakterilerin maya özlü eğri çukulatamsı agardaki 24 saatlik ürününden az miktarda ekim iğnesiyle bastırarak ezmek suretiyle bulandırmadan ekildi. 24 saat sonra besiyerinde meydana gelen bulanıklık, bakterinin karbondan faydalanıp ürediğini, hiçbir değişiklik olmaması ise üreme olmadığını gösterdi.

6- Nitrat Redükleme Deneyi:

Bakterilerin 24 saatlik buyyon kültüründen bir ekim halkası miktarı tüpün kenarında bastırarak ezmek suretiyle nitrat buyyona ekildi. 37°C'de 48-72 saat tutuldu. Bu süre sonunda nitrat A ve B ayıraçlarından 1'er ml miktarında besiyerine ilave edildi. Birkaç dakikada beliren kırmızı renk pozitif olarak değerlendirildi.

7- İndol Yapımının Araştırılması Deneyi:

Bu deney için maya özlü eğri çukulatamsı agar besiyerindeki 24 saatlik kültüründen, triptopanca zengin bir besiyeri olan 1/20 sulandırılmış balıklı buyyona bir ekim halkasıyla tüpün kenarında bastırarak ezmek suretiyle ekildi. Tüpün üst kısmına Ehrlich-Pringsheim çözeltisi emdirilmiş indol kağıtları asıldı. 24-48 saat 37°C'de üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda asılı kağıdın renginin kızarması indolün varlığını gösterdi.

8- Karbonhidratlardan Asit ve Gaz Oluşumunun İncelenmesi Deneyi:

Bu deney Glukoz, D-Ksiloz, Mannitol L-Ramnoz, Maltoz, Sukroz, Dextrin, Galaktoz içeren sıvı karbonhidratlı besiyerleri kullanılarak yapıldı. Bakterilerin 24 saatlik yoğun buyyon kültürlerinden 0,1 ml miktarı bu besiyerine ilave edildi. 37°C'de bir hafta bekletildi. Bu süre içinde besiyerlerinde asit oluşumu sebebiyle meydana gelen sarı renk pozitif olarak

değerlendirildi.

9- Hemoliz Deneyi:

Bakterilerin maya özlü eğri çukulatamsı agar besiyerindeki 24 saatlik kültüründen bir ekim iğnesi miktarında alınan bakteri kültürü % 2 koyun kanlı agar besiyerine çizgi şeklinde ve ayrıca batırma yöntemiyle ekildi. Besiyerleri 37°C'de 48 saat üretime bırakıldı. Bu süre sonunda üreyen bakterilerin çevresinde beta hemolizli bir bölgenin oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

10- CAMP Deneyi:

% 2 koyun kanlı agarda şüpheli hemoliz gösteren bakterilerin hemolitik etkilerini ortaya çıkarmak üzere bu deney yapıldı. *Staphylococcus aureus* bakterilerinin 24 saatlik kültüründen bir ekim halkası miktarı kanlı agar besiyerinin ortasına 1 cm genişliğinde ekildi. Hemoliz etkisi denenen bakterilerin maya özlü eğri çukulatamsı agar besiyerindeki 24 saatlik kültürlerinden ekim iğnesi ile alınan ürün, bu bakterilere dik olarak ekildi. 48 saat 37°C'de üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda iki bakterinin birbirine değdiği görülen artan bir beta hemoliz, pozitif olarak değerlendirildi.

II. Sütün Isıtılarak Kabartılması Metodu İle Sütlerin Listeriyoz Yönünden Tehlikesiz Hale Getirilip Getirilemeyeceğini Amaçlayan Deneyler:

Steril cam balona alınmış olan çiğ süt örnekleri +4°C'de tutulmak şartıyla en geç 24 saat içinde laboratuvara ulaştırıldı. 500 ml'lik çiğ süt örneği 250'şer ml'lik iki Erlenmayer'e bölündü. *Listeria* bakterilerinin (*L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.innocua*, *L.welshimeri*, *L.murrayi*, *L.grayi*) *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerinde 24 saatlik kültürleri elde edildi. Bu kültürlerin bulanıklığı yaklaşık olarak 1 ml'de 300 milyon bakteri içerecek şekilde ayarlandı. Bu sıvı besiyerindeki kültürlerden 5'er

ml alınarak içinde 250'şer ml çiğ süt bulunduran Erlenmayer'lere ilave edildi.

Hazırlanan bu iki Erlenmayer'den biri kontrol amacı olarak kullanıldı. İkincisi de hava gazı üzerinde ısıtıldı. Sütler kabarma süresince gözlemlendi ve kabarmaya başlayınca kabaran sütün altından hava gazı çekildi. 250 ml'lik sütün kabarmaya başladığı anda sıcaklık 97-98°C'de idi ve bu sıcaklıkta 3-4 saniye kaldı. Isıtılan sütün sıcaklığı oda sıcaklığına gelince buradan ve kontrol olarak kullanılan örneklerden 4 ml'lik sıvı çoğaltıcı-seçici listeria besiyerine 1'er ml ekimi yapıldı. +4°C'ye kaldırıldı.

Ekimlerden 7 gün sonra Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerinden bir ekim halkası miktarında Listeria katı seçerek-ayırıcı çukulatamsı agara pasajları alındı. Oda sıcaklığında üremeye bırakıldı(10,22). 7-10 gün sonra kontrol tüpünden alınan pasajlarda üreme gözlemlendi. Üreyen bu kolonilerden Gram yöntemiyle preparat hazırlanıp boyandığında Gram pozitif çomakçıkların olduğu görüldü. Kabartılarak ısıtılan sütlerden pasajların alındığı besiyerinden yapılan incelemelerde hiçbir üreme olmadığı tesbit edildi.

Yukarıda anlatıldığı gibi ekimlerin yapıldığı Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerinden, Listeria katı seçerek-ayırıcı çukulatamsı agara ondördüncü günde ikinci bir pasaj, yirmibirinci günde üçüncü bir pasaj, yirmisekizinci günde dördüncü bir pasaj daha alındı ve bu süreler sonunda üreme olup olmadığı incelendi. Sonuçta birinci pasajda olduğu gibi sadece kontrol tüplerinde üreme görüldü. Kabartma yöntemi uygulanan tüplerde ise üreme gözlenmedi.

Bu kabarmış süt örnekleri +4°C'de 7 ay bekletildikten sonra alınan pasajlarda listeria bakterilerinin üremediği gözlemlendi.

III. Listeria Bakterilerinin Isıya Dirençlerinin İncelenmesi:

Bu bakterilerin ısıya dirençleri iki şekilde incelendi:

1- Farklı *Listeria* kökenlerinin (*L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.innocua*, *L.grayi*, *L.murrayi*) *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerinde 24 saatlik kültürleri elde edildi. Bu kültürlerin bulanıklığı yaklaşık olarak 1 ml'de 300 milyon bakteri içerecek şekilde ayarlandı.

Deney tüplerine 4'er ml *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri konuldu. Herbir deney tüpünün üzerine ayrı ayrı çeşitli *Listeria* kökenlerinin 24 saatlik sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerindeki kültürlerinden 1'er ml ilave edildi. Daha sonra bu tüpler mikroplu sıvılı kısımları tamamen sıcak su içinde kalacak şekilde su banyosuna yerleştirildi. 50°C'de 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika tutuldu. Bu sürelerin sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler akan musluk suyu altında derhal soğutulduktan sonra sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerine 1'er ml olacak şekilde ekildi. Ekimi yapılan tüpler +4°C'ye kaldırıldı. 7 gün bekletildikten sonra bu tüplerden katı seçici-ayırıcı çukulatamsı agar besiyerine pasajları alındı ve 37°C'de 48-72 saat üremeye bırakıldı. Üreme gözlenen besiyerlerindeki koloniler Gram yöntemiyle boyanarak incelendi.

50°C'den başka 55°C, 60°C, 65°C'lerde de aynı deney tekrarlandı.

Ayrıca 50°C, 55°C, 60°C, 65°C'de 5, 10, 15, 20, 25 dakika sürelerle yapılan bu deneyler en az üç kez, 60°C'de 30'uncu dakika süresi sonuna kadar yapılan deneylerde de en az beş kez olmak koşuluyla tekrarlandı.

2- Deneye aldığımız çeşitli *Listeria* kökenlerinin *Listeria* agarındaki 24-48 saatlik kültürlerinden fizyolojik tuzlu suda süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonların bulanıklığını yaklaşık olarak 1 ml'de 300 milyon bakteri içerecek şekilde ayarlandı. Deney tüplerine 4'er ml süt (çiğ süt, pastörlenmiş süt, sterillenmiş süt) konuldu. Herbir deney tüpünün üzerine yukarıda hazırlanmış olan çeşitli *Listeria* bakterilerinin tuzlu sudaki süspansiyonlarından 1'er ml ilave edildi. Sonra tüpler mikroplu sütlü kısımları tamamen sıcak su içinde kalacak şekilde su banyosuna yerleştirildi.

50°C'de 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika tutuldu. Bu sürelerin sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler akan musluk suyu altında derhal soğutulduktan sonra sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerine 1'er ml olacak şekilde ekildi. Ekimi yapılan tüpler +4°C'ye kaldırıldı. 7 gün bekletildikten sonra tüplerden katı seçici-ayırıcı çukulatamsı agar besiyerine pasajları alındı. 37°C'de 48-72 saat üremeye bırakıldı. Üreme gözlenen besiyerindeki koloniler Gram yöntemiyle boyanarak incelendi.

50°C'den başka 55°C, 60°C, 65°C'lerde de aynı deney tekrarlandı.

Ayrıca 50°C'de, 55°C, 60°C ve 65°C'de 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika süreyle yapılan bu deneyler en az 3 kez olmak koşuluyla tekrarlandı.

B U L G U L A R

Gereçler ve yöntemler bölümünde açıklanan üç grup deneylerden elde edilen bulgular aşağıdaki maddelerde özetlenerek toplanmıştır:

I. Çiğ süt ve pastörlenmiş süt örneklerinde listeria bakterilerinin üretilmesi ve tanımlanması deneylerine ait bulgular.

II. Sütün ısıtılarak kabartılması metodu ile sütlerin listeriyoz yönünden tehlikesiz hale getirilip getirilemeyeceği deneylerine ait bulgular.

III. Listeria bakterilerinin ısıya dirençlerinin incelenmesi deneylerine ait bulgular.

I. Çiğ Süt ve Pastörlenmiş Süt Örneklerinde Listeria Bakterilerinin Üretilmesi ve Tanımlanması Deneylerine Ait Bulgular:

İncelenen 50 çiğ süt örneğinden 28 tane (% 56), 50 pastörlenmiş süt örneğinden ise 10 tane (% 20) olmak üzere toplam 38 tane (% 38) listeria cinsine ait bakteri üretildi ve tür olarak tanımları yapıldı.

Cetvel-3 ve 4'de görüldüğü gibi çiğ süt ve pastörlenmiş süt örneklerinden üretilen listeria bakterilerinin tamamı +4°C'de üreme, 22°C-28°C'de hareket özelliği gösterdi. Katalaz deneyi pozitif, oksidaz deneyi negatif, Voges-Proskauer ve metil kırmızısı deneyleri pozitif, nitrat redüksiyonu deneyi negatif, sitrat deneyi negatif, indol ve H₂S deneyi negatif, üreaz deneyi negatif, eskülin hidrolizi pozitif olarak belirlendi.

CETVEL-3: Çiğ süt örneklerinden üretilen *Listeria* cinsi bakterilerinin özellikleri.

Köken No	Ayrılan Kökenler	37 derecede hareket	22-28 derecede hareket	Katalaz	Eskülin	Oksidaz	Voges-Proskauer	Metil kırmızısı	Nitrat reduksiyonu	Sitrat	İndol ve H ₂ S	Üreaz	+4°C de üremesi	D-Glukoz	Laktöz	Mannitol	Maltoz	Sukroz	D-Ksiloz	Ramnoz	Dekstrin	Galaktöz	%2 koyun kanlı agar da hemoliz	<i>Staphylococcus aureus</i> ile yapılan CAMP testi
1	<i>L.monocytogenes</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
2	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
3	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
4	"	±Az	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
5	<i>L.innocua</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
6	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
7	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
8	"	±Az	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
9	"	±Az	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
10	"	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
11	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
12	"	±Az	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
13	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
14	<i>L.welshimeri</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
15	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
16	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
18	<i>L.seeligeri</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
19	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
20	"	±Az	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
21	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
22	"	-	±Az	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
23	<i>L.ivanovii</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
24	<i>L.grayi</i>	-	±Az	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
25	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
26	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
27	"	±Az	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
28	"	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+

Cetvel-5'de görüldüğü gibi 50 çiğ süt örneğinden 4 tane (% 8) *L.monocytogenes*, 9 tane (% 18) *L.innocua*, 4 tane (% 8) *L.welshimeri*, 5 tane (% 10) *L.seeligeri*, 1 tane (% 2) *L.ivanovii*, 5 tane (% 10) *L.grayi* olmak üzere toplam 28 tane (% 56) *Listeria* cinsi bakteri üretildi.

50 pastörlenmiş süt örneğinden 3 tane (% 6) *L.monocytogenes*, 1 tane (% 2) *L.innocua*, 3 tane (% 6) *L.welshimeri*, 1 tane (% 2) *L.seeligeri*, 1 tane (% 12) *L.grayi* 1 tane (% 2) *L.ivanovii* üretildi.

Çiğ sütlerde ve pastörlenmiş sütlerde bulduğumuz *Listeria* türleri sayı ve yüzde olarak Cetvel-5'de gösterildi. Bu cetvelin incelenmesinde görüleceği gibi toplam 100 süt örneğinden 7'sinde (% 7) *L.monocytogenes*, 10'unda (% 10) *L.innocua*, 7'sinde (% 7) *L.welshimeri*, 6'sında (% 6) *L.seeligeri*, 2'sinde (% 2) *L.ivanovii*, 6'sında (% 6) *L.grayi* bulundu. Örneklerin hiç birinde *L.murrayi* tesbit edilemedi.

CETVEL-5: Çiğ süt ve pastörlenmiş süt örneklerinden üretilen *Listeria* cinsine ait 38 bakterinin türlere göre dağılımı ve yüzdesi

<i>Listeria</i> türlerinin adı	50 çiğ sütte		50 pastörlenmiş sütte		Toplam	
	Sayısı	Yüzdesi	Sayısı	Yüzdesi	Sayısı	Yüzdesi
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	%8	3	%6	7	%7
<i>Listeria innocua</i>	9	%18	1	%2	10	%10
<i>Listeria welshimeri</i>	4	%8	3	%6	7	%7
<i>Listeria seeligeri</i>	5	%10	1	%2	6	%6
<i>Listeria ivanovii</i>	1	%2	1	%2	2	%2
<i>Listeria grayi</i>	5	%10	1	%2	6	%6
Toplam	28	%56	10	%20	38	%38

Listeria cinsi olarak belirlenen bakterilere, tür özelliklerini ortaya çıkaracak deneyler uygulandığında bunların Cetvel-5'de görüldüğü şekilde 6 türe ait oldukları tespit edildi.

II. Sütün Isıtılarak Kabartılması Metodu İle Sütlerin Listeriyoz Yönünden Tehlikesiz Hale Getirilip Getirilemeyeceği Deneylerine Ait Bulgular:

Değişik yerlerden toplanan 50 çiğ sütün her birine, yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde; 7 türden *Listeria* kültürleri ilave edilip kabarcıncaya kadar ısıtıldıktan sonra incelendiğinde bütün süt örneklerindeki *Listeria* bakterilerinin tamamının cansız kaldığını, kontrol grubunu oluşturan yani ısıtarak kabartma yöntemi uygulanmayan süt örneklerindeki bu bakterilerin ise canlı olduğunu tespit ettik.

Kabarmış süt örnekleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 7 ay bekletildikten sonra alınan pasajlarda *Listeria* bakterilerinin üremediği, buna karşılık kabarmamış süt örneklerindeki *Listeria* bakterilerinin ürediğini gördük.

III. *Listeria* Bakterilerinin Isıya Direncinin İncelenmesi Deneylerine Ait Bulgular

Cetvel-6'da toplanan bu sonuçlar incelendiğinde; *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerine ve ayrıca çiğ süt, pastörleşmiş süt ve sterillemiş süt örneklerine 7 türden *Listeria* kültürleri ilave edildikten sonra 50, 55, 60 derecede sıcaklığın uygulandığı bütün deney gruplarında ve 5, 10, 15, 20, 25 dakika süreler sonunda *Listeria* kökenlerinin canlı kaldığı görülmektedir. Diğer bir ifadeyle sütlerde bulunan *Listeria* kökenlerini öldürmek için 25 dakika süreyle uygulanacak 50, 55, 60 derecelik sıcaklığın yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. 60°C 'lik sıcaklıkta 30 dakika süreyle uygulandığı deney grubuna gelince burada yalnız bir deney hariç bütün *Listeria*'ların öldüğü görülmektedir.

Bu ayrıcalık gösteren deney, *L.monocytogenes*'in ilave edildiği *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerini, 60°C 'de 30 dakika ısıtıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta bekletildikten sonra gözlemlenmiş olup en az beş defa tekrarlanan bu deneyin yalnız birinde bu bakterinin canlı kaldığını, diğerlerinde ölmüş olduğunu tespit ettik.

Ayrıca bu bakterilerin 65°C 'de 5 dakika ısıtma süresine bile dayanamadıklarını gördük.

CETVEL-6: Çeşitli Listeria bakterilerinin 50-60°C arasında 30'uncu dakikaya kadar olan ısıya dayanıklılık deneyinin sonuçları.

ÇALIŞILAN KÖKENLER	KULLANILAN BESİYE- Rİ VE SÜTLER	50°C						55°C						60°C						65°C					
		5'	10'	15'	20'	25'	30'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	5'	10'	15'	20'	25'	30'
L.monocytogenes	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	± ^b	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt, pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	± ^a	-	-	-	-	-	-	-
L.innocua	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	± ^a	-	-	-	-	-	-	-
L.welshimeri	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt, pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L.seeligeri	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt, pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	± ^a	-	-	-	-	-	-	-
L.vanovii	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt, pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	± ^a	-	-	-	-	-	-	-
L.grayi	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt, pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L.murrayi	Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyeri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Çiğ süt, pastörleştirilmiş süt, sterilleştirilmiş süt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Isıya dayanıklılık deneyi sonucu canlı kalan.

-: Isıya dayanıklılık deneyi sonucu yaşamayan.

±^a: Isıya dayanıklılık deneyi sonucu üç deneyden ikisinde canlı kalan.±^b: Isıya dayanıklılık deneyi sonucu beş deneyden birinde canlı kalan.

T A R T I Ŗ M A

Doğada yaygın olarak bulunan *Listeria* bakterileri çok çeşitli, kaynaklardan elde edilmiştir. Bunlar; toprak, dışkı, akarsular, lağım suları, tarım alanları, yemlikler, koyun, sığır, keçi, köpek, kedi, at, domuz gibi evcil yabani hayvanlar, kuşlar ve kümes hayvanları, balıklar, kabuklular, kanatlılar, çiğ et ve et ürünleri, çiğ süt ve süt ürünleri ile sebzelerdir(2,7,25,35,39,41,43,48,49,51).

Listeria bakterileri için gıda kaynaklarının önem taşıyan dördü; süt ve süt ürünleri, çiğ et ve et ürünleri, çiğ sebze ve salatalar ile deniz ürünleridir(27,41). *Listeria* bakterileri içinde en önemli tür *L.monocytogenes*'dir ve bu türün çiğ sütlerden yaklaşık olarak % 5 oranında ayrıldığı bildirilmiştir(56).

Her yaştaki insanın faydalandığı çok kıymetli besin olan süt yurdumuzda (bölgelere göre de değişmek üzere) genel olarak pastörlenmeden ve pastörlenmiş olarak tüketilmektedir. Bu sebeple çalışmamız da İstanbul'da tüketilen çiğ sütler ile pastörlenmiş sütlerde *Listeria* bakterilerinin bulunma oranının tespiti ve ayırdığımız bu kökenlerinin tanımı yapılmıştır. Ayrıca *Listeria* bakterilerinin ısıya direnci araştırılmıştır. Bundan başka bilindiği gibi yurdumuzda sütü ağız açık kapta ısıtarak kabarcıya kadar beklemek ve kabarcınca da taşmaması için ısıtma işlemine son vermek adettir. İşte bu halk metodunun sütleri listeriyoz yönünden tehlikesiz hale geti-

rilip getirilemeyeceği tespit edilmiştir.

İstanbul'un değişik semtlerinden elde ettiğimiz 50 çiğ süt örneğinin 4'ünden (% 8) *L.monocytogenes* ve ayrıca 9 tane (% 18) *L.innocua*, 4 tane (% 8) *L.welshimeri*, 5 tane (% 10) *L.seeligeri*, 1 tane (% 2), *L.ivanovii*, 5 tane (% 10) *L.grayi* olmak üzere toplam 28 listera bakterisi 28 çiğ süt örneğinden ayırdedildi.

Çiğ sütte *L.monocytogenes*'in varlığı konusunda değişik ülkelerde araştırmalar yapılmış olduğu görülmektedir. Bunlar Cetvel-6'da özetlenmiştir.

CETVEL-7: Çiğ sütte *L.monocytogenes*'in varlığı ile ilgili olarak çeşitli ülkelerde yapılan araştırmalar(8,21,24,31,32).

ÜLKE	İncelenen örnek sayısı	Listeria monocytogenes pozitiflik	Araştırmacılar
Fransa	337	13(%3,8)	Gledal J (1986).
Hollanda	137	6(%4,3)	Berkers,H.J. ve ark(1987).
B.Almanya	635	2(%0,2)	Gasparoviç,E. (1988).
U.S.A.	350	13(%37)	Lovett ve ark.(1987).
California	100	0	Lovett ve ark.(1987).
Massachusetts	200	14(%7,0)	Lovett ve ark.(1987).
Atlanta	121	15(%12)	Hayes,S.P. ve ark.(1985).

Bizim çalışmamızda 50 çiğ süt örneği için *L.monocytogenes*'in bulunma oranının % 8 olduğu, Dr.Ferda Soysal tarafından yapılan bir çalışmada ise bu oranın 63 çiğ süt örneği için % 6.3 olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda Cetvel-7 incelendiğinde çiğ süt örneklerindeki *L.monocytogenes*'in bulunma oranının % 0-12 arasında değiştiği görülmektedir. Bu oranların bizim çalışmamızdaki oranla kıyaslandığında birbirine yakın olduğu anlaşılmaktadır.

İstanbul'un değişik semtlerinden elde ettiğimiz 50 pastörlenmiş süt örneğinin 3'ünde (% 6) *L.monocytogenes* bulduk. 1 örnekte (% 2) *L.innocua*, 3 örnekte (% 6) *L.welshimeri*, 1 örnekte (% 2) *L.seeligeri*, 1 örnekte (% 2) *L.ivanovii*, 1 örnekte (% 2) *L.grayi*'e rastlandı. Örneklerin hiçbirinde *L.murrayi*'e rastlanmadı ve 10 pastörlenmiş süt örneğinden, 10 *listeria* kökeni elde edilmiştir.

50 çiğ süt örneğinden 28 tane, 50 pastörize süt örneğinden toplam 10 tane *listeria* cinsi bakteri üretilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda *listeria* bakterileri çiğ süt örneklerinde pastörize süte göre daha yüksek oranda bulunabileceği, pastörlemenin bunların sayısını azalttığı ancak tamamen yok etmediği görülmektedir. Ancak bu durum pastörlemenin uygun şekilde uygulanıp uygulanmadığı endişesini de hatıra getirmektedir.

Diğer taraftan *L.monocytogenes*'in uygun pastörlenme işlemine dayanabileceği bildirilmiştir. Bu sebeple sütte bu bakterilerin yaşama ve çoğalmalarını etkileyen faktörler büyük önem taşımaktadır. WHO, 1988'den itibaren 71.7°C'de 15 saniyelik pastörlemenin süt içindeki *L.monocytogenes*'e karşı güvenilir bir ısı işlemi olduğunu belirlemiştir. Böyle olmakla beraber çeşitli ülkelerde farklı zamanlarda görülen listeriyoz salgınlarında infeksiyon kaynağının pastörlenmiş sütler olduğu da anlaşılmıştır(39,56).

1983'de Massachusetts'te pastörlenmiş süttten kaynaklanan 49 listeriyoz vak'ası saptanarak bunların 40'ından *Listeria monocytogenes* ayrılmıştır. *Listeria* bakterilerinin pastörlenmeye dirençli olabileceğini veya sütün pastörizasyondan sonra bulaşabileceğini gösteren yayınlar da bulunmaktadır(10,12,15,20,24,28,32).

1985 yılında İspanya'da (% 32 yağ içeren 78°C'de 5 saniye işlem gören) 28 pastörlenmiş süt örneğinin 6'sından *Listeria monocytogenes* kökeni elde edildiği bildirilmiştir(19).

1985 yılında Atlanta'da yapılan bir çalışmada da pastörleme işlemlerinin yapıldığı tesiste kullanılan 14 süt filtresi örneğinden 2 tane

(% 14) *L.monocytogenes* kökeni tesbit edilmiştir(24).

1991 yılında İstanbul'da Dr.Ferda Soysal tarafından yapılan bir çalışmada 37 pastörlenmiş süt örneğinin 2'sinden (% 5.4) *L.monocytogenes* ayırdedilmiştir(48).

Bizim çalışmamızda İstanbul'un değişik semtlerinden elde ettiğimiz 50 pastörlenmiş süt örneğinden 3 tanesinde (% 6) *L.monocytogenes* elde edilmiştir.

Pastörlenmiş sütlerden *Listeria* bakterilerinin elde edilmesi, pastörleme işlemi hakkında veya temizliği konusunda şüphelerin doğmasına yol açmıştır. Böyle bir tesiste pastörlenmiş sütlerin % 20'den fazlasında *Listeria* cinsinden bakteriler elde edildiği yazılmıştır(39).

Bu sonuçlara dayanarak pastörlenmiş sütlerin, listeriyoz açısından güvenilir bir yöntem olmadığı kabul edilebilir. *Listeria*'ların pastörlenmeye dayanabilmesinin sebebi bu bakterilerin makrofaj ve nötrofillerin içerisinde bulunmalarına bağlı olduğu da sanılmaktadır(41).

Pastörlenmiş sütlerde *Listeria* bakterilerinin bulunması, bu bakterilerin ısıya dayanıklılık sorusunun incelenmesini gerektirmiştir. Birçok araştırmacı *Listeria* bakterilerinin ısıya dayanıklılığını incelemek üzere deneyler yapmıştır(9,17).

Listeria bakterilerinin ısıya dayanıklılık derecesini belirlediğimiz deneylerle ilgili çalışmamızda; içerisinde çiğ süt, pastörlenmiş süt, sterillemiş süt ve *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerini bulunduran tüplere belli yoğunlukta *Listeria* bakterisi içeren kültürden belli miktar ilave edildi. Daha sonra bu tüpler tamamen bir su banyosuna daldırılarak deneyler yapıldı. Yaptığımız bu deneylerin sonucunda 60°C'lik bir sıcaklıkta 25 dakikalık bir etki süresine kadar bütün *Listeria* kökenlerinin canlı kaldığını gördük. Ayrıca 60°C'de 30 dakikalık bir ısıtma işlemi sonunda da bu bakterilerin öldüğünü, yalnız *Listeria*'lar için hazırlanmış sıvı çoğaltıcı-seçici

besiyerinde +4°C'de 4 hafta bekletildikten sonra canlı kalan *L.monocytogenes* bakterilerinin bulunduğunu tespit ettik. Ayrıca bütün *Listeria* kökenlerimizin 65°C'de 5 dakikalık bir ısıtma süresine bile dayanamadıklarını gördük.

Listeria bakterilerinin ısıya dayanıklılığı birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve bu araştırmacılarla ilgili çalışma sonuçları Cetvel-9, 10, 11, 12'de toplanarak özetlemektedir(17).

Cetvel-9, 10, 11, 12 incelenecek olursa farklı araştırmacıların değişik yıllarda yapmış oldukları bu çalışmalar arasında kullanılan besiyerleri, aletler, ısıtma ortamı, bakteri sayısı gibi ayrılıkların olduğuna dikkat edilmelidir. Bu sebeplerden dolayı sonuçlar arasında da farklılık görülmektedir

Cetvel-12'de görüldüğü gibi 1987 yılında Berkers ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışma sonucunda *Listeria* bakterilerinin 65°C'de 30 dakikalık bir ısıtma süresi sonunda canlı kalan bakterilerin olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç bizim bulduğumu sonuçla da bir uygunluk göstermektedir.

CETVEL-9: Çeşitli Araştırmacıların *Listeria*'ların Isıya Direnç Deneylerinde Elde Ettiği Sonuçlar (47°C ve 68°C ler arasında, 1926 yılından 1967 yılına kadar).

Araştırmacılar	Isı(°C)	Tesir Zamanı	Sonuç	Isıtma ortamı/Kullanılan aletler
MURAY ve ark. (1926)	47-48	1 1/2 - 6 saat	Ölmüş ^{ab}	Bakteri suspansiyonu
	55	10-30 dakika	Ölmüş ^b	a) Etsulu buyyon
	55	30-60 dakika	Ölmüş ^a	b) % 0,85'lik NaCl/ su banyosu
	58-59	<10 dakika	Ölmüş ^b	
	58-59	10-30 dakika	Ölmüş ^a	
BARBER (1939)	55	30 dakika	Canlı kalmış	Sıcak buhar
	55	60 dakika	Ölmüş	
ZELLER (1949)	50	2 saat	Canlı kalmış	Ampullerde serumlu buyyon kül- türü/su banyosu
GORET u, OVDAR (1965)	55	30 dakika	Canlı kalmış	Sıcak buhar
	55	1 saat	Ölmüş	
ZELLER (1949)	60	10 dakika	Ölmüş	Ampullerde serumlu buyyon kül- türü/su banyosu
ÖZGEN (1951)	60	12 dakika	Canlı kalmış	Tüpe buyyon kültürü/ su banyosu
	60	15 dakika	Ölmüş	Kültürde üretilen bakteriler
SCHOOP (1951)	60	10 dakika	Ölmüş	Buyyon kültürü 0.5x10 ⁹ L/ml/su banyosu
ZİNK ve ark. (1951)	60	10 dakika	Ölmüş	
STENBERG u, HAMMAINEN (1955)	63-65	5 dakika	Ölmüş	Süt ve buyyon kültürü
	60	12 dakika	Canlı kalmış	Sıcak buhar
GORET u, OVDAR (1965)	60	15 dakika	Ölmüş	
İKONOMOV u, TODOROV (1967)	68	10 dakika	Ölmüş	Ekim yapılmış inek ve koyun sütü/Boru şeklinde cam pastörizi- zatör

CETVEL-10: Çeşitli Araştırmacıların Listeria'ların Isıya Direnç Deneylerinde Elde Ettiği Sonuçlar (70°C ve 85°C ler arasında, 1950 yılından 1979 yılına kadar).

Araştırmacılar	Isı (°C)	Tesir Zamanı	Sonuç	Isıtma ortamı/Kullanılan aletler
STENBERG u, HAMMAINEN (1955)	73-75	10-30 saniye	Canlı kalmış	Süt ve buyyon kültürü
DEDIE (1955)	75	2 dakika	Ölmüş	
	75	10 saniye	Canlı kalmış	Çapı 0,3 mm olan cam
	75	15 saniye	Ölmüş	kapillerlerde ekim yapılmış yağlı
				süt/su banyosu
GORET u, OVDAR (1965)	75	10 dakika	Ölmüş	Süt içinde bakteri
IKONOMOV u, TODOROV (1967)	72	20 saniye	Ölmüş ^a	a) Ekim yapılmış inek sütü
	72	20 saniye	Canlı kalmış ^b	b) Ekim yapılmış koyun sütü
				> 30 x 10 ⁶ < /ml/Boru şeklin-
				de cam pastörizatör
IKONOMOV (1969)	70	20 saniye	Ölmüş	Ekilmiş koyun sütü/
	72	20 saniye	Ölmüş	Boru şeklinde cam pastörizatör
IKONOMOV (1969)	70	> 60 saniye	Ölmüş	10 mm'lik test tüplerinde ekilmiş
	72	60 saniye	Ölmüş	koyun sütü
OBIGER (1976)	71	23,4 saniye	Ölmüş	Ekilmiş yağlı alınmış süt/sıcak
				borular
STAJNER ve ark. (1979)	71	42 saniye	Canlı kalmış	İçinde 5x10 ⁸ /ml
	74	42 saniye	Canlı kalmış	olan ekilmiş inek sütü
POTEL (1950/51)	80	-	Ölmüş	Yayın yok
SEELIGER u, LINZENMEIER (1953)	80	> 10 saniye	Ölmüş	Yayın yok
PÖTEL (1953/54)	80	5 dakika	Canlı kalmış	Yayın yok
DEDIE (1955)	85	1 saniye	Ölmüş	0,3 mm çapında cam kapillerler-
				de ekilmiş yağlı süt
STENBERG u, HAMMAINEN (1955)	80	3-5 saniye	Ölmüş	Süt ve buyyon kültürü
GORET u, OVDAR (1965)	85	1 dakika	Ölmüş	Süt içinde bakteri
STAJNER ve ark. (1979)	85	15 saniye	Ölmüş	5x10 ⁸ L/ml olan ekilmiş inek
				sütü

CETVEL-11: Çeşitli Araştırmacıların 90°C ve Daha Yukarı Isılarda Isıya Direnç Deneylerinden Elde Ettikleri Sonuçlar

Araştırmacılar	Isı(°C)	Tesir Zamanı	Sonuç	Isıtma ortamı/Kullanılan aletler
ÖZGEN (1951)	100	45 saniye	Canlı kalmış	Borularda buyyon kültürü/ su banyosu
	100	60 saniye	Ölmüş	
ZINK ve ark. (1951)	100	5 dakika	Canlı kalmış	Buyyon kültürü >0.5x10 ⁹ L/ml
	100	10 dakika	Ölmüş	/su banyosu
JENTZSCH (1958)	100	25 saniye	Ölmüş	Buyyon kültürü/su banyosu
STAJNER ve ark. (1976)	95	5 saniye	Ölmüş	5x10 ⁸ L/ml olan ekilmiş inek sütü

DEDIE VE SCHULCE (1957), SCHULCE (1957), BEARNS ve GIRARD (1958) tarafından Yapılan Isıya Direnç Deneylerinden Elde Ettikleri Sonuçlar

Araştırmacılar	Isı(°C)	Tesir Zamanı	Ölüm Zamanı	Sonuç	Isıtma ortamı/Kullanılan aletler
DEDIE u, SCHULZE (1957) u, SCHULZE (1957)	60 80-85 60 75 85	14 dakika 1 dakika 1 dakika <10 saniye 1 saniye		Ölmüş Ölmüş Ölmüş Ölmüş Ölmüş	İçinde yaklaşık 10 ⁵ L/ml olan ekilmiş süt/çapı 14 mm olan borular İçinde yaklaşık 10 ⁵ L/ml olan ekilmiş süt/çapı 0,3 mm olan kapillerler
BEARNS u,	61,7		10,9 dakika	Ölmüş	<5x10 ⁴ L/ml olan süt/20 mm çaplı borular (test tüpü)
GIRARD (1958)	61,7		10,9 dakika	Canlı kalmış	>5x10 ⁴ L/ml olan süt/20 mm çapında borulr (test tüpü)

CETVEL-12: 1985 Yılından Sonra Çeşitli Araştırmacılar Tarafından Yapılan Isıya Direnç Deneylerinden Elde Ettikleri Sonuçlar

Araştırmacılar	Isı (°C)	Tesir Zamanı	Ölüm Zamanı	Sonuç	Isıtma ortamı/Kullanılan aletler
BRADSHAW ve ark. (1985)	52,2-74 71,7		28 dakika-0,7 saniye 0,9 saniye		1x10 ⁵ L/ml ekilmiş süt. 13 mm çaplı Borosilikatlı ağız kapaklı cam tüpler
DOMÍNGUEZ ve ark. (1985)				Canlı kalmış	Yaklaşık 10 ⁵ L/ml ekilmiş süt
BUNNING ve ark. (1986)	71,7 71,7		1,9 saniye 1,6 saniye		Ağırlanmış bğünkü pastörizasyon 10 ⁴ -10 ⁶ fagosit L/ml içeren süt/kapalı tüp metodu 10 ³ -10 ⁶ fagosit edilmemiş L/ml içeren süt/kapalı tüp metodu yavaş. Akım halindeki ısı değişti- rildi
DONNELLY, BRIGGS (1986)	62,7		1 dakika		% 11 yağı alınmış süt veya yağsız süt veya yağlı sütte 10 ⁸ L/ml/2 ml'lik kapatılmış cam ampuller
TERPLAN ve ark. (1986)	63	30 saniye		Ölmüş	Pastörleştirilmiş yağlı süt 10 ⁵ L/ml/kısa süreli yüksek sıcaklık 10 ³ -10 ⁵ L/ml de tryptose besiyeri/açık test tüpleri
BERKERS ve ark. (1987)	65 70 80 67 70	30 dakika 15 dakika 1 dakika 20 saniye 10 saniye		Canlı kalmış Canlı kalmış Canlı kalmış Ölmüş Ölmüş	10 ³ -10 ⁵ L/ml olan tryptose besiyeri/5x5 cm büyüklüğünde kapatılmış plastik kaplar
BRADSHAW ve ark. (1987)	79,4		0,5 saniye		Ağır kısma, dondurma 10 ⁵ L/g/- kapalı tüp metodu
DONNELLY ve ark. (1987)	62 72 82 62	30 dakika 30 dakika 30 dakika			Yağlı süt veya % 11 yağı alınmış süt içinde 10 ⁶ -10 ⁷ L/ml/Test tüpü metodu Yağlı süt 10 ⁶ -10 ⁸ L/ml içeren/2 ml'- lik kapatılmış cam ampuller
DOYLE ve ark. (1987)	71,7-73,9 76,4-77,8	16,4 saniye 15,4 saniye		Canlı kalmış Ölmüş	10 ³ -10 ⁵ fagositlenmiş L/ml içeren süt/HTST
FARBER ve ark. (1987)	>67,5	16 saniye		Ölmüş	10 ⁴ L/ml içeren yağlı süt örnekle- ri doğal olarak kirlenmiş
BUNNING ve ark. (1988)	62,8 71,7 71,7		53,8 saniye 4,1 saniye 2,7 saniye		10 ⁶ fagositlenmiş L/ml içeren süt /Kapalı tüp metodu 10 ⁶ fagosit edilmemiş L/ml içe- ren süt/Kapalı tüp metodu

Listeria bakterilerinin ısıya dayanıklılık deneyleri en fazla Zeller (1944) tarafından yapılmıştır. Zeller'e göre bu deneylerde 60°C'lik bir sıcaklıkta 10 dakikalık bir etki süresinin uygulanması bütün *Listeria* kökenlerinin ölmesi için yeterlidir. Zink ve Mitarbeitern, Schoop ve Murray'da *L.monocytogenes*'in 60°C'de 10 dakikada öldüğünü, Özgen de 60°C'de 12 dakikada öldüğünü tesbit etmiştir(9).

Dedie ve Shulze (1957) ve Schulze (1957) farklı genişlikteki tüpler kullanıldığında 60°C'de 14 dakikanın, 80-85°C'de 1 dakikanın bu bakterileri öldürmek için yeterli olduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar 0.3 mm çapında kapiller cam tüpler kullanıldığında 60°C'de 1 dakika, 75°C'de 10 saniye, 85°C'de 1 saniye gibi çok daha kısa sürelerin bu bakterileri öldürmek için yeterli olduğunu bildirmiştir(17).

Bearns ve Girard (1985) *L.monocytogenes*'in pastörlenmeyle öldürülebilmesinin bakteri sayısına bağlı olduğunu yazmışlardır. Bu araştırmacılar mililitrede 5.10^4 'den daha fazla *L.monocytogenes* içeren tüplerle yapılan deneylerde 61.7°C'de 35 dakikada bile *L.monocytogenes*'in ölmediğini görmüşlerdir(17).

Bearns ve Girard (1958), İkonomov (1969), Stajner (1976), J.F.Fernandez ve arkadaşları (1985) gibi araştırmacılar da *Listeria*'ların pastörlenme sırasında uygulanan ısı işlemine dayanıklı olduklarını vurgulamışlardır(19).

Seeliger ve Linzenmeier (1953), Dedie (1955), Bisping (1957), Kampelmacher (1958) ve Amtsberg ve arkadaşları (1969) çiğ süt içindeki *listeria* bakterilerinin öldürülmesi için alışılmış pastörleme yönteminin yeterli olduğu düşüncesindeyken, Seeliger (1961), Sielaff (1966), Potel (1968) ve Obiger (1976) önceleri yüksek ısı daha sonra yüksek ısıda kısa sürede ısıtmanın yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Goret ve Ovdar (1965) ve Seeliger (1981) uzun süreli pastörizasyonun *listeria* bakterilerini öldürmek için yeterli olduğunu göstermişlerdir. Potel (1953/54 ve 1955) kısa süreli ısıtmanın, Hof ve arkadaşları yüksek ısının *listeria* bakterilerini öldürmek için yeterli olduğunu kabul etmişlerdir(17).

1986 yılında Doyle ve arkadaşlarının kısa süreli yüksek sıcaklık-taki pastörlenmenin uygulandığı *L.monocytogenes* ilave edilmiş sütlerde bu bakterinin varlığı ile ilgili çalışmalarında, (16.4 saniye 71-73.9°C)'nin uygulandığı pastörlenmeden sonra *L.monocytogenes*'in canlı kalıp kalmadığını araştırmışlar ve 9 çalışmadan 6'sında canlı kaldığını görmüşlerdir. 3 çalışmada ise bu bakteriyi bulmamışlardır. Bu durumun uygulanan ısının (16.4 saniye 71-73.9°C) *L.monocytogenes*'i öldürmek için kâfi gelmediğini göstermektedir. Diğer yönden 76.4'den 77.8°C'ye çıkan bir sıcaklık ve 15.4 saniyelik bir sürenin uygulandığı pastörleme işlemi sonunda *L.monocytogenes*'e rastlanmadığı bildirilmiştir(15).

Bradshaw ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada da süte ilave edilen *L.monocytogenes*'in ısıya direnci araştırılmıştır. Kapalı tüp metodu uygulanarak yapılan bu çalışmada; 71.7°C'lik bir sıcaklıkta 0.9 saniyenin uygulandığı ısıtma süresi sonunda *L.monocytogenes*'e rastlanmadığı gösterilmiştir(10,11,56).

1988 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan bir yazıda özellikle pastörlenmiş sütlerde *L.monocytogenes*'in ısıya direnci ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda anlatılmıştır. Bunlara ait özet bilgi şöyledir:

Bu çalışmanın birinde, *L.monocytogenes* bakterisi ile bulaşık sütleri içeren test tüpleri kısmen su banyosu içine daldırılmış ve *L.monocytogenes*'in 61.7°C'de 35 dakikalık bir pastörlenme işlemine dayanabildiği gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise bu test tüpleri tamamen su banyosuna daldırılmış ve *L.monocytogenes*'in 62°C'de 0.1-0.4 dakikalık bir pastörizasyon uygulamasına dayanamadığı gösterilmiştir. Bu sonuçların değişikliği kullanılan deney tekniklerinin farklı olması ile açıklanmıştır. Başka bir çalışmada da *L.monocytogenes* aşılana inekten elde edilen süt, 72°C'de 15 saniyede pastörlenmiş ve çok nadir olarak canlı organizmaya rastlandığı bildirilmiştir. Ayrıca her tarafı kapalı tüpler veya spiral akımlı ısı değişim metodları ve daha duyarlı metodlar kullanılarak süte eklenen *Listeria* bakterilerinin öldürülme süresinin 71.7°C'de 1.2 saniye olduğu ifade edilmiştir. Bu değerin sığır lökositlerindeki *Listeria* bakterileri için 75°C'de 4.1 saniye olduğu gösterilmiştir(56).

Bu çalışma sonucunda "sütü ısıtarak kabartma metodu"nun süt ile bulaşabilecek hastalık yapıcı *Listeria* bakterilerini öldürmek için yeterli olduğunu saptadık. Deneylerimizde değişik *Listeria* bakterilerinin, *Listeria*'lar için hazırlanmış sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerindeki 24 saatlik yoğun bakteri kültürlerinden 5'er ml olarak 250'şer ml'lik çiğ sütlerin içine ilave ettik. Bu sütlerin bir kısmına "sütü ısıtarak kabartma metodu" uyguladık ve sütün kabardığı anda ısının 97-98°C olduğunu saptadık. Sütün kabarmaya başladığı zamanla kabaran sütün ısıtılmasına son verilmesi arasında geçen zamanın yaklaşık olarak 3-4 saniye olduğunu belirledik. Deneylerimizin sonucunda 97-98°C'ler arasında yaklaşık 3-4 saniyelik sıcaklık uygulaması sonucunda çiğ süt içine ilave edilen *Listeria* bakterilerinin hepsinin canlılıklarını yitirdiklerini tesbit ettik. Buna karşılık kabartma yöntemi uygulanmayan sütlerde bu bakterilerin canlı olarak kaldıklarını gördük.

Kabarmış ve kabartılmamış süt örneklerini +4°C'de 7 ay süreyle beklettikten sonra incelemeye aldığımızda kabarmış süt örneklerinde *Listeria* bakterilerinin üremediklerini fakat kabartılmamış süt örneklerinde bu bakterilerin ürediğini gözledik.

Sütü ısıtarak kabartma metodunun diğer bir iyi tarafı da kontrolü olmasıdır. Bilindiği gibi sütün içinde bakterilerin tesiri ile laktoz parçalanır ve meydana gelen laktik asidin miktarı arttıkça gözle bir bozukluk önceden farkedilmez. Fakat süt ısıtılırsa, kesilmek suretiyle bu bozukluk ortaya çıkar. Bu şekilde halk sütün kesilmiş olduğunu da anlar ve böyle sütleri içmez. Bu metodun bir üçüncü iyi tarafı da basitliğidir. Sütün ısıtılmasına yarayan bir kapla, bir hararet kaynağından başka hiçbir şeye ihtiyaç yoktur(54).

Bu metod ile sadece süt içindeki *Listeria* bakterilerini değil *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* ve *Shigella* türleri, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* türleri, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Corynebacterium diphtheriae* kökenlerinin süte ilavesinden sonra, kabartma yöntemi uygulanarak yapılan deneylerde bu bakterilerin öldüğü görülmüştür(54).

"Sütü ısıtarak kabartma metodu" Türkiye'nin en basit köylerinden en modern şehirlerine kadar her tarafta şimdiye kadar kullanılagelmıştır. Bu metod bizim beslenme sistemimizde hiçbir aksaklık yaratmamış ve memleketimizde süttten ileri gelen salgınlar görülmemiştir(54).



S O N U Ç

Araştırmamızda İstanbul'un bazı semtlerinde satılan 50 çiğ süt örneğinin 28'inden ve bakkallardan alınan 50 pastörlenmiş süt örneğinin 10'undan olmak üzere toplam 38 listeria bakterisi üretildi. Ayrılan bu Listeria bakterilerinin tür olarak tanımları biyokimya özelliklerine bakılarak yapıldı.

Çiğ sütlerden; 4 tane *L.monocytogenes*, 9 tane *L.innocua*, 4 tane *L.welshimeri*, 5 tane *L.seeligeri*, 1 tane *L.ivanovii*, 5 tane *L.grayi* türleri ayrıldı.

Pastörlenmiş sütlerden ise; 3 tane *L.monocytogenes*, 1 tane *L.innocua*, 3 tane *L.welshimeri*, 1 tane *L.seeligeri*, 1 tane *L.ivanovii*, 1 tane *L.grayi* türleri elde edildi.

Yaptığımız diğer bir çalışmada da; Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerine ve çiğ süt, pastörlenmiş süt, sterillenmiş süt örneklerine 7 türden listeria bakterisi ilave edildikten sonra su banyosunda 50, 55, 60 derecede sıcaklığın uygulandığı bütün deney gruplarında ve 5, 10, 15, 20, 25 dakika süreler sonunda listeria kökenlerinin canlı kaldığı görüldü. 60 derecelik sıcaklıkta 30 dakika süreyle uygulandığı deney gruplarında ise yalnız bir deney hariç bütün listeria bakterilerinin öldüğü tesbit edildi.

Ayrıca bir başka deney grubunda bu bakterilerin 65°C'de 5 dakikalık bir ısıtma süresine dayanamadıklarını saptadık.

Yurdumuzda sütü ağzı açık kapta kabarıncaya kadar ısıtmak ve sütün kabardığı anda ısıtmaya son vermek ananevi bir halk metodudur. Sütü kabartmak, sütü kaynatmak demek değildir.

Çiğ süte çeşitli kaynaklardan elde edilen değişik *Listeria* bakterilerini (*L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.welshimeri*, *L.seeligeri*, *L.ivanovii*, *L.grayi*, *L.murrayi*) ilave ettikten sonra sütün kabarıncaya kadar ısıtılması yöntemi ile sütle bulaşabilecek *listeria* kökenlerinin öldüğü görüldü. +4°C'de 7 ay bekletildikten sonra alınan pasajlarla bu sonucun değişmediği anlaşıldı.

Yaptığımız bu çalışmada pastörlenmiş süt örneklerinin bir kısmında *Listeria* bakterilerini üretmemiz bize pastörlenmeyle sütleri *listeriyo*z yönünden tehlikesiz hale getirilemeyeceğini düşündürdü.

Bu sebeple gerek çiğ sütlerin gerekse pastörlenmiş sütlerin ısıtılarak kabartıldıktan sonra kullanılmasının gerektiğini tavsiye ediyoruz.

Ö Z E T

Araştırmamızda İstanbul'un çeşitli semtlerinde çiğ olarak satılan sütlerden alınan 50 adet örneğin 28'inde ve bakkallardan alınan, pastörlenmiş olarak satılan 50 adet örneğin 10'unda olmak üzere toplam 38 örnekte, 38 tane listeria bakterisi elde edildi. Ayrılan bu bakterilerin tür olarak tanımları biyokimya özelliklerine bakılarak yapıldı.

Çiğ sütlerden; 4 tane *L.monocytogenes*, 9 tane *L.innocua*, 4 tane *L.welshimeri*, 5 tane *L.seeligeri*, 1 tane *L.ivanovii*, 5 tane *L.grayi* türleri ayrıldı.

Pastörlenmiş sütlerden ise, 3 tane *L.monocytogenes*, 1 tane *L.innocua*, 3 tane *L.welshimeri*, 1 tane *L.seeligeri*, 1 tane *L.ivanovii*, 1 tane *L.grayi* türleri elde edildi.

Çiğ süt, pastörlenmiş süt ve peynirden ayrılan 7 farklı *Listeria* türünün yoğun kültürlerinden 5'er ml olarak 250'şer ml'lik çiğ sütlere ilave edildi ve ısıtarak kabartma metodu uygulandı. Sütün kabardığı andaki sıcaklığın 97-98°C olduğu belirlendi. Sütün kabarmaya başladığı zamanla kabaran sütün ısıtılmasına son verilmesi arasında geçen zamanın yaklaşık olarak 3-4 saniye olduğu saptandı. Bu ısı uygulaması sonunda listeria bakterilerinin hepsinin canlılıklarını yitirdikleri görüldü. Kabartma metodu-

nun uygulanmadığı diğer sütlerdeki *Listeria* bakterilerinin canlılıklarını devam ettirdikleri görüldü. Kabartılmış ve kabartılmamış süt örneklerinin $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 7 ay bekletildikten sonra uygun besiyerlerine ekimleri yapıldı. Kabarmış süt örneklerinde *Listeria* bakterilerinin üremedikleri fakat kabartılmamış süt örneklerinde ürediği belirlendi.

Süt içerisindeki *Listeria* bakterilerini öldürmek için "sütü ısıtarak kabartma" metodunun yeterli olduğu ve bu metodun sütlerin listeriyoz yönünden tehlikesiz hale getirilebilmesi bakımından güvenilir olduğu tesbit edildi.

Listeria sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerine ve ayrıca çiğ süt pastörlenmiş süt ve sterillenmiş süt örneklerine 7 türden *Listeria* kültürü ilave edildikten sonra 50, 55, 60 derecede ısıtının uygulandığı bütün deney gruplarında ve 5, 10, 15, 20, 25 dakika süreler sonunda *Listeria* kökenlerinin canlı kaldığı görüldü. Bunun sonucunda *Listeria* kökenlerini öldürmek için bu ısıtının yeterli olmadığı anlaşıldı. 60°C 'lık sıcaklıkta 30 dakika süreyle uygulandığı deney gruplarında ise yalnız bir deney grubu hariç bütün *Listeria*'ların öldüğü belirlendi.

Farklılık gösteren bu deney ile *L.monocytogenes*'in ilave edildiği *Listeria* sıvı çoğaltıcı-seçici besiyerini 60°C 'de 30 dakika ısıtıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta bekletildikten sonra gözlemlenmiş olup, en az beş defa tekrarlanan bu deneyin yalnız birinde, *L.monocytogenes*'in canlı kaldığı diğerlerinde öldüğü tesbit edildi.

Ayrıca bütün *listeria* kökenlerinin 65°C 'lik 30 dakika süreyle uygulandığı deney gruplarında ise bu bakterilerin 5 dakikalık ısıtma süresine bile dayanamadıkları görüldü.

S U M M A R Y

In this research, *Listeria* bacteria were produced at a total of 38 milk samples out of which 28 were from 50 raw milk samples from various districts and 10 were from 50 pasteurized milk samples from various markets in Istanbul. *Listeria* bacteria were identified according to their biochemical characteristics.

4 *L.monocytogenes*, 9 *L.innocua*, 4 *L.welshimeri*, 5 *L.seeligeri*, 1 *L.ivanovii*, 5 *L.grayi* were identified from the raw milk samples and 3 *L.monocytogenese*, 1 *L.innocua*, 3 *L.welshimeri*, 1 *L.seeligeri*, 1 *L.ivanovii* and 1 *L.grayi* were identified from the pastorized milk samples.

5 ml each of concentrated culture of 7 different *Listerie* species extracted from raw milk, pasteurized milk and cheese were added to 250 ml raw milk samples and rising method was applied. The temperature was 97-98°C while the milk rose. It was determined that there was 3 to 4 seconds difference between the time the milk started to rise and the time at which cooking was stopped. At the end of heat application it was observed that all *Listeria* bacteria lost their life activities while at other milk samples where the rising method was not applied the bacteria survived. Keeping both risen and not risen milk samples at +4°C for 7 months, the samples were cultured on appropriate mediums and it was observed that the *Listeria* bacteria grew at the not risen milk samples

while risen milk samples stayed sterile.

It was determined that rising by heat was a reliable method to kill the *Listeria* bacteria in milk and obtain milk, safe from listeriosis.

Seven different species were added to productive-selective medium, raw milk, pasteurized milk and sterilized milk samples. All the test samples were heated at 50°C, 55°C and 60°C for 5, 10, 15, 20 and 25 minutes. It was observed that the bacteria stayed alive since the applied temperatures were not sufficient to kill the *Listeria* strains. In all test groups except one, however, where 60°C of temperature was applied for 30 minutes all the *Listeria* strains were killed.

Only *L.monocytogenes* showed an exception. The bacteria of mentioned species were culture onto the productive-selective medium and heated up to 60°C for 30 minutes. After this process the cultured medium was kept at +4°C for 4 weeks. This test was repeated at least 5 times and only once *L.monocytogenes* was alive and were dead at all other tests.

In the test groups where 65°C was applied it was observed that all the *Listeria* strains were unable to stand to this temperature even for 5 minutes.

K A Y N A K L A R

- 1- Akşit F: *Listeria monocytogenes*'in yenileyen düşük, erken ve ölü doğum öykülü olgulardaki yeri. *İnfeks Derg* 1:143, 1987.
- 2- Al-Ghazli MR: İsolation Procedure of *Listeria* Species. *İnfeks Derg* 2:541, 1988.
- 3- Anđ Ö, Berkman S, Kocazeybek B, Anđ-Küçüker M: Gebelik ve Listeriyoz. *İnfeks Derg* 3:195, 1989.
- 4- Anđ Ö, Derman U: Bir abse vak'asında elde edilen *Listeria monocytogenes* suşu dolayısıyla. *İÜ Tıp Fak Mec* 31:482, 1987.
- 5- Anđ Ö, Ergenç H, Çetin ET, Töreci K: *Listeria monocytogenes*'in etken olduğu bir meninjit vak'ası. 15. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 385, 1972.
- 6- Bannerman SE, Bille J: A New Selective Medium for Isolating *Listeria* spp from Heavily Contaminated Material. *Appl Environ Microbiol* 54:165, 1988.
- 7- Barza M: Listeriosis and milk. *N Engl J Med* 312:438, 1985.

- 8- Beckers HJ ve ark: The occurrence of *L.monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *Int J Food Microbiol* 4:49, 1987.
- 9- Bisping W: Die Listeriose und ihre milchhygienische Bedcutung. *Kieler Milchwert. Forschungsber* 9:595, 1957.
- 10- Bradshaw JG, Peeler JT, Corwin JM, Hunt JM, Tierney JT, Larkin EP, Twedt RM: Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J Food Prot* 48:743, 1985.
- 11- Bradshaw JG, Peeler JT, Corwin JM, Hunt JM, Twedt RM: Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* in Dairy Products. *J Food Prot* 50:543, 1987.
- 12- Bunning KV, Crowford RG, Bradshaw JG, Peeller JT, Tierney JT, Twedt RM: Thermal Resistance of intracellular *Listeria monocytogenes* Cells Suspended in Raw Bovine Milk. *Appl Environ Microbiol* 52:1398, 1986.
- 13- Coşar G, Tümbay E, İnci R: Suspectibility of *Listeria monocytogenes* to Ampicillin and Ampicillin/Sulbactam Combination an in vitro study with disc diffusion test. *Infeks Derg* 2:599, 1988.
- 14- Doğruer M: Türkiye'de Listeriosis. *Etlik Vet Fak Enst Yay* 1:345, 1961.
- 15- Doyle MP, Glass KA, Beery JT, Garcia GA, Pollard PJ, Schultz RD: Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during High-Temperature, Short-Time pasteurization. *Appl Environ Microbiol* 53:1453, 1987.
- 16- Doyle MP, Schoeni JL: Selective-Enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens *Appl Environ Microbiol* 51:1127, 1986.

- 17- Erdle E: Zum Vorkommen von Listerien in Käse, Fleisch und Fleischwaren. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. 1988, 24.
- 18- Farber JM, Senders GW, Speirs JJ: Methodology for Isolation of Listeria from Foods - A Canadian Perspective. J Assoc Off Anal Chem 71:675, 1988.
- 19- Fernandez-Garayzabel JF, Dominguez-Rodriguez L, Vazquez Boland JA, Blanco Cancelo JL, Suarez Fernandez G: Listeria monocytogenes dans le lait pasteurise. Can J Microbiol 32:149, 1986.
- 20- Fleming DW, Cochi SL, Mac Donald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MG, Audurier A, Broome CV, Reingold AL: Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of Listeriosis. N Engl J Med 312:404, 1985.
- 21- Gledel J: Epidemiology and significance of Listeriosis in France. Vet Med Heft, 5:9, 1986.
- 22- Golden DA, Beuchat LR, Brackett RE: Direct Plating Technique for Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods. J Assoc Off Anal Chem 71:647, 1988.
- 23- Gray MK: Epidemiological aspects of Listeriosis. Amer J of Public Health 53:554, 1963.
- 24- Hayes PS, Feeley JC, Graves LM, Ajello GW, Fleming DW: Isolation of Listeria monocytogenes from raw milk. Appl Environ Microbiol 51:438, 1986.
- 25- Johnston AM: Foodborne Illness-Lancet 336:856, 1990.

- 26- Jones D: Taxonomy of *Listeria*. *Infeks Derg* 2:461, 1988.
- 27- Jones D: Foodborne Illness-Lancet 336:1171, 1990.
- 28- Kampelmacher EH: Foodborne Listeriosis Facts and Fictions. *Infeks Derg* 2:527, 1988.
- 29- Linnan MJ, Mascola L, Xiao Dong Low, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura Lynn M, Hayes P, Weaver R, Audurier A, Plekayts BD, Fannin SL, Kieks A, Broome CV: Epidemic Listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med* 319:825, 1988.
- 30- Listeriosis-Lancet 1:83, 1989.
- 31- Lovett J: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy product. *J Assoc Off Anal Chem* 71:658, 1988.
- 32- Lovett L, Francis DW, Hunt JM: *Listeria monocytogenes* in Raw milk: Detection incidence and Pathogenecity. *J Food Prot* 50:198, 1987.
- 33- Mamal M, Ergin S: İstanbul'un süt ve yoğurtlarında mikrobiyolojik bir araştırma. İstanbul'da süt ve yoğurt sorunu, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği. Yayın No: 7, s.31, 1990, İstanbul.
- 34- Müller HE: Listeriosis in animals. *Infeks Derg* 2:505, 1988.
- 35- Nursoy N: *Listeria* Bakterilerinin Koyun ve Sığır Dışkılarından Ayrılması İçin Besiyeri Geliştirme Çabaları: Uzm. Tezi, İÜ Cerr Tıp Fak Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 1989.
- 36- Olson C, Dunn LA, Rollins L: Methods for isolation of *Listeria monocytogenes* from sheep. *Amer J Vet Res* 14:82, 1953.

- 37- Rocourt J: The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods. *İnfeks Derg* 2:471, 1988.
- 38- Ruelens R, Vandepitte J: Clinical aspects of human Listeriosis *İnfeks Derg* 2:487, 1988.
- 39- Samastı M: Listeriyoz ve Toplum Sağlığı. Klinik Gelişim (İnfeksiyon Özel Sayısı). 2:533, 1989.
- 40- Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls SE, Broome CV: Epidemic Listeriosis-Evidence for Transmission by Food. *N Engl J Med* 308:203, 1983.
- 41- Schonberg A: Prevention and control of Listeriosis. *İnfeks Derg* 2:533, 1988.
- 42- Schulz GG: Untersuchungen über das vorkommen von Listerien in Rohmilch. *Mh Ved Med* 22:766, 1967.
- 43- Seeliger HPR: Why Listeriosis. *İnfeks Derg* 2:455, 1988.
- 44- Seeliger HPR: Epidemiology of Listeriosis. *İnfeks Derg* 2:512, 1988.
- 45- Seeliger HPR, Jones D: *Listeria*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Cilt II (Edit: Holt JG, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME)'de, Baltimore, William and Wilkins, 1986, 1235.
- 46- Seeliger HPR, Langer B: Methods of Detection, Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* and Related Species from Clinical Samples, Food and Environmental Sources. *İnfeks Derg* 2:607, 1988.

- 47- Soysal F: Sütlerden Brucella ve Listeria bakterilerinin ayrılması için balıklı besiyeri geliştirilmesi ve süt serumundan Brucella antikorlarının varlığının aglütinasyon yöntemi ile tespiti: Uzm Tezi, İÜ Cerr Tıp Fak Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 1991.
- 48- Swaminathan B, Hayes PS, Przybyszewski AV: Evaluation of Enrichment and Plating Media for Isolating Listeria monocytogenes. J Assoc Off Anal Chem 71:664, 1988.
- 49- Todd E: Foodborne illness-Lancet 336:788, 1990.
- 50- Tümbay E, Anđ Ö, İnce R: Treatment of Human Listeriosis. İnfeks Derg 2:497, 1988.
- 51- Tümbay E, Seeliger HPR, İnci R, Coşar G, Langer B: Isolation of Listeria from Cheese in Turkey. İnfeks Derg 2:593, 1988.
- 52- Unat EK: Temel Mikrobiyoloji, Beta Basın Yayın Dağıtım A.Ş., 1985.
- 53- Unat EK: Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi. I-II, 2. baskı, Dergah Tıp Yayınları, İstanbul, 1986.
- 54- Unat EK, Kasparyan V: Sütün Isıtılarak Kabartılmasının Dezenfeksiyon Değeri. Microbiol Derg Tom: XI, No: 3-4, s 72, 1958.
- 55- Welshimer HJ, Winglewish NG: Listeriosis-Summary of Seven Cases of Listeria meningitis, J A M A 171:1319, 1959.
- 56- WHO Working Group: Foodborne Listeriosis. Bull of WHO, 66:421, 1988.