

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

***LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN
GIDALARDAN İZOLASYONUNDA KLASİK,
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI İLE STRES
ADAPTASYONUNUN GIDA GÜVENLİĞİ AÇISINDAN
İNCELENMESİ**

Aslı ŞAHİNER

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa ATEŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş Tarihi: 26.01.2011

Bornova-İZMİR

2011

Aslı ŞAHİNER tarafından doktora tezi olarak sunulan “*Listeria monocytogenes*’in Gıdalardan İzolasyonunda Klasik, Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Karşılaştırılması ile Stres Adaptasyonunun Gıda Güvenliği Açısından İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.01.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Doç Dr Mustafa ATEŞ
Raportör Üye	: Doç Dr Güven ÖZDEMİR
Üye	: Prof Dr İsmail KARABOZ
Üye	: Prof Dr Sanver EKMEKÇİ
Üye	: Doç Dr H. Halil BIYIK

ÖZET***LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN
GIDALARDAN İZOLASYONUNDA KLASİK, SEROLOJİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI İLE STRES
ADAPTASYONUNUN GIDA GÜVENLİĞİ AÇISINDAN İNCELENMESİ**

ŞAHİNER, Aslı

Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mustafa ATEŞ
Ocak 2011, 114 sayfa

Bir gıda patojeni olan *L. monocytogenes*, listeriozis adı verilen, ölüm oranı oldukça yüksek ciddi bir hastalığa sebep olmaktadır. Bu mikroorganizma, buzdolabı sıcaklığı, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi çok farklı çevre koşullarında yaşamını devam ettirebilmekte ve üreyebilmektedir. Bu durum, patojenin gıdada uygulanan koruyucu ve güvenlik önlemleri ile başa çıkabilmesine olanak sağlamakta ve insan sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturmasına neden olmaktadır.

Bu çalışma, izolasyon metotlarının karşılaştırılması ve validasyonu ile stres adaptasyonu olmak üzere *L. monocytogenes* ile ilgili iki araştırmayı içermektedir. *L. monocytogenes*'in gıdalardan izolasyonunda kullanılan ELFA ve PCR metotları ISO 16140:2003 alternatif mikrobiyolojik metotların validasyonu standardındaki kriterlere bağlı olarak, referans metot ile karşılaştırılmıştır. Rölatif özgüllük, rölatif doğruluk, rölatif duyarlılık ve rölatif tespit limiti belirlenmiştir. 100 gıda örneği kullanılarak yapılan paralel çalışmalar sonucunda, ELFA için rölatif doğruluk %97,00, rölatif özgüllük %96,30, rölatif duyarlılık %97,83; PCR için rölatif doğruluk %99,00, rölatif özgüllük %98,15, rölatif duyarlılık %100 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, ELFA ve PCR olmak üzere her iki alternatif metodun referans metotla uyumlu ve bu metot kadar geçerli olduğuna karar verilmiştir. Hem PCR hem de ELFA metodu gıdalardan *L. monocytogenes* tespitinde kullanıcı için avantajlı ve hızlı metotlar olarak kullanılabilir.

Bu çalışmanın diğer amacı ise tek tek veya ardışık olarak uygulanan stres koşulları sonucu *L. monocytogenes*'in sıcaklık ve asit toleransında olan değişikliğin araştırılmasıdır. Bu nedenle mikroorganizma, termal, asidik ve ozmotik streslere ve

bunların kombinasyonlarına maruz bırakılmıştır. 55°C'de 1 sa letal sıcaklık öncesi oluşturulan, sıcaklık stres koşullarından en yüksek adaptasyon, 48°C'de 30 dk uygulaması ile elde edilmiştir (%70,31). *L. monocytogenes*'in asit direnci ile ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlar, maksimum adaptif yanıtın pH 5,0 ve 5,5 uygulamalarında alındığını göstermiştir. Hemen hemen tüm subletal uygulamaların *L. monocytogenes*'in letal sıcaklık ve asit koşullarına adaptif yanıtını artırdığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Listeria monocytogenes*, validasyon, stres adaptasyonu, gıda güvenliği.

ABSTRACT**COMPARISON OF CONVENTIONAL, SEROLOGIC AND MOLECULAR METHODS FOR THE ISOLATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND AN INVESTIGATION OF STRESS ADAPTATION IN TERMS OF FOOD SAFETY**

ŞAHİNER, Aslı

PhD. in Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

January 2011, 114 pages

The foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* is the causative agent of listeriosis, a severe disease with high fatality rates. This microorganism can survive and grow over a wide range of environmental conditions such as refrigeration temperatures, low pH and high salt concentration. This allows the pathogen to overcome food preservation and safety barriers, and pose a potential risk to human health.

This study includes two different investigations about *Listeria monocytogenes*: method comparison and stress adaptation. The ELFA-based method and PCR method have been compared to the reference method (ISO 11290-1) for the detection of *Listeria monocytogenes* in food samples according to criteria established in the methods comparison study included in EN ISO 16140:2003 for validation of alternative microbiological methods. Relative specificity, relative accuracy, relative sensitivity, and relative detection level were determined. As a result of parallel studies of 100 food samples, ELFA method showed a relative accuracy of 97%, relative specificity of 96.30%, relative sensitivity of 97.83%; PCR method showed a relative accuracy of 99%, relative specificity of 98.15%, relative sensitivity of 100%. In conclusion, both ELFA and PCR protocols are valid and comparable to the reference ISO 11290-1 method for *L. monocytogenes* detection. Both the PCR and the ELFA-based assays can be used as rapid and user-friendly screening methods for detection of *L. monocytogenes* in food samples.

The second aim of this study was to evaluate the heat and acid tolerance response of *L. monocytogenes* to a single or sequential stress treatment. Therefore,

L. monocytogenes has been exposed to thermal, acidic, osmotic stresses and their combinations. The highest thermotolerance at 55°C 1 h was obtained after exposure to heat shock at 48°C 30 min (70.31%). Results of studies on the acid resistance of *L. monocytogenes* induced by acid shock indicated that maximum adaptive response was obtained pH 5.0 and 5.5. Almost all sublethal treatments induced adaptive responses on *L. monocytogenes* at lethal heat and acid conditions.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, validation, stress adaptation, food safety.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mustafa ATEŞ'e, tez jürimde yer alan ve çalışmalarımı yönlendiren hocalarım Prof. Dr. İsmail KARABOZ ve Doç. Dr. Halil BIYIK'a, doktora çalışmamı destekleyen AYBAK NATURA Gıda Analiz Laboratuvarı'na, çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan arkadaşım Nilay ÇELİK'e ve eğitimim boyunca göstermiş oldukları maddi manevi fedakârlıklarından dolayı sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACTvii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 <i>L. monocytogenes</i> Genel Bilgiler.....	3
2.1.1 Tarihçe	3
2.1.2 Taksonomi	9
2.1.3 Biyokimyasal ve morfolojik özellikler	10
2.1.4 Patojenik yaşam şekli	11
2.1.5 Kontaminasyon kaynakları ve yayılması.....	12
2.1.6 Gelişimi etkileyen faktörler	16
2.2 Metot Validasyonu.....	18
2.2.1 Validasyonun tanımı ve gerekliliği.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.2 Kalitatif metotlarda validasyon parametreleri.....	20
2.2.3 Kantitatif metotlarda validasyon parametreleri.....	22
2.2.4 Örnek seçimi	23
2.2.5 Spike örneğin hazırlanması	23
2.3 Mikrobiyal Stres.....	24
2.3.1 Stresin tanımı	24
2.3.2 Stres yanıtı.....	25
2.3.3 Adaptasyon.....	26
2.3.4 Tolerans.....	26
2.3.5 Yaralanma	26
2.3.6 Stres, adaptasyon ve gıda güvenliği	27
2.3.7 Strese karşı meydana gelen yanıtın mekanizması.....	28
2.3.8 Genel stres yanıtı.....	29
2.3.9 Özel stres yanıtları	29
2.3.10 Çapraz koruma	32
2.3.11 Gıdalarda patojenlerin stres adaptasyonu	33
2.3.12 <i>Listeria monocytogenes</i> 'in stres proteinleri	34

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.13 Stres ve virulans arasındaki ilişki	36
3.MATERYAL VE METOT	38
3.1 Materyal	38
3.1.1 Kullanılan gıda örnekleri	38
3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	38
3.1.3 Kullanılan kitler	46
3.1.4 Kullanılan boyalar	48
3.1.5 Kullanılan cihazlar	49
3.2 Metot	50
3.2.1 Kullanılan bakteriyel strainler	50
3.2.2 Metot validasyon çalışmalarında kullanılan numunelerin hazırlanması ve saklanması.....	50
3.2.3 Metot validasyon çalışmalarında kültürlerin inokülasyonu.....	50
3.2.4 Listeria monocytogenes ISO 11290-1 analiz prosedürü.....	51
3.2.5 Listeria monocytogenes ELFA (Vidas) analiz prosedürü	53
3.2.6 Listeria monocytogenes PCR (Dupont Bax Q7) analiz prosedürü	55
3.2.7 Validasyon prosedürü	57

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.8 Stres adaptasyon denemeleri	58
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	60
4.1 Metot Validasyonu	60
4.2 Stres Adaptasyonu.....	77
5.TARTIŞMA	87
5.1 Metot Validasyonu	87
5.2 Stres Adaptasyonu.....	92
6. ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>L. monocytogenes</i> 'in selüler enfeksiyon aşamaları	12
3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> Oxford Agar	40
3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> Palcam Agar	42
3.3 <i>Listeria monocytogenes</i> Kanlı Agar ve Api <i>Listeria</i> Kit.....	45
3.4 <i>Listeria monocytogenes</i> Dupont (a) ve Vidas (b) Test Kiti.....	47
3.5 <i>Listeria monocytogenes</i> TSAYE.....	52
3.6 <i>Listeria monocytogenes</i> SIM Medium	53
3.7 Dupont Bax Q7 ve Mini Vidas.....	55
3.8 Dupont Bax Q7 işlem prosedürü	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Gıda ve insan kaynaklı listeriozis salgınları	4
2.2 <i>L. monocytogenes</i> ile ilgili bildirimler	5
2.3 <i>Listeria</i> türlerini teşhis reaksiyonları	10
2.4 Referans ve alternatif metodun eşleştirilmiş sonuçları	21
2.5 <i>Listeria monocytogenes</i> 'in stres proteinleri	36
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> 'in virulans genleri	37
4.1 Paralel analiz sonuçları	60
4.2 Referans (ISO 11290-1) ve alternatif (ELFA) metodun eşleştirilmiş sonuçları	66
4.3 Referans (ISO 11290-1) ve alternatif (PCR) metodun eşleştirilmiş sonuçları	66
4.4 Sonuçların karşılaştırılması.....	66
4.5 PCR ve ISO 11290-1 arasındaki uyumun derecesi.....	67
4.6 ELFA ve ISO 11290-1 arasındaki uyumun derecesi	68
4.7 Süt ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1).....	69
4.8 Süt ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1).....	70
4.9 Et ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1).....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10 Et ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)	72
4.11 Su ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1).....	73
4.12 Su ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)	74
4.13 Bitkisel ürünler için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1)	75
4.14 Bitkisel ürünler için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)	76
4.15 Sıcaklık şoku ardından, 55°C’de 1 saatlik letal uygulama sonrası koloni sayısı	77
4.16 Sıcaklık şokunun 55°C’de 1 saatlik termal toleransa etkisi	78
4.17 Sıcaklık şoku ardından 63°C’de 15 dakikalık letal uygulama sonrası koloni sayısı	79
4.18 Sıcaklık şokunun 63°C’de 15 dakikalık termal toleransa etkisi	79
4.19 Farklı subletal streslerin ardından 63°C’de 15 dakikalık letal uygulama sonrası koloni sayısı	80
4.20 Farklı subletal streslerin ardından 63°C’de 15 dakikalık termal toleransa etkisi	81
4.21 24 saatlik subletal laktik asit stresi sonrası <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları	82

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.22 Letal laktik asit uygulaması sonrası koloni sayısı	82
4.23 Subletal asit stresinin letal laktik asit toleransına etkisi.....	83
4.24 24 saatlik subletal sitrik asit stresi sonrası <i>L. monocytogenes</i> sayım sonuçları	83
4.25 Letal sitrik asit uygulaması sonrası koloni sayısı	84
4.26 Subletal asit stresinin letal sitrik asit toleransına etkisi	84
4.27 Farklı subletal streslerin ardından pH 3.0' da 2 sa letal laktik asit uygulaması sonrası koloni sayısı	85
4.28 Farklı subletal streslerin ardından pH 3.0' da 2 sa letal laktik asit toleransına etkisi	85
5.1 Metotların avantaj ve dezavantajları	91

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
a_w	Activity of water - Su aktivitesi.
C	Santigrat.
CO ₂	Karbondioksit.
dk	Dakika.
g	Gram.
H ₂ S	Hidrojen sülfür.
L	Litre.
log	Logaritma.
mg	Miligram.
ml	Mililitre.
mm	Milimetre.
mmol	Milimol.
µm	Mikrometre.
nm	Nanometre.
NaCl	Sodyum klorür.
sa	Saat.
w/v	Ağırlık hacimce konsantrasyon.
β	Beta
σ	Sigma
<	Küçüktür
>	Büyüktür
°	Derece.
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AB	Avrupa Birliği.
AFNOR	Association Française de Normalisation - Fransa Standart Komitesi.
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu.
ATR	Acid tolerance response - Asit tolerans yanıtı.
BetL	Betaine transporter.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Bsh	Bile salt hidrolase.
Caco-2	Caucasian colon adenocarcinoma – Kafkasya kolon adenokarsinomu.
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Peterson.
Caps	Cold shock acclimation proteins - Soğuk şoku alıştıırma proteinleri.
Csps	Cold shock proteins - Soğuk şoku proteinleri.
DNA	Deoxyribonucleic acid - Deoksiribonükleik asit.
EN	European Norm-Avrupa Normu TGK Türk Gıda Kodeksi.
EFSA	European Food Safety Authority - Avrupa Gıda Güvenliğı Otoritesi.
EFTA	European Free Trade Association - Avrupa Serbest Ticaret Birliğı.
ELFA	Enzyme Linked Fluorescence Assay - Enzim bağılı floresan testi.
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Enzim bağılı immünosorban testi.
FDA	Food and Drug Administration - Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi.
Gbu	Glycine betaine porter.
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point - Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları.
HTST	High temperature short time - Yüksek sıcaklık kısa süre.
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods- Uluslararası Gıdaların Mikrobiyolojik Spesifikasyonları Komisyonu.
ISO	International Organization of Standardization-Uluslararası Standartlar Örgütü.
kob	Koloni oluşturan birim.
LAB	Laktik asit bakterileri.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MAP	Modifiye atmosfer paketlenme.
OpuB	Osmoprotectant uptake B.
OpuC	Osmoprotectant uptake C.
PCR	Polymerase chain reaction-Polimeraz zincir reaksiyonu.
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed - Gıda ve Yem için Hızlı Uyarı Sistemi.
RM	Referans materyal.
RNA	Ribonükleik asit.
TS	Türk Standardı.
VBNC	Viable but not culturable - Yaşayabilen fakat kültürü yapılamayan.
VIDAS	Vitek immuno diagnostic assay system.
virR	Virulence regulon.
WHO	World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü.

1. GİRİŞ

Listeria monocytogenes önemli sağlık ve ekonomik etkileri olan bir gıda patojenidir. Mikroorganizmanın oluşturduğu listeriozis adını alan enfeksiyon, ciddi klinik olgularla sonuçlandığı kadar, hastalıkta ölüm oranı da oldukça yüksektir. Başlıca bulaşma kaynağı, çiğ ya da endüstriyel olarak işlem görmüş gıdalardır. Bulaşma kaynakları, başta çiğ ve pastörize süt olmak üzere, peynir, dondurma, krema gibi süt ürünleri; kıyma, biftek ve diğer fermente et ürünleri, tavuk eti; balık ve diğer su ürünleri gibi, oldukça geniş çeşitlilik göstermektedir. Ayrıca sebzeler ve sebze salataları da kontaminasyondaki risk grubu gıdalar içerisinde yer almaktadır (Gandhi and Chikindas, 2007).

Gıdaların *L. monocytogenes* ile bulaşmasını ve listeriozis görülme sıklığını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. İlaç endüstrisindeki gelişmeler, insan popülasyon dinamiklerini etkilemekte, ortalama yaşam süresini uzatmakta, yaşlı ve hasta bireylerin hayatta kalma oranını artırmaktadır. İnsan popülasyonundaki bu artış, gıda endüstrisinde de bazı değişimlere neden olmaktadır. Gıda üretimindeki modifikasyonlar, gıda endüstrisinin küreselleşmesi, ithal ürünlere ve etnik gıdalara olan talebin artışı kontaminasyon riskini artıran önemli faktörlerdir. Ayrıca, beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler nedeniyle tüketicinin, az işlem görmüş, tüketime hazır ya da dondurulmuş gıdalara yönelmesi son yıllarda listeriozis insidansında artışa neden olmuştur (Rocourt and Bile, 1997).

Son yıllarda, bu hastalığın görülme oranındaki artış ve enfeksiyonların ciddiyeti gerek Avrupa'da gerekse Türkiye'de gıda mevzuatı açısından bazı değişikliklerin yapılmasına neden olmuştur. Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde 2009 yılında yapılan değişiklikle, birçok gıda grubunda *L. monocytogenes* aranması zorunlu hale getirilmiştir. Tebliğde bu analizin yapılmasını gerektiren gıda ve gıda grupları şu şekildedir: Krema ve ürünleri; süttozu, krema tozu, dondurma için toz karışımlar, peynir altı suyu tozu, yayık altı suyu tozu ve süt bazlı toz ürünler, kazein ve kazeinat; peynirler; koyulaştırılmış süt; dondurma ve sütlü buz; karkas, parça etler, kıyma; hazırlanmış et karışımları; fermente ve ısı işlem görmüş et ürünleri; dondurulmuş pizza, hamur ve hamur bazlı ürünler; tartlar ve yağ pastalar; yıkanmış, doğrama ve paketlenme işleminden geçmiş, ayrı ayrı veya karıştırılmış çiğ sebzeler ile dondurulmuş veya kurutulmuş sebzeler; doğrudan sıkılmış, pastörize edilmemiş, soğukta muhafaza edilmesi gereken, tüketime hazır meyve ve sebze suları; tüketime hazır her türlü salata, şarküteri ürünleri ve soğuk mezeler; tüketime hazır her türlü tatlı; bebek ve devam

formülleri. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre yapılan analizlerin sonucunda hiçbir örnekte *L. monocytogenes* bulunmaması gerekmektedir (Anon., 2009).

Etkenin doğada yaygın olarak bulunması, geniş sıcaklık ve pH değerlerini tolere edebilmesi, aerobik, mikroaerofilik, anaerobik koşullarda ve CO₂ varlığında üreyebilmesi gıda kaynaklı enfeksiyonların kontrolünü güçleştirmektedir.

L. monocytogenes enfeksiyonları başta hamile kadınlar, yeni doğanlar, çok küçük çocuklar ve yaşlılar ile immunsupresif isanlarda yumuşak seyirli influenza benzeri bir semptomdan, menenjit ve meningoensefalite, septisemi, konjunktivit ve pnömoniye kadar değişen bir seyir göstermektedir. Enfeksiyonun etkisi fetüs ve yeni doğanlar için çok daha ağırdır. Transplental fetal enfeksiyon sonucu düşük, ölü doğum veya prematüre doğumla sonuçlanan tablo şekillenebilmektedir (Erol, 2007).

Oldukça ciddi enfeksiyonlara neden olan bu patojenin, gıdalardan en güvenilir ve en hızlı olan yöntemle izolasyonu önem taşımaktadır. Bu çalışmada hızlı olan serolojik (ELFA) ve moleküler (PCR) yöntemlerin uluslar arası olarak kabul görmüş olan standart klasik yöntemle (ISO 11290-1) karşılaştırması yapılmış ve EN ISO 16140:2003 standardı baz alınarak bu alternatif metotlar valide edilmiştir. Çalışmanın diğer ayağında ise mikroorganizmanın stres koşullarına adaptasyonu in vitro koşullarda incelenerek, gıda üretimi sırasında uygulanan proses aşamalarının güvenli gıda üretimi açısından yeterliliği belirlenmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 *L. monocytogenes* Genel Bilgiler

2.1.1 Tarihçe

L. monocytogenes ile ilgili ilk yayınlarda, organizmanın 1891 yılında Almanya'da bir hastanın dokularından, 1911'de İsveç'te bir tavşan karaciğerinden, 1917 ve 1920'de menenjitli bir hastanın omurilik sıvısından izole edildiği ileri sürülmektedir. Ancak mikroorganizma, 1926'da Murray, Webb ve Swann tarafından Birleşik Krallık Cambridge'de monocytosis enfeksiyonu görülen laboratuvar rodentlerinden izole edilerek tam olarak tanımlanabilmiş ve *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırılmıştır. Pirie 1927 yılında, bu bakteriyi Güney Afrika'da enfekte vahşi gerbillerden izole etmiş ve cins isminin cerrah Lord Lister'e atfen *Listerella* olmasını önermiştir. Murray ve Pirie aynı türden bakteri ile ilgilendiklerini fark ederek isimleri birleştirmişler ve *Listerella monocytogenes* ismini oluşturmuşlardır. Daha sonra yapılan taksonomik çalışmalarla bakterinin ismi *Listeria monocytogenes* olarak değişmiştir (ICMSF, 2003).

İnsan listeriozisi ile ilgili rapor edilen ilk vaka 1929 yılındadır. Danimarka'da Nyfeldt adlı araştırmacı mononucleosis benzeri enfeksiyon geçiren hastaların kan kültürlerinden *L. monocytogenes* izole etmiş, 1936 yılında Burn Amerika Birleşik Devletleri'nde, yeni doğanlarda sepsis, yetişkinlerde menenjitte neden olan hastalık semptomlarını listeriozis olarak tanımlamıştır. Muhtemel listeriozis benzeri vaka tasvirleri, 1926 yılından önce yayınlanmıştır (Gray and Killinger, 1966). Bununla birlikte 1980'li yıllara kadar morbidite ve mortalitesi yüksek olan ve bulaşma kaynakları bilinmeyen insan listeriozis vakaları, gizli bir hastalık halinde, dikkat çekmeden devam etmiştir. Örneğin, 1966 yılında Almanya'da ve 1975-76 yılları arasında Fransa'da sırasıyla 279 ve 166 insan listeriozis vakası gözlenmiştir. 1980'li yılların ortalarında Avrupa ve Kuzey Amerika'da insan ve hayvan listeriozis vakalarında önemli bir artış göze çarpmaktadır (McLauchlin, 1990).

WHO'nun vermiş olduğu bilgiye göre, 1999 yılının Aralık ayında Fransa'da listeriozis salgını meydana gelmiş ve rapor edilen 26 vakadan 7'si ölümlü sonuçlanmıştır. Fransa Sağlık Bakanlığı yayınladığı raporunda, salgının başlangıcının domuz sakatatı olabileceğini belirtmiştir.

FDA 1998-1999 yılları arasında Amerika'da *L. monocytogenes* serotip 4b kaynaklı 50 vaka görüldüğünü, bu vakaların 6 yetişkinin ölümü ve 2 düşük ile sonuçlandığını bildirmiştir.

Listeriozisin Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve Galler'de sırasıyla ikinci ve dördüncü en çok ölüm görülen gıda kaynaklı bulaşıcı hastalık olduğu bildirilmiştir. Listeriozisin her iki çalışmada da gıda kaynaklı ölümlerin yaklaşık %14-15'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Mead et al., 1999; Adak et al., 2002). Kanada Halk Sağlığı Dairesi 2008 yılında görülen listeriozis salgınının toplam 23 ölümlerle sonuçlandığını bildirmiştir.

Çizelge 2.1 Gıda ve insan kaynaklı listeriozis salgınları (PHAC, 2008)

Listeriozis salgınları					
Ülke	Tarih	Taşıyıcı Gıda	Vaka Sayısı	Ölüm Sayısı	Serotipi
Yeni Zelanda	1980	Kabuklu ya da Çiğ Balık	22	7	1/2a
Kanada	1981	Lahana Salatası	41	18	4b
Amerika	1983	Pastörize Tam Yağlı ve %2 Yağlı Süt	49	14	4b
Amerika	1985	Pastörize Olmayan Sütten Yapılan Meksika Peyniri	142	30	4b
İsviçre	1983-1987	Yumuşak Peynir	122	34	4b
İngiltere	1987-1989	Köfte	355	94	4b vd.
Amerika	1989	Karides	2	NK	4b
Avustralya	1990	Köfte	9	NK	1/2a
Avustralya	1991	Füme Midye	4	0	1/2a
Yeni Zelanda	1992	Füme Midye	4	1	1/2a
Fransa	1993	Jölede Domuz Dili	279	NK	4b
Fransa	1993	Domuz Eti Kıyması	39	10	4b
Amerika	1994	Pastörize Çikolatalı Süt	45	0	1/2a
İsveç	1994-1995	Soğutulmuş Füme Alabalık	9	2	4b
Fransa	1995	Yumuşak Peynir	17	4	4b
İtalya	1997	Mısır Salatası	1566	0	4b
Kanada	1996	Yengeç Eti	2	0	1/2a
Amerika	1998-1999	Sosis ve Şarküteri	50	>8	4b
Finlandiya	1998-1999	Tereyağı	25	6	3a
Finlandiya	1999	Soğutulmuş Füme Alabalık	5	NK	1/2a
İngiltere	1999	Peynir-Peynir ve Salata Sandviçi	2	1	4b
Fransa	1999-2000	Domuz Eti Kıyması	10	2	4b
Amerika	2000	Hindi Eti	29	7	NK
Fransa	1999-2000	Jölede Domuz Dili	32	10	4b
Amerika	2000-2001	Pastörize Olmayan Sütten Yapılan Meksika Peyniri	12	5	NK

Avrupa’da gıda güvenliği çerçevesinde, Avrupa Komisyonu, Avrupa Komisyonu – Sağlık ve Tüketicinin Korunması Genel Müdürlüğü, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), Avrupa Serbest Ticaret Birliği (EFTA-European Free Trade Association), üye devletlerdeki yetkili otoriteler, İzlanda, Liechtenstein ve Norveç’teki yetkili otoritelerin üye olduğu “Gıda ve Yem için Hızlı Uyarı Sistemi” kurulmuştur. Gıda güvenliğini tehdit eden durumlarda derhal faaliyete geçilerek, ithalat durumlarında reddetme, piyasaya sürülen ürünlerde ise geri çekme veya geri çağırma gibi gerekli tedbirler alınmaktadır. Komisyon, uyarı ve bilgi bildirimlerine ilişkin haftalık açıklama yayınlamaktadır. *L. monocytogenes* ile ilgili bildirimler şu şekildedir (Çizelge 2.2):

Çizelge 2.2 *L. monocytogenes* ile ilgili bildirimler (RASFF, 2009)

Tarih	İhbar eden ülke	İhbar edilen ülke	Ürün
19.01.2005	Almanya	İtalya	Gorgonzola Peyniri
20.01.2005	İtalya	Hollanda	Vakum Paketlenmiş Füme Somon
27.01.2005	İspanya	Brezilya	Bonfile Sığır Eti
31.01.2005	Norveç	İspanya	Sosis
03.02.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
01.02.2005	Belçika	Şili	Pişirilerek Dondurulmuş Midye
16.02.2005	Norveç	İspanya	Sosis
17.02.2005	İtalya	Hollanda	Füme Somon
24.02.2005	Norveç	İspanya	Domuz Etinden Yapılmış Sosis
24.02.2005	Norveç	İspanya	Taze Domuz Etinden Yapılmış Sosis
25.02.2005	Norveç	İtalya	Sosis
04.03.2005	Letonya	Litvanya	Füme Somon
04.03.2005	Letonya	Litvanya	Füme Sosis
07.03.2005	Fransa	Fransa	Çiğ Süttten Yapılmış Peynir
15.03.2005	Fransa	Hollanda	Domuz Kontrfile
15.04.2005	Avusturya	Danimarka	Füme Somon
28.04.2005	Fransa	Fransa	Camembert Peyniri
10.05.2005	Belçika	İtalya	Peynir
11.05.2005	Norveç	İspanya	Sosis
18.05.2005	Polonya	Macaristan	Salam
19.05.2005	İtalya	İtalya	Peynir
18.05.2005	Yunanistan	Brezilya	Dondurulmuş Sığır Eti
31.05.2005	Yunanistan	Brezilya	Dondurulmuş Sığır Eti
31.05.2005	Yunanistan	Arjantin	Tavuk Göğüs Eti
06.06.2005	Letonya	Litvanya	Füme Sosis
06.06.2005	Letonya	İspanya	Kurutulmuş Sosis
10.06.2005	Fransa	Vietnam	Panga Balığı
10.06.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
13.06.2005	Belçika	İtalya	Peynir
21.06.2005	Fransa	Fransa	Pastörize Peynir
22.06.2005	İtalya	Vietnam	Kedi Balığı
27.06.2005	Fransa	Fransa	Sosis
30.06.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
01.07.2005	Fransa	Arjantin	Vakum Paketlenmiş At Eti
07.07.2005	Slovakya	Slovakya	Peynir

Çizelge 2.2'nin devamı

Tarih	İhbar eden ülke	İhbar edilen ülke	Ürün
02.08.2005	İspanya	Portekiz	Peynir
04.08.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
08.08.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
08.08.2005	Yunanistan	Brezilya	Kemiksiz Sığır Eti
19.08.2005	İtalya	Arjantin	İnek Eti
29.08.2005	Avusturya	Avusturya	Peynir
01.09.2005	Fransa	Fransa	Keçi Peyniri
21.09.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
28.09.2005	Macaristan	Slovakya	Karışık Salata
03.10.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
05.10.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
11.10.2005	İtalya	Norveç	Füme Somon
13.10.2005	Slovakya	Slovakya	Karışık Salata
10.10.2005	İtalya	Fransa	Dilimli Füme Somon
10.10.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
20.10.2005	İtalya	Danimarka	Vakum Paketlenmiş Füme Somon
21.10.2005	Fransa	Danimarka	Füme Somon
21.10.2005	Belçika	Polonya	Vakum Paketlenmiş Füme Somon
21.10.2005	Slovenya	Hırvatistan	Peynir
24.10.2005	Fransa	Polonya	Füme Somon
25.10.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
27.10.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
04.11.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
03.11.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
10.11.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
16.11.2005	İtalya	Fransa	Füme Somon
16.11.2005	İrlanda	İrlanda	Pişmiş Sığır Et
16.11.2005	Kıbrıs	Kıbrıs	Hammadde
18.11.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
18.11.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
23.11.2005	İtalya	İtalya	Dana Eti
25.11.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
25.11.2005	Belçika	Hollanda	Füme Somon
21.11.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı Filetosu
25.11.2005	İtalya	İtalya	Peynir
28.11.2005	Kıbrıs	Kıbrıs	Füme Somon
29.11.2005	Almanya	İtalya	Gorgonzola Peyniri
30.11.2005	Fransa	Hollanda	İsviçre Peyniri
01.12.2005	Slovakya	Polonya	Füme Somon
02.12.2005	Fransa	Almanya	Sarımsaklı Füme Sosis
01.12.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı
05.12.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
07.12.2005	Yunanistan	İtalya	Füme Somon
09.12.2005	Avusturya	Almanya	Suşi Çeşitleri
15.12.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
12.12.2005	Yunanistan	Brezilya	Sığır Eti
19.12.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
20.12.2005	Kıbrıs	Kıbrıs	Konserve Somon
20.12.2005	İtalya	Danimarka	Füme Somon
21.12.2005	İtalya	Vietnam	Panga Balığı Filetosu
30.12.2005	Yunanistan	Yunanistan	Peynir
03.01.2006	İtalya	Danimarka	Füme Somon

Çizelge 2.2'nin devamı

Tarih	İhbar eden ülke	İhbar edilen ülke	Ürün
10.01.2006	İspanya	İspanya	Peynir
20.01.2006	Estonya	Litvanya	Ringa Balığı Filetosu
17.02.2006	İspanya	İspanya	Füme Çipura
26.04.2006	Fransa	Belçika	Baharatlı Köfte
31.05.2006	Belçika	Belçika	Peynir
29.05.2006	Slovakya	Slovakya	Peynir
01.06.2006	Hollanda	Vietnam	Panga Balığı Filetosu
19.07.2006	Fransa	Fransa	Çiğ Sütten Yapılan Peynir
26.07.2006	Fransa	Fransa	Çiğ Sütten Yapılan Peynir
30.08.2006	Polonya	Polonya	Füme Alabalık Filetosu
04.09.2006	Fransa	Fransa	Camembert Peyniri
06.09.2006	Slovakya	Fransa-İtalya	Parça Domuz Pastırması
08.09.2006	Polonya	Polonya	Füme Alabalık Filetosu
22.09.2006	İtalya	Almanya- Danimarka	Parça Füme Somon
25.09.2006	İngiltere	İngiltere	Baharatlı İskoç Füme Somon
04.10.2006	Polonya	Polonya	Füme Uskumru
24.10.2006	Fransa	İtalya	Rendelenip Kurutulmuş Peynir
25.10.2006	Çek Cumhuriyeti	Çek Cumhuriyeti	Olgunlaştırılmış Peynir
10.11.2006	Almanya	İtalya	Dondurulmuş Hindi Eti
28.11.2006	İtalya	İtalya	Gorgonzola Peyniri
04.12.2006	Almanya	Polonya	Füme Somon
07.12.2006	Almanya	Almanya	Ekşi Peynir
20.12.2006	Çek Cumhuriyeti	Çek Cumhuriyeti	Olgunlaştırılmış Peynir
08.01.2007	İngiltere	Belçika	Ördek Ciğeri
07.02.2007	Çek Cumhuriyeti	Almanya	Dilimli Füme Norveç Somonu
12.02.2007	Çek Cumhuriyeti	Polonya	Füme Norveç Somonu
12.02.2007	Slovakya	Çek Cumhuriyeti	Rokfor Peyniri
16.02.2007	Çek Cumhuriyeti	Polonya	Parça Füme Norveç Somonu
21.02.2007	Slovakya	Polonya	Dilimli Füme Somon
21.02.2007	Slovakya	Çek Cumhuriyeti	Rokfor Peyniri
22.02.2007	Slovakya	Çek Cumhuriyeti	Füme Norveç Somonu
15.03.2007	İtalya	Arnavutluk	Salamura Hamsi Filetosu
30.04.2007	Almanya	Yunanistan	Peynir
01.06.2007	Avusturya	Almanya	Füme Somon
07.06.2007	Fransa	İsviçre	Kurutulmuş Sığır Eti
11.06.2007	İtalya	İsviçre	Dondurulmuş Döner
20.06.2007	Fransa	Fransa	Tavuk
19.06.2007	Fransa	İspanya	Taze Sığır Filetosu
29.06.2007	Estonya	Estonya	Füme Tavuk Eti
10.07.2007	Fransa	İtalya	Hazırlanmış Peynir Tabağı ve Somon
11.07.2007	Fransa	İtalya	Peynir
09.07.2007	Fransa	İsrail	Dilimlenmiş Tavuk
26.07.2007	Fransa	İtalya	Hazırlanmış Peynir Tabağı ve Somon
31.07.2007	Norveç	İtalya	Gorgonzola Peyniri
10.08.2007	Fransa	İtalya	İtalyan Domuz Pastırması
22.08.2007	İngiltere	İngiltere	Paketlenmiş Füme İskoç Somonu ve Sebzeli Somon
04.09.2007	Belçika	İtalya	Pişmiş Gıda
13.09.2007	Fransa	Fransa	Sarımsaklı Füme Sosis
14.09.2007	Kıbrıs	Litvanya	Somon Havyarı
18.10.2007	Fransa	İsveç	Parça Balık Yumurtası
18.10.2007	Fransa	Fransa	Et Yığını

Çizelge 2.2'nin devamı

Tarih	İhbar eden ülke	İhbar edilen ülke	Ürün
18.10.2007	Almanya	İtalya	Organik Salam
30.10.2007	İtalya	Danimarka	Füme Somon
07.12.2007	İspanya	İspanya	Füme Somon
18.12.2007	Almanya	Yeni Zelanda	Midye
23.01.2008	Polonya	Polonya	Füme Domuz Pastırması
06.02.2008	İtalya	İspanya	Vakum Paketlenmiş Dilimli Füme Somon
27.02.2008	İtalya	Danimarka	Füme Somon
28.02.2008	Fransa	Fransa	Pastörize Keçi Peyniri
17.03.2008	Kıbrıs	Yunanistan	Hindi Filetosu
20.03.2008	Almanya	İtalya	Koyun Peyniri
27.03.2008	Almanya	İtalya	Koyun Peyniri
31.03.2008	İtalya	Fransa	Keçi Peyniri
01.04.2008	Almanya	İtalya	İtalyan Peyniri
03.04.2008	Fransa	Fransa	Kaz Ciğeri
04.04.2008	Portekiz	Portekiz	Sosis
15.04.2008	Polonya	Polonya	Füme Alabalık Filetosu
14.04.2008	Avusturya	Fransa	Peynir
28.04.2008	Almanya	Türkiye	Füme Alabalık Filetosu
08.05.2008	İtalya	Almanya	Kebab
23.05.2008	Finlandiya	Estonya	Dilimlenmiş Vakum Paketlenmiş Alabalık Filetosu
23.05.2008	İtalya	Danimarka	Dilimlenmiş Füme Somon
10.06.2008	İtalya	Polonya	Vakum Paketlenmiş Somon
12.06.2008	Hollanda	Fransa	Fransız Peyniri
13.06.2008	Fransa	İtalya	Gorgonzola Peyniri
20.06.2008	İngiltere	İngiltere	Füme Somon
26.06.2008	Almanya	İtalya	İtalyan Peyniri
30.06.2008	Almanya	Almanya	Marul Miksi
09.07.2008	Almanya	İtalya	İtalyan Peyniri
18.07.2008	Fransa	Almanya	Koyun Peyniri
23.07.2008	Almanya	İtalya	Peynir
29.07.2008	Fransa	Fransa	Peynir
11.08.2008	Fransa	Belçika	Haşlanmış-Doğranmış Yumurta
27.08.2008	Fransa	Fransa	Dilimli Sosis
28.08.2008	Fransa	Fransa	Peynir
29.08.2008	Fransa	Fransa	Peynir
08.09.2008	Fransa	İtalya	Gorgonzola Peyniri
18.09.2008	Fransa	Fransa	Gorgonzola Peyniri
26.09.2008	Fransa	Fransa	Peynir
02.10.2008	Fransa	Fransa	Peynir
14.10.2008	Fransa	Fransa	Fırıncılar Peyniri
17.10.2008	Çek Cumhuriyeti	Çek Cumhuriyeti	Vakum Paketlenmiş Acılı Jambon
24.10.2008	Fransa	Fransa	Dilimlenmiş Füme Somon
30.10.2008	Fransa	İsviçre-Fransa	Vakum Paketlenmiş Sığır Eti
11.11.2008	Lüksemburg	Almanya	Dondurulmuş Kebab
21.11.2008	İtalya	İtalya	Gorgonzola Peyniri
18.12.2008	Avusturya	İtalya	Gorgonzola Peyniri
31.12.2008	İngiltere	İngiltere	Stilton Peyniri
31.12.2008	İngiltere	Fransa	Salam

Çizelge 2.2'nin devamı

Tarih	İhbar eden ülke	İhbar edilen ülke	Ürün
16.01.2009	Fransa	İtalya	Gorgonzola Peyniri
29.01.2009	Fransa	Fransa	Çiğ Sütten Yapılmış Camembert Peyniri
06.02.2009	İtalya	İspanya	Salamura Karides Kuyrukları
13.02.2009	Fransa	Fransa	Çiğ Sütten Yapılmış Camembert Peyniri
04.03.2009	İtalya	Polonya-Danimarka	Vakum Paketlenmiş Füme Somon
30.03.2009	Polonya	Polonya	Sosis
01.04.2009	İspanya	İspanya	Taze Keçi Peyniri
09.04.2009	İtalya	İtalya	Gorgonzola Peyniri
14.04.2009	Belçika	Belçika	Çiğ Sütten Yapılmış Peynir
21.04.2009	Yunanistan	Vietnam	Dondurulmuş Balık
21.04.2009	Yunanistan	Vietnam	Dondurulmuş Balık Filetosu
30.04.2009	Fransa	Fransa	Çiğ Sütten Yapılmış Peynir
27.04.2009	İtalya	Polonya	Füme Somon
29.04.2009	Litvanya	Belarus	Ringa Balığı ve Alabalık
30.04.2009	Fransa	Almanya	Dilimlenmiş Jambon
12.05.2009	Slovenya	Fransa	Şarküteri Çeşitleri
18.05.2009	Fransa	Polonya	Dondurulmuş Pane Saithe Filetosu
02.06.2009	Çek Cumhuriyeti	Polonya	Baharatlı Füme Uskumru Fileto
08.06.2009	Avusturya	Çek Cumhuriyeti	Baharatlı Füme Uskumru Fileto
18.06.2009	Yunanistan	Vietnam	Dondurulmuş Panga Balığı Filetosu
19.06.2009	Yunanistan	Vietnam	Dondurulmuş Panga Balığı Filetosu

2.1.2 Taksonomi

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin 9. sayısına göre *Listeriaceae* familyasında *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* ve *L. murrayi* olmak üzere 7 tür bulunmaktadır (Seeliger and Jones, 1986). *Listeria* genusu içinde *L. monocytogenes*'in insanlar ve hayvanlar için tek patojen tür olduğu, *L. ivanovii*'nin ise hayvanlar için patojen olduğu bildirilmiştir (Fenlon, 1999). Önceleri yedinci tür olarak genusa dahil edilen *L. murrayi*'nin, son yıllarda yapılan DNA-DNA hibridizasyon analizleri, multilokus enzim elektroforez ve rRNA restriksiyon fragment analizleri sonucu *L. grayi*'nin bir alt türü olduğu ortaya konmuştur (Rocourt et al., 1992).

Listeria monocytogenes'in somatik (O) ve flagellar (H) antijene bağlı olarak bilinen 13 serotipi bulunmaktadır. Bunlar arasında da insanlarda en sık hastalık oluşturan serotipler 1/2a, 1/2b ve 4b'dir (Farber and Peterkin, 1991). Ayrıca 1998 ile 1999 yıllarında tereyağından kaynaklanan 25 listeriozis vakasından 3a serotipinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Lyytikäinen et al., 2000).

2.1.3 Biyokimyasal ve morfolojik özellikler

Listeria monocytogenes, fakültatif anaerobik, Gram pozitif, sporsuz, kapsülsüz, peritrik flagellaları ile 20-25°C’de hareketli, 35-37°C’de hareketsiz, psikrotrof özellikte, 0,5 µm eninde ve 1-2 µm boyunda kısa çubuk formunda, fakültatif intraselüler, patojen bir bakteridir. Bakteri, 0-45°C aralığında üreyebilmekte olup, 20-25°C’ler arasında kuvvetli hareketlidir. Etken aerob, anaerob veya mikroaerofilik ortamlarda, geniş pH aralıklarında (4.3-9.6), 0.92 aw değerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (%10) üreyebilmektedir (Erol, 2007).

Listeria türleri, oksidaz negatif, katalaz pozitif, Voges-Proskauer ve Metil Red pozitif olup, indol ve H₂S oluşturmazlar. Sodyum hippuratu ve eskülini hidrolize ederler. Oksijenli ortamda hareketli olduklarından Sulphate Indol Motility (SIM) mediumda şemsiye tarzında üreme gösterirler. *L. monocytogenes* ramnozu fermente ederek asit oluştururken, ksiloz ve mannitolü fermente edemez (Seeliger and Jones, 1986).

Çizelge 2.3 *Listeria* türlerini teşhis reaksiyonları (ISO 11290-1, 1997)

TÜRLER	Hemoliz	Asit Oluşumu		CAMP Deneyi	
		Ramnoz	Ksiloz	<i>S.aureus</i>	<i>R.equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-

V: değişken reaksiyon

(+): zayıf reaksiyon

+ : %90’ın üzerinde pozitif reaksiyon

- : reaksiyon yok

NOT: β-hemoliz göstermeyen veya bu yöntemde tarif edilen şartlar altında CAMP deneyine pozitif bir reaksiyon vermeyen nadir *L. monocytogenes* suşları vardır.

L. monocytogenes’in koyun, at, tavşan veya insan kanı ilave edilmiş besiyerlerinde beta hemoliz oluşturduğu bildirilmiştir (Farber and Peterkin, 1991).

Etken, kanlı agarda *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* ile sinerjik hemolitik bir etki göstermekte ve bu CAMP (Christie Atkins Munch Petersen) testi olarak adlandırılmaktadır (McKellar, 1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin 9. sayısına göre *L. monocytogenes*'in *S. aureus* ile pozitif, *R. equi* ile negatif CAMP reaksiyonu gösterdiği (Seeliger and Jones, 1986) belirtilmesine karşın, bazı araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda *L. monocytogenes*'in *R. equi* ile de pozitif reaksiyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Schuchat et al., 1991; McKellar, 1994; Ripio et al., 1996; Fernández-Garayzábal et al., 1996).

2.1.4 Patojenik yaşam şekli

L. monocytogenes, birçok hayvan türünde listeriozis adı verilen hastalığa sebep olmaktadır. Bu hastalık genellikle memelilerde etkili olmakla birlikte, bazı kuş türleri ve poikilotermik hayvanlarda da görülmektedir. İnsanlarda ishal ve grip benzeri hafif hastalıkların yanı sıra, tehlikeli invazif hastalıklara da neden olmaktadır. Listeriozis insanlarda, menenjit, ensefalit, septisemi ve hamile kadınlarda düşük, ölü doğum, bebekte septisemi ve menenjit şeklinde seyretmektedir. İnsanlarda görülen listeriozis enfeksiyonlarının %99'u gıda kaynaklıdır. İnsanda enfektif doz yüksek, gıdaya başlangıç kontaminasyonu ise genelde düşüktür. Bu nedenle, *L. monocytogenes*'in hastalık yapıcı seviyeye ulaşması için gıda üzerinde çoğalması gerekmektedir. Bu durum mikroorganizmanın farklı ve ekstrem koşullarda yaşamını devam ettirebilmesi ve çoğalabilmesi ile mümkün olmaktadır (Chaturongakul et al., 2008).

İnsan listeriozis enfeksiyonu, kontamine gıdanın vücuda alınmasından sonra şu aşamaları izler:

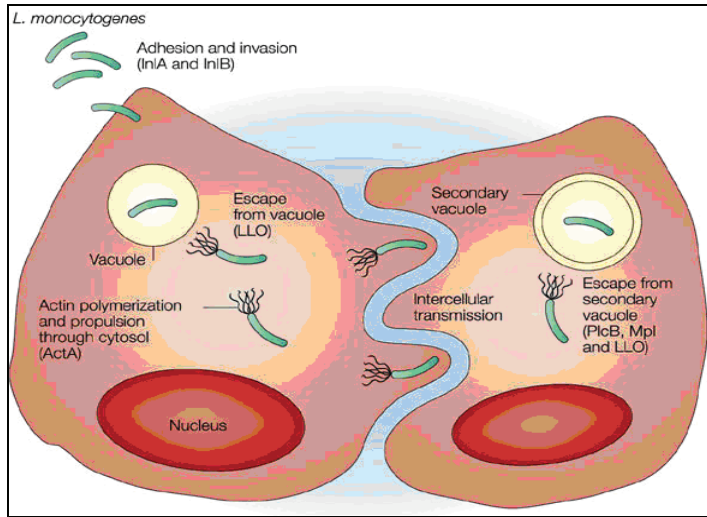
- i. Gastrik yol boyunca canlılığın korunması,
- ii. Kolon içerisinde canlılığın korunması ve çoğalma süreci, ishal semptomları ile birlikte,
- iii. Bağırsak sisteminde epitel hücrelere veya mikrofold (M) hücrelere invazyon,
- iv. Fagositik veya nonfagositik hücreler arasında intraselüler dağılım.

Selüler enfeksiyon aşamaları da aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

- i. *L. monocytogenes*'in konukçu hücre içerisine yerleşmesi

- ii. Konukçu vakuolünden çıkış,
- iii. Konukçu hücrenin sitoplazmasında çoğalma,
- iv. Konukçu hücre yüzeyine hareket ve pseudopod benzeri yapılar içerisinde geçiş,
- v. Pseudopod benzeri bu yapıların komşu hücreler tarafından fagositozu,
- vi. Çift katlı membrana sahip vakuolden bakterinin çıkışı.

Döngü aynı şekilde devam eder. *L. monocytogenes*'e ait birçok virulans geni ve bu genlerin spesifik aktiviteleri intraselüler enfeksiyon aşaması ile karakterize edilir (Chaturongakul et al., 2008).



Şekil 2.1 *L. monocytogenes*'in selüler enfeksiyon aşamaları (Pamer, 2004)

2.1.5 Kontaminasyon kaynakları ve yayılması

L. monocytogenes, geniş bir alana yayılmakta, su, silaj, lağım suyu, mezbaha atıkları, sağlıklı ve mastitisli ineklerin sütleri, insan ve hayvan dışkısında olduğu gibi pek çok yerde bulunabilmektedir (Farber and Peterkin, 1991). *Listeria*'ların insanlara geçişinde gıdadan-insana, hayvandan-insana, insektlerden-insana, insandan-insana, bitki-topraktan-insana olmak üzere birçok muhtemel yolun olduğu bildirilmektedir (Fenlon, 1999).

L. monocytogenes ile kontamine olan ve usulüne uygun yapılmayan silaj *L. monocytogenes* için önemli bir rezervuar olarak bildirilmiştir (Jones and Seeliger,

1991). Ayrıca *L. monocytogenes*'in pek çok hayvan ve insanın normal bağırsak florasında bulunabileceği belirtilmiştir. Danimarka'da yapılan iki çalışmada sağlıklı insanların dışkılarının %1,0'ından (3/348), listeriozisli kişilerin % 21,6'sından (16/74) *L. monocytogenes* izole edilmiştir (Jensen, 1993a; Jensen, 1993b). Hollanda'da sağlıklı sığırların dışkılarında %10,0 dolayında *L. monocytogenes* tespit edilmiştir (Jay et al., 2005).

Gıda işleme tesislerine *L. monocytogenes*'in girişi; toprak, çalışanların ayakkabıları, taşıma araçları, enfekte hayvanlar, hayvan kaynaklı çiğ gıdalar ve sağlıklı fakat etkeni taşıyan insanlarla olabilmektedir. *L. monocytogenes*'in gıda tesislerinde genellikle rutubetli yüzeylerden, kirli ve durgun sulardan, gıda kalıntılarından, alet ve ekipmanlardan izole edildiği bildirilmiştir (Swaminathan et al., 2007). Ayrıca, et ve süt işleme tesislerinde *L. monocytogenes*'in alet-ekipman yüzeyine tutunarak işletmede biyofilm oluşturmak suretiyle potansiyel bulaşma kaynağı olduğu saptanmıştır (Jeong and Frank, 1994).

Listeria monocytogenes ile kontaminasyon hem gıda işleme sırasında hem de daha sonraki aşamalarda meydana geldiğinden gıda endüstrisi açısından etken çoğu zaman problem oluşturabilmektedir. Bakterinin giriş yollarının kontrolünün yanı sıra, üretim tesislerinin modernizasyonu ve işletmede etkin dezenfeksiyon tekniklerin uygulanmasıyla bulaşmanın önüne geçilebilmektedir (Jay et al., 2005).

Yapılan çeşitli araştırmalarda, *L. monocytogenes* ile kontaminasyonun daha çok kesimhanelerde ve gıdaların işlenmesi aşamasında şekillendiği, ayrıca kesim işlemi sonrası *L. monocytogenes* prevalansının kesim öncesine göre %70-100 arttığı bildirilmiştir (Van Der Elzen and Snijders, 1993). Özellikle kanatlı işleme tesislerinde kesim işlemi sonrası kontaminasyonun önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir (Cox et al., 1997; Ojeniyi et al., 2000).

Sağlıklı süt inekleri *L. monocytogenes*'in rezervuarı olabilmekte ve sütleri etken ile kontamine olabilmektedir. Ayrıca, sütün *L. monocytogenes* ile kontaminasyonu dışkı ve silajla temas sonrası da şekillenebilmektedir. *L. monocytogenes*'in süt toplama tankındaki prevalansı %1-13 civarında iken, süt işleme tesislerindeki bulunma oranı %7-28'dir (Fenlon et al., 1995; Van Kessel et al., 2004; Oliver et al., 2005). Dolayısıyla çiğ süt ve ürünleri *L. monocytogenes* enfeksiyonları açısından riskli gıdalar arasında yer almaktadır. Ancak termal inaktivasyon konusunda yapılan çalışmalar bu bakterinin, sütte 71°C'de 15 saniyedeki (HTST- High Temperature Short Time, Yüksek Sıcaklık Kısa Süre)

pastörizasyon ile etkin bir şekilde yıkımlanabildiğini göstermiştir (Swaminathan et al., 2007).

Fenlon et al. (1995), İskoçya'da toplama tanklarındaki sütlerin *L. monocytogenes* ile kontaminasyon düzeyini araştırdıkları çalışmada, 160 üreticiden 25'inin (%15) sütünün etken yönünden pozitif olduğunu tespit etmişler ve çiğ sütün, süt üretim tesisleri için potansiyel kaynak olduğunu bildirmişlerdir. FDA'nın 1986-1987 yıllarında ABD'de yaptığı geniş çaplı bir taramada, *L. monocytogenes* prevalansının pastörize sütlerde %0,6 olduğu ve uygulanan pastörizasyon metodunun *L. monocytogenes*'e karşı mutlak öldürücü bir etki göstermediği ortaya konmuştur (Doyle et al., 1987).

Birçok peynir tipi, özellikle yumuşak peynir tipleri *L. monocytogenes* enfeksiyonları için önem taşımaktadır. Loncarevic et al. (1995), İsveç'te çeşitli ülkelere ait 333 peynir tipini *L. monocytogenes* açısından inceledikleri bir çalışmada, peynirlerin 20'sinin (%6) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada, 174 Fransız peynirinden 18'i, 31 Alman peynirinden 1'i ve 36 İtalyan peynirinden 1'i *L. monocytogenes* yönünden pozitif bulunmuştur. Türkiye'de konuyla ilgili yapılan bir çalışmada, Mart 2004-Mart 2005 tarihleri arasında İstanbul'daki marketlerden toplanan 250 tulum peyniri örneğinin % 4,8'inin (12/250) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Çolak et al., 2007).

Kasaplık hayvanlar *L. monocytogenes*'i semptomatik veya asemptomatik olarak taşıyabildiği gibi etleri, kesim işlemi sırasında ve sonraki aşamalarda kontamine olabilmektedir. Kontaminasyonun ardından, mikroorganizmanın et yüzeyine sıkıca tutunduğu ve buradan uzaklaştırılmasının veya inaktive edilmesinin oldukça güç olduğu bildirilmiştir (Farber and Peterkin, 1999). Patojenin buzdolabında saklanan çiğ, işlenmiş ve tüketime hazır et ve et ürünlerinde üreyebildiği, buna bağlı olarak kontamine gıdaların insanlarda listeriozis şekillenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Skovgaard and Morgen, 1988; Kerr et al., 1990).

Belçika'da yapılan bir çalışmada, incelenen çiğ ve kürlenmiş 43 sığır, 17 at ve 322 domuz etinin sırasıyla %4,7 (2/43), %5,9 (1/17) ve %14,9 (48/322) oranında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Uyttendaele et al., 1999). İsviçre'de yapılan bir çalışmada, 211 sığır, 189 domuz olmak üzere toplam 400 kıyma örneğinin %10,8'i (43/400) *L. monocytogenes* yönünden pozitif

bulunmuştur. Noack and Jockel (1993), 1990-1992 yılları arasında 1235 et ve et ürününü *L. monocytogenes* yönünden analiz etmişlerdir. Buna göre taze etlerin % 8,5'inden, ısı işlemi görmemiş sucukların %14,0'ından ve ısı işlemi görmüş sucukların %3,7'sinden *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Afyon'da yapılan bir çalışmada, marketlerden toplanan 100 sucuk örneğinin 9'unda *Listeria spp.* tespit edildiği, izolatlardan 7'sinin *L. monocytogenes*, 1'inin *L. ivanovii* ve 1'inin *L. innocua* olduğu bildirilmiştir (Sırıken et al., 2006).

Çeşitli ülkelerde kanatlı kesimhanelerinde yapılan çalışmalarda, hindi etlerinin *L. monocytogenes* ile kontaminasyon düzeyinin %5,2 ile 21,4 (Clouser et al., 1995; Uyttendaele et al., 1997; Samelis and Metexopoulos, 1999), market bazında yapılan çalışmalarda, %15,0 ile 38,0 arasında olduğu bildirilmiştir (Genigeorgis et al., 1990; Wenger et al., 1990; Wong et al., 1990). İspanya'da 2001 yılında yapılan bir çalışmada, tavuk karkaslarının %15,0 dolayında *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Capita et al., 2001). Ankara'daki marketlerde taze olarak tüketime sunulan 40 kıyma, 30 köfte ve 30 burgerden oluşan toplam 100 tavuk eti ürününde *Listeria*'ların varlığı ve kontaminasyon düzeyi araştırılmıştır. Tavuk kıyma örneklerinin %35,0'ının, tavuk köfte örneklerinin %20,0'ının ve tavuk burger örneklerinin %26,6'sının *Listeria* türleri ile kontamine olduğu saptanmıştır (Şireli et al., 2002).

Listeria monocytogenes deniz suyunda 3 hafta, tatlı sularda ise 8 haftaya kadar canlılığını koruyabilmektedir (Varma and Lyer, 1993; Bremer et al., 1998). Bununla birlikte su ürünlerinin *L. monocytogenes* ile kontaminasyonunda en önemli kaynağın işleme tesisleri olduğu bildirilmiştir. Mikroorganizma, su ürünleri işleme tesislerinde kullanılan alet ve ekipmana tutunup üremekte, buralarda biyofilm oluşturmakta ve uzun süre varlığını sürdürerek temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri ile ortamdan uzaklaştırılmaları zorlaşmaktadır (Sasahara and Zottola, 1993; Embareck, 1994; Autio et al., 1999). Su ürünlerinden özellikle taze ve donmuş midye başta olmak üzere kabuklu deniz ürünlerinin, çiğ, salamura veya soğuk dumanlanmış balık etinin gıda kaynaklı listeriozis açısından riskli gıdalar oldukları bildirilmiştir (Huss et al., 2000). Avcıbaşı (2005), Ankara'daki süpermarketlerden topladığı dumanlanmış vakum paketli 76 balık örneğinin %2,6'sından *L. monocytogenes* izole etmiştir.

Wong et al. (1990), Tayvan'da yerel marketlerde satışa sunulan marul, lahana ve yeşil soğanın %12,2'sinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu saptamıştır. Amerika'da yapılan bir çalışmada marketlerde satışa sunulan patates

ve turpların sırasıyla %25,8'inin ve %30,3'ünün *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Heisick et al., 1989). Uyttendaele et al. (1999), Belçika'da süpermarketlerde tüketime hazır olarak satışa sunulan 874 mayonezli salatanın 186'sından (%21,3), 201 sebze salatasının 13'ünden (%6,5) *L. monocytogenes* izole etmiştir.

2.1.6 Gelişimini etkileyen faktörler

2.1.6.1 Sıcaklık

Listeria monocytogenes geniş bir sıcaklık aralığında (0-45°C) üreyebilme özelliğine sahip olmasına karşın, optimum üreme sıcaklığı 30-37°C'dir. Psikrotrofik özelliğinden dolayı etken buzdolabında muhafaza edilen gıdalarda da üreyebilmektedir (Erol, 2007). *L. monocytogenes*'in üreme hızı düşük sıcaklık derecelerinde yavaşlamakta, ancak etken 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir. Bakterinin düşük sıcaklıklarda üreyebilmesini *ltrA*, *ltrB* ve *ltrC* genleri tarafından eksprese edilen proteinlerin sağladığı belirtilmiştir (Zheng and Kathariou, 1997). Yapılan bir çalışmada 39 *L. monocytogenes* suşunun 4, 10 ve 37°C'de ortalama jenerasyon süresinin sırasıyla 43, 6,6 ve 1,1 saat, lag faz süresinin ise 151, 48 ve 7,3 saat olduğu tespit edilmiştir (Barbosa et al., 1994). Bir başka çalışmada *L. monocytogenes* inoküle edilmiş hindi kıyması ve sosisinin -18°C'de 8 haftalık muhafazasında patojenin sayısında 1-3 logaritmalık bir düşüş şekillendiği görülmüştür (Palumbo and Williams, 1991). Ayrıca mikroorganizmanın üst üreme sıcaklık limiti olan 45°C'nin üzerinde de canlılığını sürdürebildiği bildirilmiştir.

2.1.6.2 Sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonu

Listeria monocytogenes halotolerant özellikte olup sodyum klorürün üremeyi baskılayıcı etkisine dirençlidir. Ancak etkenin çoğalmasını önlemek için yüksek miktarda tuza ihtiyaç duyulmaktadır. McClure et al. (1989), *L. monocytogenes*'in %10 NaCl konsantrasyonunda, 25°C'de 72 saat muhafazasında üremeye devam ettiğini gözlemlemiştir. Peterson et al. (1993), *L. monocytogenes*'in %6 NaCl'de 5°C'de 10 kob/g, kontrol grubunun ise aynı sürede 10^6 - 10^8 kob/g düzeyine kadar üreme gösterdiğini, dolayısıyla bu konsantrasyondaki tuzun *L. monocytogenes*'in üremesini yavaşlattığını ancak durdurmadığını ortaya koymuşlardır. Hudson (1992), *L. monocytogenes*'in %6, 16 ve 26 konsantrasyonlarda NaCl içeren sıvı besiyerlerinde 10°C'de 6 saat canlılığını sürdürebildiğini bildirmiştir. Ayrıca, belli miktarda tuzun,

organizmanın sıcaklık gibi bazı stres faktörlerinden korunmasında etkili olduğunu saptamıştır. Başka bir çalışmada, %8'lik tuz konsantrasyonunun klinik ve gıda kökenli *L. monocytogenes* izolatlarının lag faz süresinin uzamasına ve dolayısıyla üreme süresinin 2,5 kat artmasına neden olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada bakterinin birçok çevresel stres faktörüne dirençli olduğu ancak bu gibi koşullarda hücrelerin hasar gördüğü ve duyarlılıklarının arttığı saptanmıştır (Viallette et al., 2003).

2.1.6.3 Su aktivitesi

Listeria monocytogenes, optimal olarak 0,97 su aktivitesi (a_w) değerinde üreyebilmektedir. Üreyebileceği en düşük a_w değeri 0,93 olarak bilinmesine karşın bazı suşlar 0,90 a_w 'de dahi üreyebilmektedir. Etken ayrıca 0,83 gibi çok düşük a_w değerinde uzun süre canlılığını sürdürebilmektedir (Shahamat et al., 1980). Nolan et al. (1992), *L. monocytogenes*'in % 0,6 yeast ekstraktlı TSB'de gliserol, NaCl ve şeker varlığında, 0,92 a_w değerinde üreyebildiğini bildirmişlerdir.

2.1.6.4 pH

Listeria monocytogenes, oldukça geniş pH aralığında (4,3-9,6) üreyebilmesine karşın optimum pH aralığı 6,0-8,0'dır (Jay et al., 2005). Düşük pH değerlerinde üreyebilmesi, inkübasyon sıcaklığı, asidin türü, besin içeriği, rutubet ve ürünün bileşimi gibi birçok faktöre bağlıdır. Tryptic broth içerisindeki %0,1'den fazla asetik, sitrik ve laktik asidin *L. monocytogenes*'in üremesini baskıladığı, sıcaklığın düşmesiyle birlikte inhibisyonun arttığı bildirilmiştir. Bu asitlerin anti-listerial aktivitelerinin disosiyasyon derecelerine bağlı olduğu, laktik ve sitrik asidin aynı pH değerinde *L. monocytogenes* üzerine asetik asitten daha az yıkımlayıcı etkilerinin bulunduğu belirtilmiştir (Swaminathan et al., 2007). Dykes and Moorhead (2000) klinik ve et kaynaklı *L. monocytogenes* izolatlarına asit stresinin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, 2 saat süre ile pH 2,5'e maruz bırakılan izolatlardan et orijinli olanların sayısında önemli bir azalma görülürken, hiçbir klinik izolatın ciddi olarak etkilenmediği belirlenmiştir. Çeşitli araştırmacılar, *L. monocytogenes*'in asit ve ozmotik şok yanıtları arasında sinerjik bir etki olduğunu vurgulamışlardır (Faleiro et al., 2003; Viallette et al., 2003). Le Marc et al. (2002), düşük pH, yüksek konsantrasyonlu zayıf organik asit ve düşük ısı kombinasyonunun *Listeria* üzerine inhibitör etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çoğu et ürününün pH değeri hayvan türüne ve uygulanan işleme göre 5,1-6,4 arasında değişmektedir. Dolayısıyla etlerin *L. monocytogenes* ile

kontaminasyonunun gıda güvenliği açısından önem taşıdığı belirtilmiştir (Jay et al., 2005).

2.1.6.5 Gaz-atmosfer

Listeria monocytogenes; aerob, mikroaerofilik ve anaerob koşullarda üreyebilmektedir. Ancak modifiye atmosfer paketlemede (MAP), yüksek düzeyde CO₂ kullanımının, düşük sıcaklıklarda *L. monocytogenes*'in üremesini baskıladığı bildirilmiştir (Fernandez et al., 1997). Vakum paketli dumanlanmış balıkta 4 ve 8°C'lerdeki muhafaza koşullarında *L. monocytogenes*'in üremeye devam ettiği kaydedilmiştir (Duffes et al., 1999).

2.1.6.6 Mikrobiyal Rekabet

Gıdalar, pişirme işlemi sonrası *L. monocytogenes* ile kontamine olabileceği gibi *Pseudomonas* gibi psikrotrofik, Gram negatif, saprofit mikroorganizmalarla da kontamine olabilmektedir. Bu mikroorganizmalar ortamda bulunan besin maddeleri açısından rekabetçi olabilirken ürün güvenliğini ve raf ömrünü azaltabilmektedirler (Lawlor, 1999). Buchanan and Bagi (1999), tarafından gerçekleştirilen iki çalışmada, *Pseudomonas fluorescens*'in düşük sıcaklıkta (4°C) ve düşük tuz konsantrasyonunda (%0,5-2,5), *L. monocytogenes*'in üremesi üzerine baskılayıcı etki gösterdiği bildirilmiştir. Ancak daha yüksek sıcaklıklarda (4-19°C) ve tuz konsantrasyonunda (%2,5-4,5) *L. monocytogenes*'in üreme özelliği gösterebildiği belirtilmiştir. Pediokokların, laktobasillerin, leukonostokların ve enterokokların içinde bulunduğu laktik asit bakterileri (LAB) oluşturdukları organik asitler ve bakteriosinlerle gıdalarda *L. monocytogenes* dahil birçok bakteriye karşı rekabetçi etki göstermektedir. LAB'nin oluşturduğu laktik ve asetik asidin *Listeria* türleri üzerine hidroklorik asit gibi inorganik asitlerden daha fazla inhibitör etki gösterdiği (Farber et al., 1989) ayrıca, LAB'nin ürettiği bakteriosinlerin *Listeria* spp.'nin üremesini baskıladığı bildirilmiştir (McCormick et al., 1998).

2.2 Metot Validasyonu

Gıdaların mikrobiyal analizleri, gıda güvenliğinin önemli bir parçasıdır. Gerek kontrol otoriteleri gerekse gıda üreticileri, gıda zincirinde meydana gelebilecek riskleri gözlemlemek amacıyla mikrobiyal analizlerden yararlanırlar. Aynı zamanda mikrobiyolojik analizler, gıdaların kodeks kriterlerine

uygunluğunu ve HACCP sisteminin performansını değerlendirmek için de uygun yöntemlerdir (Jasson et al., 2010).

Mikrobiyal analizlerdeki metotlar, sayım metotları (kantitatif) ve tespit metotları (kalitatif) olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlardan klasik kültürel olan metotlar (hedef organizmanın broth ya da agar da koloni oluşturması, türbidite ve renk değişimine dayalı metotlar) referans metot olarak adlandırılır. Resmi otoriteler tarafından yapılan analizlerde, genellikle referans metotlar tercih edilmesine rağmen, son yıllarda standart kültürel metotların yanı sıra yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip olmaları ve daha hızlı sonuç alınabilmeleri nedeniyle Elfa, Elisa, PCR gibi tam veya yarı otomatik alternatif metotlar, in-house metotlar da sıklıkla kullanılmaktadır. Her ne kadar güvenilir ve hassas olsalar da, bu metotların kullanımına geçilmeden önce, standart uluslar arası metotlar referans alınarak valide edilmeleri ve referans metotla paralel sonuçlar verdiğinin kanıtlanması zorunludur (Jarvis, 2008).

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan metotlar, gerek kalitatif gerekse kantitatif olsun, örnek hazırlama, örnek analizi, sayım ve doğrulama gibi birçok basamaktan oluşmaktadır. Analizin güvenilirliği için metotta belirtilen bu basamakların her birine optimum uyum ve validasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

2.2.1 Validasyonun tanımı ve gerekliliği

Validasyon, bir metodun kontrollü koşullar altında hedeflenen kullanım için uygunluğunun ölçülmesi prosesidir. AB Regülasyonu 2073/2005 uyarınca, alternatif metotların kullanımı, ancak ISO 16140 standardına göre valide edildiklerinde kabul edilebilmektedir (International Standards Organization, 2003). Valide metotların kullanımı, ISO 17025 standardına göre akredite olmuş laboratuvarlar ya da üçüncü taraf olarak denetim yapan kuruluşların test sonuçlarının geçerliliği için de bir ön koşuldur.

Avrupa'da ISO 16140'a göre validasyon gerçekleştiren birçok kurumun yanı sıra kendi kurallarına göre validasyon yapan AFNOR, NordVal, MicroVal gibi kurumlar da bulunmaktadır. 16140 standardı, gıdaların, hayvan yemlerinin, çevre ve veterinerlik örneklerinin analizinde kullanılan alternatif mikrobiyolojik metotların validasyonu için teknik bir protokoldür.

Kalitatif metotların validasyonunda, rölatif doğruluk, rölatif özgüllük, rölatif duyarlılık ve rölatif tespit limiti temel parametrelerdir. Kantitatif metotlarda ise doğruluk, doğrusallık, tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), rölatif özgüllük ve duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri hesaplanmaktadır. ISO 16140 çerçevesinde, bir validasyon çalışması, aynı örneğin alternatif metot kullanılarak analize alınmasından elde edilen sonuç ile referans metot kullanılarak analize alınmasından elde edilen sonuç arasındaki uyumunun derecesini kapsar. Yeni kullanıma geçecek alternatif bir metot için laboratuvarlar arası çalışmalar da validasyonun bir parçasıdır. Laboratuvarlar arası testler bir metodun performansının hassasiyetini değerlendirmek için önemli veriler sağlar. Validasyon çalışmalarında yeni metodun temel prensipleri anlaşılmalı çalışılmalıdır, başka bir deyişle metodun hedef mikroorganizmanın sayısını belirlemek ya da mikroorganizmayı tespit etmek için uygunluğu gözlenmelidir (Jasson et al., 2010).

2.2.2 Kalitatif metotlarda validasyon parametreleri

Bir örnek içerisindeki hedef mikroorganizmanın varlığını ya da yokluğunu belirlemek için kullanılan direkt ya da indirekt metotlar kalitatif metot olarak adlandırılmaktadır. ISO 16140'a göre alternatif kalitatif metotların validasyon çalışmalarında kullanılan parametreler şunlardır:

- **Rölatif tespit limiti:** Laboratuvar koşullarında metodun tespit edebileceği minimum mikroorganizma sayısıdır.
- **Rölatif doğruluk/Relative accuracy (AC):** Aynı örnek hem alternatif hem de referans metot ile analiz edildiğinde, iki sonuç arasındaki uyumun derecesidir.
- **Pozitif sapma/Positive deviation (PD):** Referans metot negatif sonuç verdiğinde, alternatif metodun pozitif sonuç vermesi durumudur. Test sonucu negatif olarak kanıtlandığında, pozitif sapma yanlış pozitif durumuna gelir. Ancak sonucun pozitif olarak doğrulandığı durumlarda pozitif sapma ortadan kalkar.
- **Negatif sapma/Negative deviation (ND):** Referans metot pozitif sonuç verdiğinde, alternatif metodun negatif sonuç vermesi durumudur. Test sonucu pozitif olarak doğrulandığında negatif sapma, yanlış negatif durumuna gelir.

- **Rölatif duyarlılık/Relative sensitivity (SE):** Referans metodun hedef mikroorganizmayı saptayabildiği durumlarda, alternatif metodun da saptayabilme kabiliyetidir.
- **Rölatif özgüllük/Relative specificity (SP):** Referans metodun test edilen örnekte mikroorganizmayı saptamadığı durumlarda, alternatif metodun da saptamamasıdır.

Çizelge 2.4 Referans ve alternatif metodun eşleştirilmiş sonuçları (ISO 16140:2003)

Sonuçlar	Referans metod pozitif (R+)	Referans metod negatif (R-)
Alternatif metod pozitif (A+)	Pozitif uyumluluk (PA)	Pozitif sapma (PD) R-/A+
Alternatif metod negatif (A-)	Negatif sapma (ND) A-/R+	Negatif uyumluluk (NA)

$$\text{Rölatif doğruluk: AC} = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$$

$$\text{Rölatif özgüllük: SP} = \frac{NA}{N_-} \times 100\%$$

$$\text{Rölatif duyarlılık: SE} = \frac{PA}{N_+} \times 100\%$$

PA: Her iki metod ile pozitif bulunan örnek sayısı

NA: Her iki metod ile negatif bulunan örnek sayısı

N: Toplam örnek sayısı (NA+PA+PD+ND)

N₋: Referans metod ile bulunan negatif örnek sayısı (NA+PD)

N₊: Referans metod ile bulunan pozitif örnek sayısı (PA+ND)

2.2.3 Kantitatif metotlarda validasyon parametreleri

- **Doğrusallık:** Metodun, örnek içerisinde aranan mikroorganizma miktarına paralel sonuçlar vermesidir. Mikroorganizma sayısı arttıkça doğrusallık artar. Doğrusallığı hesaplamak için sonucu belli referans materyal (RM) ile çalışılır.
- **Doğruluk:** Kabul edilen referans değer ile test sonucu arasındaki uyumun derecesidir. Doğruluk çalışmalarından elde edilen sonuçlar, analizde yapılan rastgele ve sistematik hataların tespitini sağlar.
- **Bias:** Kabul edilen referans değer ile beklenen test sonucu arasındaki farklılıktır. Bias analizde yapılan sistematik hataları gösterir. Bias değerinin yüksek çıkması, referans değerden oldukça büyük sapmalar olduğuna ve sistematik hatanın büyüklüğüne işaret eder.
- **Rölatif doğruluk/Relative accuracy (AC):** Aynı örnek hem alternatif hem de referans metot ile analiz edildiğinde, iki sonuç arasındaki uyumun derecesidir.
- **Tespit limiti (LOD):** Metot ile tespit edilebilen ancak gerçek bir değer ölçülemeyen en düşük mikroorganizma miktarıdır.
- **Ölçüm limiti (LOQ):** Laboratuvar koşullarında metot ile tespit edilebilen ve doğru olarak ölçülen en küçük mikroorganizma miktarıdır.
- **Özgüllük:** Analize alınan örnek içerisinde rekabetçi flora olsa dahi metodun hedef mikroorganizma sayısını doğru olarak ölçebilme kabiliyetidir.
- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı koşullar altında (aynı laboratuvar, operatör, cihaz vb.), aynı örneğin aynı metot kullanılarak ardı ardına test edilmesi sonucunda, test sonuçlarının birbirine yakınlığıdır.
- **Tekrarlanabilirlik limiti:** Tekrarlanabilirlik koşulları altında ve %95 güven aralığında iki test sonucu arasındaki kesin farklılıktır.
- **Tekrar üretilebilirlik:** Farklı koşullar altında (farklı laboratuvar, operatör, cihaz vb.), aynı örneğin aynı metot kullanılarak test edilmesi sonucunda, test sonuçlarının birbirine yakınlığıdır.

- **Tekrar üretilebilirlik limiti:** Tekrar üretilebilirlik koşulları altında ve %95 güven aralığında iki test sonucu arasındaki kesin farklılıktır.

2.2.4 Örnek seçimi

Kullanılacak örneğin aranan mikroorganizma ile doğal olarak kontamine olması tercih edilir. Birçok analiz için bu mümkün değildir. Bu durumda dışarıdan mikroorganizma ilave edilmiş (spike) örnekler kullanılır.

2.2.5 Spike örneğin hazırlanması

2.2.5.1 İnokulasyon miktarı

İnokulasyon miktarına karar verirken örneğin doğasına, istenilen minimum tespit sınırına, örnekteki floraya dikkat edilmelidir. Sayısal metotlarda; düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda olmak üzere 3 farklı inokulasyon yapılır. Var/Yok analizlerinde; düşük ve orta nadiren de yüksek inokulasyon yapılabilir. Düşük düzeyde yapılan inokulasyonlar metodun minimum tespit sınırının belirlenmesi amacıyla çok önemlidir. İnokulumda bulunan mikroorganizma sayısının belirlenmesi için McFarland Skalası ya da tüp dilüsyon metodu kullanılmaktadır. Mikroorganizmanın kültür ortamından gelebilecek kirliliği önlemek amacıyla spike örneğin inokulasyon hacmi, 0,1 veya 0,5 ml gibi olabildiğince küçük olmalıdır (Baylis et al., 2001).

2.2.5.2 İnokule edilen mikroorganizmanın kompozisyonu

İnokulasyonlarda tek bir tür ya da suş kullanılır. Spesifite ve sensitivite testlerinde örneklere, aranan mikroorganizmayla beraber yakın kültürler ve/veya alt kültürler kokteyl şeklinde inokule edilir. (Örneğin *L.innocua*). Her iki durumda da rekabetçi flora oluşturulur (Baylis et al., 2001).

2.2.5.3 İnokule edilen mikroorganizmanın saflığının kontrolü

Spike için kültür koleksiyonlarından elde edilen numaralı tür ya da suşlar kullanılır. İnokule edilecek mikroorganizmadan hazırlanan süspansiyonun saflığının ve miktarının örneğe yapılan inokulasyona paralel olarak seçici olmayan besiyerlerine ekilerek kontrol edilmesi gerekmektedir (Baylis et al., 2001).

2.2.5.4 İnokulumun örneğe aşılması (Spike)

- Kuru spike tekniği: Yapay olarak kontamine edilmiş kuru örneklerin diğer kuru örneklerle inokule edilmesi şeklindedir. Ancak kontamine örneğin homojen bir şekilde karışmasına dikkat edilmelidir. İnokulasyonun ardından uygun dilüsyonlar yapılır.
- Yaş spike tekniği: En sık kullanılan yöntemdir. Zarar görmüş mikroorganizmaların, kullanılan analiz yöntemi ile tespit edilip edilemeyeceğinin belirlenmesine olanak sağlar. Hazırlanan broth kültür, sıcaklık ya da pH değişimlerine maruz bırakılarak canlılığı zayıflatılabilir. İşlem şu şekilde gerçekleştirilir:
 - a) Test mikroorganizmanın sıvı kültürü hazırlanır ve spike edilecek örneğe uygun şekilde seyreltilir.
 - b) Örnek matris homojen değilse, aseptik koşullar altında parçalanır.
 - c) Örnek sıvı ise belirli hacimde örneğe direkt olarak, örnek katı ise belirli miktarı dilüsyon sıvısında homojenize edildikten sonra, kültürden uygun hacimde inokule edilir (Baylis et al., 2001).

2.3 Mikrobiyal Stres

2.3.1 Stresin tanımı

Stres ilgili olduğu alana göre farklı anlamlar taşımaktadır. Fizik bilimine göre stres, birim alana uygulanan kuvvet anlamına gelmektedir. Ancak biyoloji alanında stres, suboptimal fiziksel şartlar, toksik kimyasallar ve zararlı besinsel ortamların zorla kabul ettirilmesi anlamına gelmektedir (Neidhardt and Van Bogelen, 2000). Mikrobiyolojide ise, mikroorganizmaların gelişmesi veya üremesini olumsuz yönde etkileyen herhangi bir zararlı faktöre ya da koşula stres adı verilmektedir.

Bir mikroorganizma karşılaşmış olduğu strese, farklı yanıtlar verebilir. Zayıf stres (mild) olarak adlandırılan subletal bir stres bakterilerde canlılığın kaybı ile sonuçlanmasa da büyüme oranında durma veya azalma meydana getirmektedir. Mikroorganizma orta şiddetli (moderate) bir stres ile karşılaştığında mikrobiyal gelişimin durmasının yanında, bakterilerin yaşama kabiliyetlerinde azalma da meydana gelmektedir. Şiddetli (extreme veya severe) stres seviyesi ise

hücreler için ölümcüldür ve bu durum bakteri popülasyonunun çoğunluğunun ölümü ile sonuçlanmaktadır. Gıdalarda bulunan bakteriler, ham maddenin elde edilmesi sırasında kontrol edilemeyen stres faktörleri (radyasyon, kuruma vb) ve hammaddenin işlenmesi esnasında bilinçli olarak uygulanan koruyucu faktörler ile karşılaşabilmektedirler. Gıdanın üretimi ve işlenmesi esnasında mikroorganizmaların maruz kalabilecekleri stresler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Isı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok gibi fiziksel stresler,
2. Asitler, tuzlar ve oksitleyiciler gibi kimyasal stresler,
3. Mikrobiyal metabolitler, antagonizm ve rekabetçi flora gibi biyolojik streslerdir.

Gıdalardaki bakteriler yavaş yavaş artan veya ani streslere maruz kalabilirler. Özellikle ani maruziyet durumlarında “şok” adı verilen durum söz konusu olmaktadır. Örneğin, gıdalar ile birlikte alınan bakteriler mide ortamında ani pH değişikliğine veya asit şokuna maruz kalırlarken, bir gıdanın fermentasyonu esnasında yavaş yavaş azalan bir pH ile karşılaşabilirler (Yousef and Juneja, 2003).

2.3.2 Stres yanıtı

Bir mikroorganizma stresle karşılaştığında, çok farklı şekillerde yanıt oluşturabilir. Duyarlı olduğu stres karşısında bakterilerde membran geçirgenliğinde değişimler (soğuk şoku), hücre protein yapısında değişimler veya ribozomal hasarlar (ısı) ve nükleik asitlerin olumsuz etkilenmesi (radyasyon) gibi hücresel aktiviteleri etkileyen çeşitli değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Moleküler düzeyde, stres yanıtı bazı regülatör proteinlerin sentezi ile sonuçlanan bir dizi transkripsiyonu içermektedir. Bu regülasyon sonucu sentezlenen proteinler ise bakterinin stres koşulları ile başa çıkmasına olanak sağlamaktadır. Strese karşılık oluşan mikrobiyal yanıt aşağıdaki gibi sonuçlanabilir (Yousef and Juneja, 2003);

1. Stres karşısında meydana gelen hasarı onarabilen, hücrenin yaşamını devam ettirebilen veya stres ajanlarını elemine edebilen proteinlerin üretimi,
2. Stres faktörlerine karşı toleransın veya rezistansın kısa sürede şekillenmesi,

3. Hücrenin transformasyona uğrayarak spor veya yaşayabilen fakat kültürü yapılamayan (Viable-But-Not-Culturable, VBNC) duruma geçmesi,
4. Konakçı olduğu organizmanın savunma sisteminden kurtulması,
5. Adaptif mutasyonlar geçirmesi.

2.3.3 Adaptasyon

Mikroorganizmalar strese maruz kaldıkları zaman, koruyucu veya adapte edici yanıt oluşturabilmektedirler. Uygulanan strese karşılık oluşan yanıt, aynı zamanda benzer veya farklı streslere karşı çeşitli seviyelerde adaptasyona (çapraz koruma) neden olabilmektedir. Bu fenomen adaptif yanıt, indüklenmiş tolerans, alışma terimleriyle de tanımlanmaktadır (Yousef and Juneja, 2003).

2.3.4 Tolerans

Tolerans, mikroorganizmaların strese karşı yaşayabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Her mikroorganizma, belli bir strese karşı farklı tolerans seviyesine sahiptir. Örneğin, laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, diğer bakterilere oranla çok daha fazla olabilmektedir. Ayrıca aside adapte edilen bakterilerin asit toleransı daha da artabilmektedir. Bu kavramların anlatımında kullanılan rezistanslık ve tolerans kavramları ise birbirine çok yakın anlamlar içermektedir (Yousef and Juneja, 2003).

2.3.5 Yaralanma

Mikroorganizmalar bir veya birden fazla stres faktörü ile karşılaştığında, duyarlılık gösterebilmekte ve bu durumda hücresel yapılar zarara uğrayabilmektedir. Bu değişikliklere yaygın olarak yaralanma adı verilmektedir. Yaralanma daha çok strese maruz bırakılmış hücrelerde özel bir ajana karşılık duyarlılık şeklinde oluşabilmektedir. Yani strese uğramış hücrelerin maruz bırakıldığı ajan, sağlıklı hücrelere uygulandığında kolaylıkla canlılığını sürdürürken, strese uğramış hücrelerde bu ajan yaralanmalara sebep olabilmektedir (Yousef and Juneja, 2003). Hücrelerdeki yaralanma ve strese adaptasyon kavramları tam olarak karakterize edilememiştir. Fakat yaralanma, bakterinin maruz bırakıldığı strese karşılık oluşan stres yanıtındaki yetersizlik, yanıtaki bir gecikme veya adaptasyon yanıtındaki yetersizlikten kaynaklanabilir. Yaralanmış hücreler, bazen ölmekte bazen de kendini yenileyebilmektedir. Leistner (2000), farklı stres faktörlerine maruz bırakılan bakterilerin enerji

tüketiminin arttığını, metabolik yorgunluk ve hemostazisin bozulması yoluyla bakterilerde ölüme yol açtığını işaret etmektedir.

2.3.6 Stres, adaptasyon ve gıda güvenliği

Gıdalarda bulunan bakteriler hammaddenin üretiminden, ürünün işlenmesine ve sindirilmesi aşamasına kadar birçok stres faktörü ile karşılaşabilmektedir. Gıdanın üretim ortamında güneş ışığından kaynaklanan ultraviyole radyasyon, bakterileri strese uğratabilmekte, yaralanmasına ya da ölümüne neden olabilmektedir. Güneş ışığından kaynaklanan ısı da bakteriler üzerinde stres oluşturabilmektedir. Fermentasyon asitliği, deniz suyunun tuzluluğu, kuru hava diğer stres faktörleri arasında sayılabilir. Bunun yanı sıra bakteriler tarafından üretilen metabolitler de stres yaratabilmektedir. Bakterilerin yaşaması ve üremesi aşamasında esansiyel besin maddelerinin eksikliği/yokluğu, yokluğun süresi ve boyutuna göre yaralanmalara veya ölümlere neden olabilmektedir. Kısacası, doğada bulunan bakteriler farklı şiddetlerde kimyasal, fiziksel ve besinsel streslere maruz kalabilmektedir. Gıdada bulunan bakteriler ise asit, ısı, donma, ozmotik şok, kurutma, oksidasyon ve açlık gibi streslerle karşılaşabilmektedir (Yousef and Juneja, 2003).

Hücre sel yanıtlar, çeşitli tip ve büyüklüklerdeki stres faktörleri ile uyarılabilmektedir. Stres faktörüne karşı ortaya çıkan yanıt, gıda güvenliği açısından oldukça önemlidir. Çünkü strese adapte olmuş hücrelerin benzer (homolog) veya farklı (heterolog) streslere karşı da direnç kazanabileceği bildirilmiştir (Yousef and Juneja, 2003). Direnç kazanmış olan bakteriler, direnç kazanmadan önce kendileri için letal olan ortamlarda yaşayabilmektedir. Isı şokuna maruz bırakılmış hücreler, daha sonradan letal bir ısıya dayanıklı hale gelebilmektedir (Bunning et al., 1990).

Listeria monocytogenes' in zayıf sıcaklığa (45°C'de, 60 dakika) maruz bırakıldıktan sonra letal dozlardaki etanol, hidrojen peroksit ve tuza karşı önemli derecede direnç geliştirdiği saptanmıştır (Lou and Yousef, 1997). Patojen bakterilerde adaptasyon mekanizmalarının uyarılmasının, ilgili patojenlerin hastalık oluşturma kabiliyetlerini arttırdığı da düşünülmektedir.

Geleneksel gıda üretimi esnasında uygulanan aşamalar (örneğin pastörizasyon) çoğunlukla bakterilerin ölmesine neden olmaktadır. Ancak üretim aşamaları esnasında bakteriler zayıf stresli ortamlarla da karşılaşabilmekte ve

adaptasyon mekanizmaları uyarılabilmektedir. Isıya adapte edilmiş (48 °C, 120 dk) *Listeria monocytogenes* suşlarının sosis hamurundaki ısıya karşı dirençlerinin arttığı rapor edilmiştir (Farber and Brown, 1990). Asit adaptasyonu *Listeria monocytogenes*'in yoğurt, portakal suyu ve salata gibi asidik gıdalarda yaşama şansını artırmaktadır (Gahan et al., 1996). Bu durum gıdaların hazırlanışı esnasında bakterilerin maruz kaldıkları zayıf stresler (ısı, asit, tuz vb) karşısında uyarılan adaptasyon mekanizmalarının, gıda güvenliği açısından oluşturduğu tehlikeleri ortaya koymaktadır. Örneğin sosisin fermentasyonu esnasında oluşan asitlik ve formülasyondan gelen tuzun sayesinde patojen bakterilerde asit adaptasyon yanıtı ve ozmotik şok yanıtı uyarılabilmektedir. Sosisin fermentasyonu esnasında asit ve ozmotik şoka karşı adapte olmuş patojenler, pişirme ve dumanlama aşamalarına karşı dirençli hale gelmekte veya ürünün muhafazası aşamasında canlılığını sürdürebilmektedir. Benzer şekilde sütte bulunan bakteriler pastörizasyon sıcaklığı altında ısı işlemine tabi tutulduklarında (bazı peynir türlerinin yapımında olduğu gibi) zayıf bir ısı stresine maruz kalmakta ve adaptasyon kazanmaktadırlar. Ürünün ilerleyen aşamalarında maruz kaldıkları letal sıcaklıklara karşı direnç kazanabilmektedirler. Hammaddeden veya kontaminasyondan kaynaklanan bulaşmalarla dirençsiz halde bulunabilen bakteriler hammaddenin işlenmesi esnasında zayıf stres faktörleri ile karşılaşabilmekte ve adaptif yanıtları uyarılabilmektedir. Bu durumu engellemek için alternatif işleme teknolojilerinin (yüksek basınç, radyasyon, elektrik akımı uygulamaları gibi non-termal teknolojiler) kullanılması tavsiye edilmektedir (Yousef and Juneja, 2003).

Gıda kaynaklı bakterilerin stres koşullarına adapte olmalarının olumlu tarafları da bulunmaktadır. Probiyotik bakteriler (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus acidophilus vb.*) yoğurt ve benzeri asidik ürünlere bilinçli olarak katılmaktadır. Kendilerinde bulunan mevcut adaptif yanıt uyarılarak üründe canlı kalması, hatta mideden geçerek bağırsaklara kadar ulaşması istenmektedir (Yousef and Juneja, 2003).

2.3.7 Strese karşı meydana gelen yanıtın mekanizması

Strese karşılık bakterilerde oluşan tepkiler, ani (şok) yanıtlar ve/veya uzun süreli adaptasyonlar şeklinde olmaktadır. Pek çok durumda ani ve uzun süreli adaptasyon yanıtları benzer şok proteinler aracılığı ile meydana getirilmektedir. Ayrıca genel stres yanıtları bazı özel streslere karşı korunmada yardımcı olabildiği gibi, pek çok strese karşı da çapraz koruma sağlayabilmektedir. Bu durum pek çok

özel ve genel stres yanıtlarının oluşması için gerekli olan proteinlerin birbirine benzemesinden kaynaklanmaktadır (Yousef and Juneja, 2003).

Bakteri hücresi bir stres faktörüne maruz kaldığında eğer genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Uygulanan stres neticesinde bakteri DNA'sında transkripsiyon sonucu mRNA oluşmakta ve bu mRNA ribozomlarda translasyon sonucunda ilgili stresi düzenleyici şok proteinini sentezlemiş olmaktadır. Sentezlenen düzenleyici şok proteini bakterinin fizyolojisini etkileyerek, uygulanan stres ile mücadele etmesini sağlamaktadır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktörüne karşı da etkili olabilmektedir. Hatta bir bakterinin farklı gelişim evrelerinde (lag faz, log faz, stasyonier faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (Yousef and Juneja, 2003).

2.3.8 Genel stres yanıtı

Genel stres yanıtı, çeşitli stres faktörleri ile aktive edilebildiği gibi çoklu stres faktörleri tarafından da uyarılabilir. Genel stres yanıtının aktive edilmesi, genellikle gelişme oranındaki yavaşlama veya stasyonier faza geçiş esnasında meydana gelmektedir (Arsene et al., 2000). Gram (+) bakterilerde stres yanıtı, σ^B tarafından kontrol edilmektedir. σ^B tarafından uyarılmış genlerin DNA onarımını ve osmoprotektan alımını sağladığı ve böylece ozmotik ve oksidatif streslere hücreyi hazırladığı bildirilmiştir (Cronan, 2002).

2.3.9 Özel stres yanıtları

2.3.9.1 Sıcaklık

Gıda kaynaklı bakteriler gıdaların işlenmesi veya korunması amacıyla yapılan işlemler sırasında sık sık ısıya maruz kalmaktadır. Sıcaklık hücresel komponentlerde makro moleküler hasar meydana getirmektedir. Sıcaklık ile sentezlenen stres proteinleri, oluşan hasarı onarır veya hasarlı komponentleri yıkımlar. Pek çok ısıl işlem ile uyarılmış stres proteinleri, ısı hasarına uğramış proteinleri toplamakta ve hücrenin bu hasarlı proteinler ile mücadele etmesine yardımcı olmakta (GroEL ve DnaK vb.) veya hasara uğramış protein miktarını (Lon ve ClpAP vb.) azaltmaktadır (Hill and Gahan, 2000). Bu değişikliklere ek olarak bazı bakterilerde hücre membranında trans-cis yağ asidi oranı

değişmektedir. Bu yapısal değişiklik ortam sıcaklığı arttığında membran akışkanlığını azaltmaktadır (Cronan, 2002).

2.3.9.2 Soğuk

Soğuk stresi sonucu bakterilerde, membran akışkanlığını optimize etmek için membran yağ asidi kompozisyonunda değişiklikler (Russel et al., 1995), çift zincirli nükleik asit üzerindeki soğüğün etkisini stabilize eden DNA ve RNA' ya bağlı proteinlerin sentezi (Phadtare et al., 1999) ve sitoplazma ile uyumlu maddelerin hücre içine transferi şeklinde fiziksel değişiklikler meydana gelmektedir. Soğuk yanıtında meydana gelen protein sentezi, Csps (Soğuk şoku proteinleri - Cold shock proteins) veya Caps (Soğuk şoku alıştıırma proteinleri - Cold shock acclimation proteins) diye sınıflandırılmaktadır. Csps hızlı, fakat soğuk yanıtında geçici olarak sentezlenir. Caps düşük sıcaklıklarda, çoğalma esnasında sentezlenir ve çabuk uyarılırlar (Phadtare et al., 1999). Sıcaklık düşürüldüğü zaman bütün hücrelerde çift katmanlı fosfolipid membranların akışkanlığı azalmaktadır. Optimum akışkanlığı sürdürmek için hücreler membranlarındaki doymamış yağ asidi miktarını fazlalaştırır veya membran yağ asitlerinin uzunluklarını azaltarak düşük sıcaklıklarda akışkanlığı arttırırlar (Russel et al., 1995).

2.3.9.3 Asit

Gıda kaynaklı bakteriler, konakçı hücrelerde, gastro-intestinal kanalda ve gıdalarda organik veya inorganik asitler ile karşılaşmaktadır. Bakteriler asit stresine, DNA'yı tamir eden enzimlerin uyarılması, amino asit katabolizmasının artırılması, proton pompasının artırılması ve hücre membranındaki kompozisyon değişikliklerini içeren pek çok yolla karşılık vermektedirler (Yousef and Juneja, 2003). Pek çok bakteri subletal bir pH'da uyarılan (koruyucu proteinlerin sentezlenmesi) ve düşük pH'larda yaşamı sağlayan asit tolerans yanıtı (Acid Tolerance Response – ATR) olarak adlandırılan bir sisteme sahiptir. ATR, bakteri türleri arasında çok farklı düzeylerde olduğu gibi, aynı bakterinin fizyolojik fazları (gelişim-stasyonel faz) arasında bile farklılık bulunmaktadır. Asit şoku ile indüklenen yanıt, hücre içi veya hücre dışı pH'nın değişimiyle uyarılabilir.

L. monocytogenes'in sahip olduğu ATR mekanizması uzun yıllardan beri bilinmektedir, fakat son zamanlarda suşları arasındaki aside dirençlilik minimum seviyeleri arasında önemli derecede fark olduğu anlaşılmıştır (Dykes and

Morrhead, 2000). Diğer Gram (+) bakteriler gibi *L. monocytogenes* de, hücre içi pH dengesini korumayı FOF1-ATPase proton pompası mekanizmasını kullanıp, sitoplazmasından protonları pompalayarak sağlamaktadır (Merrel and Camili, 2002). *L. monocytogenes*'in stasyonere fazdaki hücreleri, pH 3,5'deki ortamlara karşı doğal dirence sahiptir. Ancak log fazında bulunan hücrelerinin pH 3,5'e dirençli olabilmeleri için, asit adaptasyonun zayıf pH'da indüklenmesi gerekir (O'Driscoll et al., 1996). Tüm adaptasyonlarda olduğu gibi, buradaki adaptasyonda da protein sentezine (şok proteinleri) gereksinim vardır. Aynı zamanda asit adaptasyonunun uyarılması, *L. monocytogenes* hücrelerini birçok çevresel faktöre karşı da korumaktadır. Aside adapte hücrelerde termal stres, ozmotik stres, kristal violet ve etanole karşı toleransın arttığı saptanmıştır. Ayrıca aside adapte ve çevreden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının farelere intraperitoneal enjeksiyonu sonucu, asit adapte suşların, adapte olmayan suşlara göre virulansının arttığı bildirilmiştir (O'Driscoll et al., 1996).

L. monocytogenes, *E. coli* tarafından kullanılan glutamat dekarboksilaz mekanizmasına benzer bir ATR sisteminden yararlanmaktadır. Bu mekanizmayı *gadA*, *gadB*, *gadC* genleri kodlamaktadır. Glutamat dekarboksilaz mekanizmasını kodlayan *gadB*, asitle uyarılması sonucu mekanizmayı başlatır. Bu mekanizmadaki bir diğer gen olan *gadA*'nın da, glutamat dekarboksilazı kodladığı saptanmıştır. Diğer gen *gadC*'nin ise hücre içine yetecek kadar glutamat dekarboksilaz sentezini kodladığı belirlenmiştir. Bu gen (*gadC*) asit ile indüklenmez ve her zaman düşük seviyelerde mekanizmayı çalıştırır (Merrel and Camili, 2002). Glutamat dekarboksilaz metabolizmasını kodlayan bu üç gende yapılan mutasyonlar sonucu, *L. monocytogenes* hücrelerinin sentetik mide sıvısından geçerken (yaklaşık 4 saatte) yaşama kabiliyetinin kaybolduğu saptanmıştır. Bu sonuç, *L. monocytogenes*'in mideden geçişi esnasında ve çok düşük pH şartlarında hayati fonksiyonlarını kaybetmemesi için, glutamat dekarboksilaz metabolizmasının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Merrel and Camili, 2002).

L. monocytogenes üzerine yapılan son çalışmalarda, *lisRK* geni tarafından kodlanan iki ögeli sinyal transdüksiyon sistemi tanımlanmıştır ve bu sistemin *L. monocytogenes*'in virulansı ve strese toleransı için çok önemli olduğu belirlenmiştir. İki ögeli sinyal transdüksiyon sistemini kodlayan *lisRK* geninin çıkarılması, *L. monocytogenes* suşlarının log fazında asit stresine karşı duyarlılığıyla sonuçlanmıştır (Merrel and Camili, 2002).

2.3.9.4 Ozmotik Stres

Bakteriler gıdaların içerisinde yüksek şeker ve tuz gibi veya kurutulmuş ürünlerde olduğu gibi çeşitli ozmotik streslere maruz bırakılırlar. Bu durumlarda özellikle turgor basıncı (şişme) ve hidrasyon (su kaybetme) bakteriler için çok önemlidir. Bu mekanizma bakterilerde ara sıra oluşan hiperozmotik durumlarda veya orta şiddetli ozmotik şartlarda ortaya çıkmaktadır (Yousef and Juneja, 2003).

Hiperozmotik şartlar altındaki bakterilerde en iyi karakterize edilen metabolizma hücre içi ozmolit olarak adlandırılan maddelerin birikimidir. Uyumlu sıvıların (compatible-solute) birikimi, sentez yoluyla sağlandığı gibi, hücre dışından transfer şeklinde de gerçekleşebilmektedir. Bu sıvılar polar (kutupsal) yapıdadır ve yüksek derecelerde hücre içinde çözülebilen bileşiklerdir. Çok yüksek konsantrasyonlarda bile hücresel fonksiyonları etkilemeden ozmotik basınç ile mücadele edebilirler. Glycine betain, proline, ectoine, carnitine, choline ve trehalose en yaygın bilinen uyumlu maddelerdir (Bremer and Krämer, 2000).

2.3.9.5 Oksidatif Stres

Gıdalarda bakteriler, süper oksit, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerine maruz kalabilirler. Bu gibi çeşitli oksidantlar nükleik asit, lipid, hücresel proteinlerde zarara neden olurlar. Oksidatif stres tarafından indüklendiği bilinen pek çok protein antioksidant rol oynarlar. Diğerleri ise özellikle nükleik asit hasarı başta olmak üzere oksidatif hasarı onarmak için gereklidirler (Yousef and Juneja, 2003).

2.3.10 Çapraz koruma

Strese adapte bakteriler benzer veya farklı streslere karşı da adaptasyon kazanabilirler. Bir strese karşı adaptasyon esnasında, başka bir strese karşı da dirençlilik oluşması, çapraz koruma (cross protection) olarak adlandırılmaktadır.

Lou and Yousef (1996), gelişim fazındaki *Listeria monocytogenes* hücrelerinde belirli çevresel stresler üzerine subletal sıcaklığın (45°C'de, 1 saat) etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda subletal sıcaklık uygulanmış hücrelerin, normalde letal dozda olan hidrojen peroksit, etanol ve NaCl'ye karşı rezistanslığının arttığını ve böylece çapraz koruma sağlandığını bulmuşlardır.

Listeria monocytogenes'den korunmak amacıyla laktik asit bakterileri tarafından üretilen nisin, pediocin gibi bakteriyosinler kullanılmaktadır. Bonnet and Montville (2005), ATR sistemine sahip olan ve olmayan *Listeria monocytogenes* suşlarını, nisin üreten laktik asit bakterileri ile fermentasyona tabi tuttuklarında, ATR sistemine sahip olan suşların (2 suş) 60. güne kadar canlı kaldıklarını (ort 2.00 log₁₀ kob/g), ATR sistemine sahip olmayan suşların 3 gün içerisinde tespit edilebilir seviyenin altına düştüklerini saptamışlardır.

2.3.11 Gıdalarda patojenlerin stres adaptasyonu

Mikroorganizmalar üzerine laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, halen tartışılmaktadır. Çünkü genellikle tek veya birkaç stres tipine karşı bakterilerin davranışı incelenmektedir. Hâlbuki gıda ortamında mikroorganizmalar, birden daha fazla stres faktörü ile karşı karşıya kalmaktadırlar.

Faleiro et al. (2003), Portekiz peynirinden elde edilen (%2 NaCl(w/v), pH 5,1-6,2) 4, etten elde edilen 2 ve balıktan elde edilen 1 adet listeriozise neden olmuş toplam 7 klinik izolatanın, dış etkilere karşı vermiş oldukları tepkiyi araştırmışlardır. Araştırma sonucunda NaCl'ye karşı her suşun farklı tepkiler gösterdiği, fakat peynirden elde edilen izolatların diğerlerine göre daha toleranslı olduğu saptanmıştır. Ancak suşların tümüne bakıldığında, NaCl duyarlılığıyla gıda maddesinde bulunan NaCl miktarı arasında bir ilişki bulunmamıştır. Peynir yapımı aşamasında ilk olarak pH'nın düşmesi, NaCl'ye karşı da bir tolerans oluşmasına neden olabilir. Yapılan çalışmada buna dayanarak peynir örneklerinden alınan 4 izolata pH 5,5'de asit stresi uygulandıktan sonra %20 NaCl solüsyonu içerisine bırakılmıştır. Deneyin sonucunda peynirden elde edilen izolatların asit stresi sonrası ozmotik stres koşullarında canlı kalma süreleri, asit uygulamasından sonra önemli ölçüde (p<0,05) artmıştır. Ancak etten alınan izolatlarda varyasyon çok fazla bulunmuştur. Balıktan alınan izolatanın ise asit uygulamasından sonra, diğer suşlara göre daha uzun süre (p<0,05) canlı kaldığı deneylerle saptanmıştır. Ayrıca peynirden elde edilen izolatların 30°C ve 8°C muhafaza sıcaklığında, pH 5,5 ve üzerinde gelişebildiği saptanmıştır. Çalışmada et ve peynirden elde edilen 4 izolatta, ozmoadaptasyon sayesinde aside dirençliliklerinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca peynir üretimindeki safhaların *L. monocytogenes* hücrelerini öldürmediği, tam tersine aside ve tuza karşı oluşan toleransı artırdığı saptanmıştır.

Bir grup araştırmacı, et kombinasında bulunan doğal floranın, aynı ortamda bulunan patojenlerin hayatta kalmasını, gelişimini ve aside dayanıklılık tepkisini etkileyebileceğini düşünmüşlerdir. Bu varsayımı araştırmak için, yıkama suyuna inoküle edilmiş (5,00 log₁₀ kob/ml) *L. monocytogenes* popülasyonundaki değişimler, önceden filtre ile sterilize edilmiş veya edilmemiş 35°C suda veya patojenle kontamine %2 asetik/laktik asitli suyla karkas yıkanması yoluyla değerlendirilmiştir (Samelis et al., 2001). İnoküle edilmiş *L. monocytogenes*'lerin asitli yıkama suyunda 24 saat içinde öldüğü saptanmıştır. Asitsiz yıkama suyunda patojenlerin, hakim olan doğal florayla (>8 log₁₀ kob/ml) ilgisi olmaksızın ortalama 1-2 log₁₀ kob/ml sayısının arttığı saptanmıştır. Doğal florada bulunan ya da bulunmayan, patojenle kontamine yıkama sularının pH'sının artmış veya azalmış olduğu saptanmıştır. Ancak bu pH değişimlerinin *L. monocytogenes*'in ATR'sini zayıflattığı anlaşılmıştır. Filtre edilmeyen yıkama suyunda patojen 1. gün aside dayanıklılık gösterirken, 8. günde aside duyarlı hale geldiği belirlenmiştir. Filtre edilerek yapılan yıkamalar sonucunda patojenlerin yaşamının (1. günden 8. güne kadar) ortalama 1 log₁₀ kob/ml arttığı ve ATR' sinin değişmediği saptanmıştır. Bu çalışmalarla araştırmacılar, aerobik taze et işleme ortamına hakim olan Gram (-) floranın, bakteriyel patojenleri aside karşı duyarlı hale getirebileceğini öne sürmüşlerdir.

Gahan et al. (1996), cottage peyniri (pH 4,71), yoğurt (pH 3,9), az yağlı (pH 5,25) ve yağlı (pH 5,16) çedar peyniri gibi asidik gıdalarda, aside adapte ve adapte olmayan *L. monocytogenes* hücrelerinin (LO28, ATM56 suşları) yaşamlarını araştırmışlardır. Her üç asidik süt ürünüde de *L. monocytogenes*'in asit adaptasyonunun arttığı saptanmıştır. Yapılan çalışmada, cottage peyniri (pH 4,71), yoğurt (pH 3,9), yağlı çedar peyniri (pH 5,16) ve az yağlı çedar peynirinde aside adapte olmayan ATM56 suşunun daha dayanıklı olduğu saptanmıştır. Az yağlı çedar peynirinin 70 günlük muhafaza sonrasında, patojen suşlar arasında sadece ATM56'nın varlığı tespit edilmiştir. Mozzarella peynirinde de (pH 5,6) *Listeria* suşlarının aside dayanıklılığının arttığı belirlenmiştir.

2.3.12 *Listeria monocytogenes*'in stres proteinleri

L. monocytogenes'in zor çevre koşullarında, konak içinde ve dışında üremesini sağlayan birçok stres proteini vardır. LisRK transdüksiyon sistemi, patojenin virulansıyla birlikte asit ve etanole tolerans, ayrıca oksidatif strese adaptasyonu ile ilişkilidir (Kallipolitis and Ingmer, 2001). VirR, *L.*

monocytogenes'in virulansını kontrol eden yüzey bileşenlerinin modifikasyonlarını düzenlemektedir (Mandin et al., 2005).

DnaK ısı şoku proteini, yüksek sıcaklıklarda, asidik ortamlarda ve makrofajlarca fagositoz esnasında *L. monocytogenes*'in canlılığını sürdürmesini sağlamaktadır (Hanawa et al., 1999). GroES ve GroEL bakterinin en önemli ısı şoku proteinleri olup yüksek sıcaklıklarda, düşük pH değerlerinde ve hücre enfeksiyonunda görev almaktadır (Gahan et al., 2001).

L. monocytogenes'in en önemli soğuk şoku genlerinin *cspA*, *cspB* ve *cspC* olduğu ve bu genler sayesinde patojenin düşük sıcaklıktaki ortamlara adaptasyon sağladığı bildirilmiştir (Rees and Barnard, 2001). Ayrıca *ItrA*, *ItrB* ve *ItrC* genlerinin *L. monocytogenes*'in düşük sıcaklıkta (4°C) üremesi için gerekli olduğu ortaya konmuştur (Zheng and Kathariou, 1997).

ClpC, ClpE ve ClpP stres proteinleri demir noksanlığında, yüksek sıcaklıkta, yüksek ozmolaritede ve hücre içerisinde *L. monocytogenes*'in canlılığını sürdürmesini sağlamaktadırlar (Gaillet et al., 2000; Nair et al., 1999; Rouquette et al., 1998).

Ozmotik strese adaptasyon, *BetL*, *GbuABC*, *OpuB*, *OpuC* ve *OppA* gibi ozmolitlerin hücre içi akümülyasyonuna bağlı olarak şekillenmektedir (Sleator et al., 2003). *L. monocytogenes*'in bağırsak ve karaciğerde canlılığını sürdürmesini sağlayan safra tuzlarına tolerans özelliği *Bsh* enzimi sayesinde olmaktadır (Dussurget et al., 2004).

Sigma B faktörü, *L. monocytogenes*'in konak dışında uygun olmayan koşullarda (asit, ozmotik ve oksidatif stres, düşük sıcaklık ve karbon eksikliği) canlılığını sürdürmesini ve üremesini sağlamaktadır (Ferreira et al., 2003).

Çizelge 2.5 *Listeria monocytogenes*'in stres proteinleri (Chaturongakul et al., 2008)

Protein Adı		Proteinin Fonksiyonu
LisRK	Stres proteini	Asit, etanol ve oksidatif strese tolerans
VirR	Virulans proteini	Yüzey bileşenlerinin modifikasyonu
DnaK	Isı şoku proteini	Yüksek sıcaklık ve pH'ya direnç
GroES, GroEL	En önemli ısı şoku proteinleri	Yüksek sıcaklık ve pH'ya direnç
CspA, CspB, CspC	Soğuk şoku proteini	Düşük sıcaklığa adaptasyon
LtrA, LtrB, LtrC	Düşük sıcaklık proteinleri	Düşük sıcaklıklarda üreme yeteneği
ClpC, ClpE, ClpP	Stres proteinleri	Demir noksanlığına, yüksek sıcaklığa ve yüksek ozmolariteye direnç
BetL	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
GbuABC	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
OpuB, OpuC	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
OppA	Stres proteini	Yüksek ozmolariteye direnç
Bsh	Enzim	Safra tuzlarına tolerans
Sigma B	Stres proteini	Asit, ozmotik ve oksidatif strese direnç Düşük sıcaklık ve karbon eksikliğine tolerans

2.3.13 Stres ve virulans arasındaki ilişki

Gıda kaynaklı bakteriler, gıdalar ile mideden geçişleri sırasında, ince bağırsaklardaki geçici kolonizasyonları esnasında ve konakçı hücre fagozomları içerisinde organik ve inorganik asitlere maruz kalmaktadırlar (Gahan and Hill, 2003). Daha önceden maruz kaldıkları subletal streslerle aktif hale gelen adaptasyon mekanizmaları, bu bakterilerin hayatta kalma şanslarını arttırmaktadır. Oluşan yanıt, gıda kaynaklı patojen bakterilerin düşük pH'lardaki gıdalarda yaşamına katkıda bulunmaktadır. Çalışmalarda düşük pH'da yaşama yeteneğinin, virulans potansiyeline de katkıda bulunduğu belirtilmiştir.

Listeria monocytogenes, insan ve hayvan hücrelerine invaze olan ve hücre içinde çoğalabilen fakültatif hücre içi, patojen bir bakteridir (Drevets, 1998). *L. monocytogenes*'in bazı genleri, hücresel invazyonu ve hücre içi parazitliği sağlamaktadır (Portnoy et al., 1992). Bunlar prfA geninin regüle ettiği virulans

gen grubu olup, bu gen grubunun üyeleri plcA, plcB, hlyA, mpl, actA ve invazyon genlerinden inl olarak bilinmektedir (Chakraborty et al., 1992).

Listeria monocytogenes üzerine yapılan bir çalışmada, aside adapte edilmiş suşların adapte olmayanlara göre biyofilm oluşturma yeteneklerinin ve bu suşların Caco-2 hücrelerine (insana ait kolon karsinoma hücresi) invazyon yeteneğinin arttığı rapor edilmiştir (Cataldo et al., 2007). Ayrıca süt ürünleri içerisindeki tuz oranının invazyon etkisini azalttığı, fakat aside adapte *L. monocytogenes* suşlarının %10 tuzlu süt ürünlerindeki düşük invazyon etkisinin bile, adapte olmamış suşlara göre çok yüksek olduğu saptanmıştır (Cataldo et al., 2007). Bu veriler ışığında asit adaptasyonun virulans potansiyeli üzerine etkisinin önemli olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 2.6 *Listeria monocytogenes*'in virulans genleri (Chaturongakul et al., 2008)

Genin Adı	Kodladığı protein	Genin Fonksiyonu
prfA	Positive Regulatory Factor A	Virulans genlerinin transkripsiyonu
plcA	Phosphatidylinositol specific phospholipase C	Vakuolden kaçış
plcB	Phosphatidylinositol specific phospholipase C	Hücreden hücreye geçiş
hlyA	Hemolysinlisteriolysin A	Vakuolden kaçış
mpl	Zinc dependent metalloprotease	Plc'nin aktivasyonu
actA	Actin polymerizing protein	Hücreden hücreye geçiş
inlA	İnternalin A	Hücreye penetrasyon
inlB	İnternalin B	Hücreye penetrasyon

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan gıda örnekleri

Kırmızı Et ve Et Ürünleri: Çiğ dana ve kuzu eti, kıyma, hazırlanmış çiğ kırmızı et ürünleri, sucuk, salam, sosis, domuz ürünleri

Kanatlı Eti ve Et Ürünleri: Çiğ bütün piliç, kanat, baget, incik, fileto ve ısıtılmış görmüş kanatlı etleri

Balık ve deniz ürünleri: Balık, karides, kalamar, midye

Süt ürünleri: Peynir, dondurma, krema, kaymak, süt tozu

Bitkisel ürünler: Kurutulmuş soğan, sarımsak, havuç, maydanoz, doğranmış marul

Tüketime hazır ürünler: Mezeler, hazır yemekler, salatalar, sütlü tatlılar

3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

3.1.2.1 Half Fraser Broth (Merck 1.10398)

Proteose peptone	5,0 g/L
Peptone from casein	5,0 g/L
Yeast extract	5,0 g/L
Meat extract	5,0 g/L
NaCl	20,0 g/L
Na ₂ HPO ₄	9,6 g/L
KH ₂ PO ₄	1,35 g/L
Esculin	1,0 g/L
Lithium chloride	3,0 g/L

Selektif ön zenginleştirme aşamasında kullanılmak üzere, hazır besiyerinden 55 g tartılarak 1000 ml distile suda çözündürülür ve pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra üzerine 1'er ml steril distile su ile süspansiyon edilmiş 1 ampul amonyum demir (III) sitrat ve 1 ampul Fraser Supplement ilave edilerek karıştırılır.

3.1.2.2 Fraser Broth (Merck 1.10398)

Proteose peptone	5,0 g/L
Peptone from casein	5,0 g/L
Yeast extract	5,0 g/L
Meat extract	5,0 g/L
NaCl	20,0 g/L
Na_2HPO_4	9,6 g/L
KH_2PO_4	1,35 g/L
Esculin	1,0 g/L
Lithium chloride	3,0 g/L

İkinci zenginleştirme aşamasında kullanılmak üzere, hazır besiyerinden 55 g tartılarak 1000 ml distile suda çözündürülür ve pH değeri $7,0\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra üzerine 1'er ml steril distile su ile süspansiyon edilmiş 1 ampul Ammonium iron (III) citrate ve 2 ampul Fraser selektif katkı ilave edilerek karıştırılır. Steril deney tüplerine aseptik koşullarda 10'ar ml transfer edilir.

3.1.2.3 Fraser Listeria Supplement (Merck 1.10399)

Ammonium iron (III) citrate	500 mg/ 1 ampul
-----------------------------	-----------------

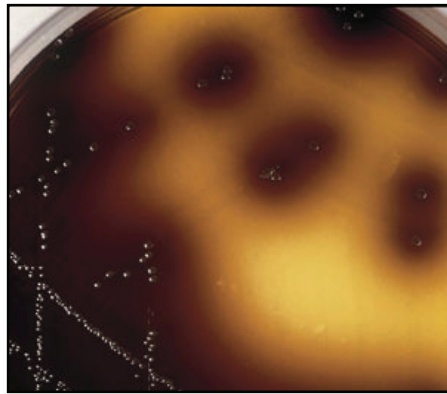
Acriflavine	12,5 mg/ 1 ampul
Nalidixic acid	10 mg / 1 ampul

Ammonium iron (III) citrate ve selektif katkı bulunan ampul içeriğine 1'er ml steril distile su ilave edilir. Vorteks yardımıyla homojen olarak karışması sağlanır.

3.1.2.4 Oxford Agar (Merck 1.07004)

Peptone	23,0 g/L
Starch	1,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar-agar	13,0 g/L
Esculin	1,0 g/L
Ammonium iron (III) citrate	0,5 g/L
Lithium chloride	15,0 g/L

Dehidre besiyeri, 29,25 g/500 ml olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritilir ve otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45°C'a soğutulup üzerine 1 şişe selektif katkı (Oxford Listeria Selective Supplement; Merck 1.07006) ilave edilir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılıp steril petri kaplarına 12,5'er ml dökülür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Listeria monocytogenes* Oxford Agar

3.1.2.5 Oxford Listeria Selective Supplement (Merck 1.07006)

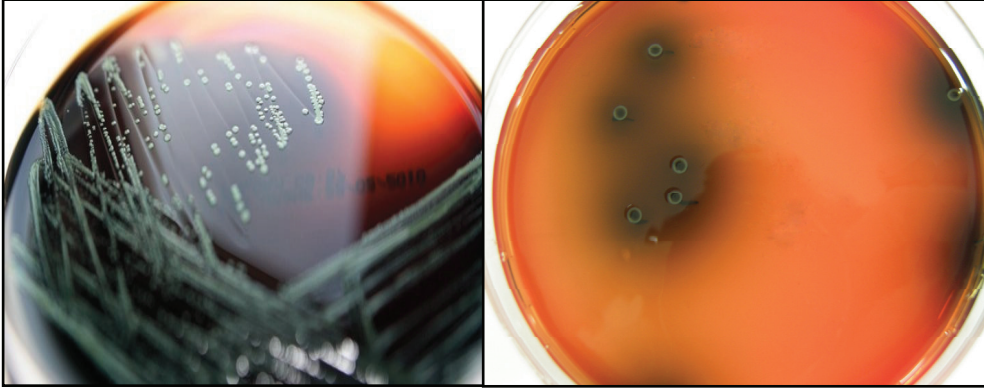
Cycloheximide	23,0 mg
Colistin sulfate	1,0 mg
Acriflavin	5,0 mg
Cefotetan	13,0 mg
Fosfomycin	1,0 mg

Ampul içeriğine 2,5 ml steril distile su ve 2,5 ml etil alkol ilave edilir.
Vorteks yardımıyla homojen olarak karışması sağlanır.

3.1.2.6 Palcam Agar (Merck 1.11755)

Peptone	23,0 g/L
Yeast extract	3,0 g/L
Starch	1,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar-agar	13,0 g/L
D(-) Mannitol	10,0 g/L
Esculin	1,0 g/L
Ammonium iron(III) citrate	0,5 g/L
Esculin	0,8 g/L
Glucose	0,5 g/L
Lithium chloride	15,0 g/L
Phenol red	0,08 g/L

Dehidre besiyeri, 35,9 g/500 ml olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritilir ve içinde manyetik balık ile birlikte otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışı 45°C'a soğutulup üzerine 1 ml steril distile su içinde çözülmüş 1 şişe selektif katkı (Palcam Listeria Selective Supplement; Merck 1.12122) ilave edilir. Manyetik karıştırıcı ile selektif katkı homojen bir şekilde dağıtılıp steril petri kutularına 12,5'er ml dökülür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 *Listeria monocytogenes* Palcam Agar

3.1.2.7 Palcam Listeria Selective Supplement (Merck 1.12122)

Polymixin B Sulfate	5,0 mg
Ceftacidim	10,0 mg
Acriflavine	2,5 mg

Ampul içeriğine 1 ml steril distile su ilave edilir. Vorteks yardımıyla homojen olarak karışması sağlanır.

3.1.2.8 Tryptic Soy CASO Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Peptone from casein	15,0 g/L
Peptone from soymeal	5,0 g/L
Sodium chloride	5,0 g/L
di-potassium hydrogen phosphate	5,0 g/L

Dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir ve steril petri kutularına 12,5'er ml dökülür.

3.1.2.9 Tryptic Soy CASO Agar (TSA) (Merck 1.05458)

Peptone from casein	17,0 g/L
Peptone from soymeal	3,0 g/L
D(+)-glucose	2,5 g/L
Sodium chloride	5,0 g/L
Di-potassium hydrogen phosphate	2,5 g/L

Dehidre besiyeri, 30,0 g/L olacak şekilde distile su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir.

3.1.2.10 Tryptic Soy Broth – Yeast Extract (TSBYE) (Merck 1.05459)

Peptone from casein	15,0 g/L
Peptone from soymeal	5,0 g/L
Sodium chloride	5,0 g/L
di-potassium hydrogen phosphate	5,0 g/L
Yeast extract	6,0 g/L

Tryptic Soy CASO Broth' tan 20,0 g , Yeast Extract'tan 3,0 g tartılarak 500 ml distile suda çözülür ve pH değeri $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C'ye soğutulur.

3.1.2.11 Tryptic Soy Agar – Yeast Extract (TSAYE) (Merck 1.05458)

Peptone from casein	17,0 g/L
---------------------	----------

Peptone from soymeal	3,0 g/L
D(+)-glucose	2,5 g/L
Sodium chloride	5,0 g/L
di-potassium hydrogen phosphate	2,5 g/L
Yeast extract	6,0 g/L

Tryptic Soy CASO Agar'dan 15,0 g, Yeast Extract'tan 3,0 g tartılarak 500 ml distile suda çözülür ve pH değeri $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C 'ye soğutulur.

3.1.2.12 Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Merck 1.10493)

Peptone from casein	27,5 g/L
D(+)-glucose	2,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Na ₂ HPO ₄	2,5 g/L

Hazır besiyerinden 18,5 g tartılarak 500 ml distile suda çözündürülür ve pH değeri $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

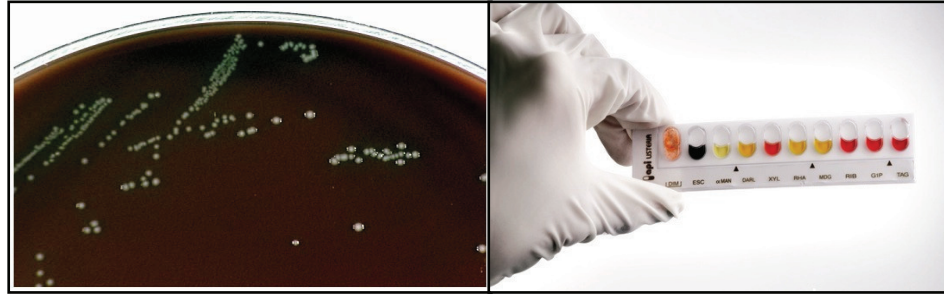
3.1.2.13 Phosphate Buffer Saline (PBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
distilled H ₂ O	800 ml

Tüm kimyasallar 800 ml didistileH₂O içerisinde çözülür. HCl ile pH 7,4'e ayarlanır. Son hacim didistileH₂O ile 1 L'ye tamamlanır. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

3.1.2.14 Blood Agar (Merck 1.10886)

Heart extract and peptones	20,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar agar	5,0 g/L
Sheep blood	%5



Şekil 3.3 *Listeria monocytogenes* Kanlı Agar ve Api Listeria Kit

Hazır besiyerinden 20,0 g tartılarak 500 ml distile suda çözülür ve pH 6,8±0,2'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C'ye soğutulduktan sonra içerisine steril %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilir (Şekil 3.3).

3.1.2.15 SIM Medium (Merck 1.05470)

Peptone from casein	20,0 g/L
Peptone from meat	6,6 g/L
Ammonium iron (II) citrate	0,2 g/L
Sodium thiosulfate	0,2 g/L
Agar agar	3,0 g/L

Hazır besiyerinden 15,0 g tartılarak 500 ml distile suda çözülür ve pH değeri $7,3\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra deney tüplerine 10'ar ml transfer edilip 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri dik olarak soğutulur.

3.1.2.16 % 85'lik NaCl (Fizyolojik Tuzlu Su)

NaCl	0,42 g
Distile su	500 ml

Belirtilen miktarda NaCl distile su içerisinde tamamen çözülür ve otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edilir.

3.1.3 Kullanılan kitler

3.1.3.1 Vidas *Listeria monocytogenes* kit içeriği

SPR	SPR'lerin iç kısmı <i>L. monocytogenes</i> spesifik antijenlerine karşı yönlendirilmiş antikorlar ile kaplıdır
S1	Saflaştırılmış <i>L. monocytogenes</i> antijeni + koruyucu + protein stabilizörleri
C1	Saflaştırılmış <i>L. monocytogenes</i> antijeni + koruyucu + protein stabilizörleri
C2	TRIS tamponlanmış tuz (TSB) (150 mmol/L) – Tween pH 7,6 + koruyucu

3.1.3.2 Vidas *Listeria monocytogenes* strip içeriği

Ön yıkama solüsyonu (400 μl): TRIS – NaCl (150 mmol/L) – Tween pH 7,6 + koruyucu.

Yıkama Tamponu (600 μl): TRIS – NaCl (150 mmol/L) – Tween pH 7,6 + koruyucu.

Konjugat (400 μl): Alkalen fosfotaz-işaretli-*Listeria monocytogenes* antikorları + koruyucu

Substrat ile birlikte okuma kuvveti (300 μ l): 4-Metil-umbelliferil fosfat (0,6 mmol/L) + dietanolamin (DEA) (0,62 mol/L veya %6,6; pH 9,2) + koruyucu

3.1.3.3 Bax sistem kit içeriği

Lizis tamponu (12 ml – 2 Şişe)

Proteaz (400 μ l)

Tabletli Polimeraz Zincir Reaksiyon tüpleri (96)

Tabletli Polimeraz Zincir Reaksiyon tüpleri için optik kapaklar (96)



Şekil 3.4 *Listeria monocytogenes* Dupont (a) ve Vidas (b) Test Kitleri

3.1.3.4 Api Listeria kit içeriği

Api Listeria sribi	10 biyokimyasal strip
Suspension Medium	10 ampul (2 ml) demineralize su 1 ampul (8 ml) Fast Blue BB 0,12 g,
ZYM B reaktifi	Methanol 40 ml, Dimethylsulfoxide (DMSO) 60 ml

3.1.4 Kullanılan boyalar

3.1.4.1 Gram'ın Kristal Violet Boyası

Kristal Violet	2,0 g
Etil Alkol (%95'lik)	20 ml
Amonyum oksalat	0,8 g
Distile su	80 ml

20 ml etil alkolde 2,0 g Kristal violet çözülür. 80 ml distile suda da 0,8 g amonyum oksalat çözüldükten sonra bu çözeltiye alkolde çözülmüş olan kristal violet ilave edilerek karıştırılır. Hazırlanan bu boya çözeltisi, gram boyama işleminde kullanılır.

3.1.4.2 Gram'ın Safranin Boyası

Safranin	0,25 g
Etil Alkol (%95'lik)	10 ml
Distile su	1000 ml

Safranin etanolde çözüldükten sonra distile su ilave edilerek iyice karıştırılır. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek gram boyama işlemlerinde kullanılır.

3.1.4.3 Gram İyodür Çözeltisi

İyot	1,0 g
Potasyum iyodür	2,0 g
Distile su	300 ml

İyot ve potasyum iyodür, havanda toz haline getirildikten sonra distile su yavaş yavaş ilave edilerek iyice karıştırılır. Elde edilen bu çözelti gram boyama işlemlerinde kullanılır.

3.1.4.4 %95'lik Etanol

Etil Alkol	95 ml
Distile su	5 ml

Belirtilen miktarda distile su ile karıştırılarak hazırlanan %95'lik etanol çözeltisi organizmaların gram boyamalarında kullanılır.

3.1.5 Kullanılan cihazlar

Otoklav	Hmc Europe HV-50L
İnkübatör	Thermo
Koloni Sayıcı	Funke Gerber
Stomacher	Interscience
Mikroskop	Motic B1
Ekim kabini	Fagus Pa
Vorteks	Heidolph Reax
Analitik terazi	Sartorius
Mikrodalga fırın	Siemens
Su banyosu	Memmert
Soğutmalı inkübatör	Memmert
Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı	Velp
pH metre	Sartorius Documeter
Dispenser	Socorex Calibrex
ELFA Cihazı	Vidas
PCR Cihazı	Dupont Bax Q7
Isıtıcı blok	Dupont
Dijital termometre	Tfa/Einstichthermometer
Otomatik pipet 20-200 µl	Thermo Scientific
Otomatik pipet 5-50 µl	Thermo Scientific
Otomatik pipet 1000-5000 µl	Thermo Electron Corporation
Otomatik dilutor	Biomerieux
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Dijital fotoğraf makinesi	Nikon d60

3.2 Metot

3.2.1 Kullanılan bakteriyel strainler

Denemelerde kullanılan *L. monocytogenes* ATCC 19114, *L. monocytogenes* ATCC 19116, *L. monocytogenes* ATCC 19111 ve *L. innocua* ATCC 51742 suşları liyofilize halde Oxoid (İngiltere) firmasından sağlanmıştır. Liyofilize kültürler Brain Heart Infusion Broth (BHI) kullanılarak canlandırılmış ve %20 gliserol içeren BHI broth'a batırılmış kültür saklama boncuklarında -40°C'de saklanmıştır. Kültürler TSA yatık agarları kullanılarak pasajlanmıştır. Denemelerden önce kültürler, TSB besiyerinde 37°C'de 18 sa inkübe edilmiştir. İnokülasyon öncesi kültürler, 4°C'de, 6000 x g'de, 5 dk santrifüjlenmiş ve iki kez PBS ile yıkanarak metabolik son ürünler uzaklaştırılmıştır.

3.2.2 Metot validasyon çalışmalarında kullanılan örneklerin hazırlanması ve saklanması

Mikrobiyolojik validasyonda kullanılacak gıda örnekleri, analize alınincaya dek orijinal poşetinde ya da steril bir kap içerisinde, bulunması gereken ortam koşulları göz önüne alınarak saklanmıştır. Kabın ya da poşetin dış yüzeyi herhangi bir kontaminasyon riskine karşı uygun dezenfektanla temizlenmiştir. Örneklerden kullanılan metotlarda belirtilen miktar, steril ekipmanlar ile aseptik olarak alınarak homojenize edilmiştir. Açılan örneklerde mikrobiyal aktivite devam edeceği için, örnek uzun süre saklanmamıştır. Spike örnekler ya da patojen organizma bulunan örnekler otoklavda steril edildikten sonra imha edilmiştir.

3.2.3 Metot validasyon çalışmalarında kültürlerin inokülasyonu

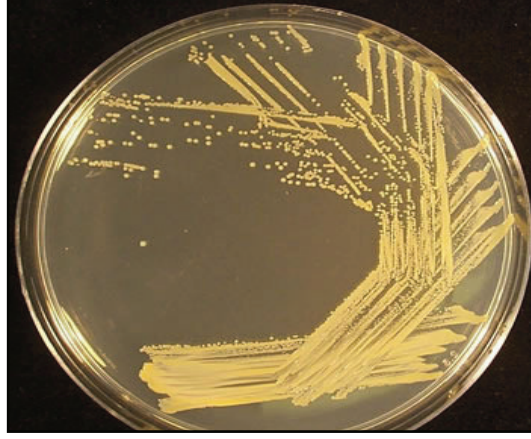
Validasyon çalışmaları için *L. monocytogenes* ATCC 19114, *L. monocytogenes* ATCC 19116, *L. monocytogenes* ATCC 19111 kültürleri kullanılmıştır. Selektivite deneyleri için doğal flora bakterilerine ilaveten, gıda örneklerine *L. innocua* ATCC 51742 kültürü spike edilmiştir. Kültürler, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Tüp Dilüsyon Metodu kullanılarak inokule edilecek miktar ayarlanmıştır. Örnekler homojenize edildikten sonra spike yapılmıştır. Tespit limiti çalışmaları için düşük (1-10 kob/ml) ve orta seviyede (10-100 kob/ml) spike yapılmıştır.

3.2.4 *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1 analiz prosedürü

Listeria monocytogenes'in varlığını tespit için geçerli bir metottur. Bu standarda göre yapılan analizde, seçici katı besi ortamı üzerinde tipik koloniler oluşturan ve tanımlanan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri gösteren kolonilerin olup olmadığını belirlemek amaçlanmaktadır. Aşağıdaki prosedür aynen gerçekleştirilmiştir:

- Analize alınan örneğin 25 g'ı 225 ml Half Fraser içerisinde homojenize edildikten sonra $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat inkübasyona bırakılır (ön zenginleştirme).
- Ana süspansiyonun inkübasyon süresi sonunda 0,1ml kültür 10 ml'lik Fraser Broth'a ilave edilir ve $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ± 2 saat inkübasyona bırakılır (ikinci zenginleştirme).
- 30°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılan ön zenginleştirme ortamından bir öze ile alınan kültür, Oxford agar yüzeyine tek koloni düşecek şekilde çizilir. Aynı ekim metodu ile Palcam agara da çizim yapılır. $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılan ikinci zenginleştirme için de aynı işlem, aynı besi ortamları ile tekrar edilir. Bu plaklar ters çevrilerek 35°C veya 37°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilir.
- İnkübasyonunu tamamlayan plaklarda üreme kontrol edilir. Koloni oluşumu yoksa veya zayıf bir üreme varsa inkübasyon süresi 18–24 saat daha uzatılır.
- Oxford agar için; tipik koloni görünümü küçük, grimsi, siyah zonludur. 48 saat sonunda koloniler ortası çökmüş, siyah zonlu, yaklaşık 2 mm çapında ve parlak yeşildir.
- Palcam agarda; 24 saat sonunda tipik koloniler 1,5–2,0 mm çapında, bazen siyah merkezli, ancak daima siyah zonlu, küçük veya çok küçük grimsi yeşil ya da zeytin yeşili görüntü verirler. 48 saat sonundaki tipik koloni görüntüsü ise siyah zonlu, merkezi çökük, yaklaşık 1,5–2,0 mm çapında yeşil kolonilerdir.

- Doğrulama için seçici besi ortamı içeren her plaktan 5 şüpheli koloni alınarak, TSAYE yüzeyine tek koloni düşecek şekilde çizilir ve 35-37°C’de inkübasyona bırakılır. Tipik koloniler 1-2 mm çapında, konveks, renksiz, opak ve düzgün kenarlıdır. Elde edilen saf kolonilere tanımlama amacıyla aşağıdaki testler uygulanır:



Şekil 3.5 *Listeria monocytogenes* TSAYE

- Gram boyama: TSAYE’de gelişen 24 saatlik kolonilere Gram boyama yapılır. *Listeria* cinsi bakteriler Gram pozitif, ince, çubuk şeklindedir.
- Hareketlilik deneyi: TSAYE’de gelişen 24 saatlik kolonilerden öze ile TSBYE’ye inokülasyon yapılarak tüpler 25°C’de bulanıklık oluşana kadar (8–24 saat) inkübe edilir. TSBYE kültüründen öze ile çukur lam üzerine transfer edilir ve üzeri bir lamelle kapatılarak mikroskopta incelenir. *Listeria* türleri takla atarak ilerleyen hareketli, ince, kısa, çubuk şeklinde bakterilerdir. Buna alternatif olan bir başka hareketlilik testi ise, SIM agar kullanımındır. TSAYE plaklarında gelişen kolonilerden SIM agara iğne öze ile daldırma yöntemiyle inokülasyon yapılarak, 25°C’de 2-5 gün inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda inokülasyon çizgisi boyunca tipik olarak agar yüzeyine doğru şemsiye şeklinde bir gelişme gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilir.



Şekil 3.6 *Listeria monocytogenes* SIM Medium

- Katalaz reaksiyonu: TSAYE besiyerinde gelişen kolonilerden öze ile alınarak temiz bir lam üzerine transfer edilen kültür üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit damlatılır. Gaz kabarcıklarının gözlenmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.
- Biyokimyasal testler: Eskulin hidrolizi, şeker fermentasyonu gibi testler, API *Listeria* kiti (Biomerieux, Fransa) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve Apiweb veri tabanı kullanılarak tanımlama yapılmıştır.
- CAMP deneyi: Koyun kanlı agar plağına *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* kültürlerinden birbirine paralel ve zıt kutuplarda olacak şekilde tek hat halinde çizgi ekim yapılır. TSAYE'den bir öze yardımı ile alınan tipik koloni, bu kültürlerle dik açı oluşturacak şekilde, benzer biçimde çizgi ekim yapılır. *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* kültürlerinin deney suşu ile kesiştiği yerde artan bir β -hemoliz sınırı varsa, bu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir (TS EN ISO 11290-1, 1997).

3.2.5 *Listeria monocytogenes* ELFA (Vidas) analiz prosedürü

VIDAS *L. monocytogenes*, otomatik VIDAS sisteminde, ELFA yöntemi (Enzim Bağlantılı Floresan Test) kullanılarak, *Listeria monocytogenes* antijenlerinin spesifik olarak saptanması için kullanılan bir enzim immün-testtir.

Katı Faz Sağlayıcı (SPR), katı faz olarak işlev görmesinin yanı sıra test için pipetleme aygıtı olarak da kullanılmaktadır. SPR'nin iç kısmı, yüzeyine adsorbe edilmiş anti-*L. monocytogenes* antikoları ile kaplanmıştır. Testin reaktifleri

kullanıma hazırdır ve kaplanmış reaktif striplerine ön dağıtımı yapılmıştır. Testin tüm basamakları cihaz tarafından otomatik olarak yapılır. Reaksiyon karışımı SPR nin içerisine birkaç kez alınıp bırakılır.

Zenginleştirme sıvı besiyerinin bir kısmı reaktif sribine dağıtılır. Antijenler, SPR'nin iç kısmını kaplayan anti-*Listeria monocytogenes* antikorlarına bağlanır. Bağlanmamış bileşenler yıkama basamakları sırasında elimine edilirler. Alkalen fosfataz ile kaplanmış antikorlar, SPR'nin içine alınıp bırakılırlar ve SPR duvarındaki antikorlara bağlı herhangi bir *Listeria monocytogenes* antijenine bağlanırlar. Sonraki yıkama basamakları ile bağlanmamış konjugat temizlenir.

Son saptama basamağında, substrat (4-metil-umbelliferil fosfat) SPR içerisine alınıp bırakılır. Konjugat enzim, bu substratın, floresansı 450 nm'de ölçülen bir floresan ürünün (4-Metil-umbelliferon) hidrolizini katalize eder.

Testin sonunda, sonuçlar her bir örnek için test değeri hesaplayan cihaz tarafından otomatik olarak analiz edilir. Bu değer, kayıtlı standartlar ile (eşikler) karşılaştırılır ve her bir sonuç tek tek yorumlanır (pozitif, negatif). Aşağıdaki prosedür aynen gerçekleştirilmiştir:

Gıda örneğinden 25 g/ml alınarak aseptik olarak 225 ml Half Fraser Broth'a transfer edilir ve homojenize edilir. $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24-26 saat inkübe edilir.

- İçerisinde 10 ml Fraser Broth bulunan tüplere ön zenginleştirme kültüründen 1 ml transfer edilir ve $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 24-26 saat inkübe edilir.
- İşlemden en az 30 dakika önce $+4^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp oda sıcaklığına getirilmiş scribe 500 µl örnek inoküle edilerek cihaza yerleştirilir.
- İşlem tamamlandığında yazılım konfigürasyonuna göre sonuçlar entegre yazıcıdan çıkar (Vidas Kullanıcı Kılavuzu).



Şekil 3.7 Dupont Bax Q7 ve Mini Vidas

3.2.6 *Listeria monocytogenes* PCR (Dupont Bax Q7) analiz prosedürü

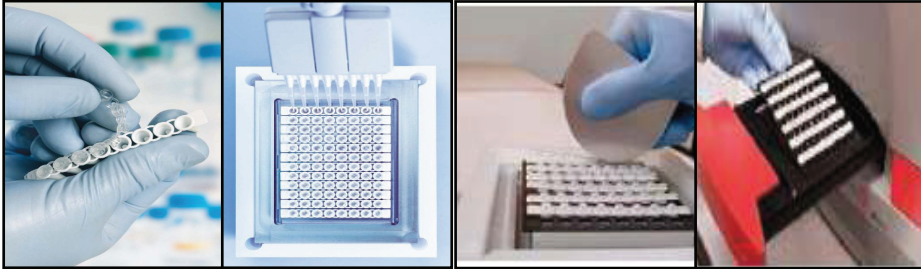
Bax Q7, hedef mikroorganizmayı Polymerase Chain Reaction (PCR) tekniği kullanarak tespit eden otomatize bir sistemdir. Bu sistemde *L. monocytogenes* PCR Assay için gerekli tüm reaktifler (primerler, polimeraz, nukleotidler ve pozitif kontrol), tüpler içerisindeki küçük bir tablette bir araya getirilmiştir. Bu sayede pipetleme sırasında operatörden kaynaklanabilecek hatalar ve çapraz kontaminasyon ortadan kalkmaktadır.

Bu sistem, PCR ile floresan saptama sistemini birleştirdiğinden, sonuçlar için ilave bir yorumlamaya gerek duyulmamaktadır. Her bir PCR tableti çift iplikli DNA ile bağlanan ve floresan yayılım yapan boyalar içermektedir. Bax sistemi, amplifikasyonun ardından floresan sinyalin ölçüldüğü andan itibaren saptama yapmaya başlar. Saptama boyunca, örneklerin sıcaklıkları yükselir, DNA denatüre olur ve DNA çift ipliğine bağlı floresan boya salınarak sinyal zayıflar. Floresan sinyalindeki bu değişim cihaz tarafından algılanarak değerlendirilir. Aşağıdaki prosedür aynen gerçekleştirilmiştir:

Gıda örneğinden 25 g (ml) alınarak aseptik olarak 225 ml Half Fraser Broth'a transfer edilir ve homojenize edilir. $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 22-24 saat inkübe edilir.

- İçerisinde 9,9 ml Fraser Broth bulunan tüplere ön zenginleştirme kültüründen 100 μl transfer edilir ve $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 18-24 saat inkübe edilir.

- 12 ml lysis buffer içerisine 150 µl protease ilave edilir. Tüplere 200 µl aktarılır.
- Örnekten 5 µl, buffer üzerine transfer edilir.
- Sırasıyla $55\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de 60 dakika, $95\pm 3^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika ısıtıcı bloklarda inkübe edilir.
- Lysis işlemi tamamlandıktan sonra tüpler, $2-8^{\circ}\text{C}$ ' lik soğutucu bloklara yerleştirilir.
- 5 dakika sonra lizatlardan 50 µl alınarak, içerisinde PCR tabletleri bulunan tüplere aktarılır.
- BAX Q7 cihazı açılır. Cihazın uygun sıcaklığa gelmesi için 10 dakika kadar beklenir. İlk açılan pencerede cihazın sıcaklığının çalışma şartlarına uygunluğu otomatik olarak kontrol edilir. Problem olmaması durumunda veya belirli bir süre sonunda uygun sıcaklığa ulaşması sonucunda PCR tüpleri ilk başta bilgileri girilen kuyucuklara yerleştirilir ve işlem otomatik olarak başlar.
- PCR döngüsü tamamlandığında, kuyucukların yerleşimlerinin gösterildiği pencere ve sonuçlar açılır. Bu bölümde kuyucukların ortasında sonuçlar pozitifler için kırmızı renkte (+) simgesiyle, negatifler için yeşil renkte (-) simgesiyle gösterilir. (Dupont Bax Q7 Kullanıcı Kılavuzu).



Şekil 3.8 Dupont Bax Q7 işlem prosedürü

3.2.7 Validasyon prosedürü

3.2.7.1 Rölatif doğruluk, Rölatif duyarlılık, Rölatif özgüllük

Rölatif doğruluk/relative accuracy (AC), rölatif duyarlılık/relative sensitivity (SE) ve rölatif özgüllük/relative specificity (SP) parametreleri EN ISO 16140:2003 standardına göre gerçekleştirilmiş ve sonuçlar aynı standardın Chapter 5.1. “Methods comparison study” kısmına göre değerlendirilmiştir.

Bu parametreleri belirlemek için gıda örnekleri paralel olarak her üç metotla analize alınmıştır. Pozitif sonuçlarla ilgili istatistiksel değerlendirmeyi yapabilmek için yeterince doğal kontamine örnek bulunmadığından, bir kısım örnekler kültürlerin spike edilmesi ile çalışılmıştır.

3.2.7.2 Rölatif tespit limiti

Tespit limiti çalışması için EN ISO 16140:2003 standardının Annex B bölümünde *L. monocytogenes* için önerilen süt ürünleri, su ürünleri, et ürünleri ve bitkisel ürünleri temsil eden 4 gıda örneği seçilmiştir.

Örneklerden peynir ve soğan tozuna *L. monocytogenes* ATCC 19114, sucuğa *L. monocytogenes* ATCC 19116, balığa ise *L. monocytogenes* ATCC 19111 kültürü spike edilmiştir. Bu işlem üç seviyede yapılmıştır. 1. seviye herhangi bir mikroorganizmanın eklenmediği negatif kontrol grubudur. 2. seviye en düşük mikroorganizma konsantrasyonunun eklendiği teorik tespit seviyesidir. 3. seviye ise tespit limiti için eklenen mikroorganizma kültürünün bir önceki dilüsyonudur. İnoküle edilecek kültür miktarı Tüp Dilüsyon Metodu kullanılarak hazırlanmıştır. Eklenen mikroorganizma sayısını belirlemek için dilüsyonlardan Tryptic Soy Agar besiyerlerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır.

Her bir seviye için on tekrar gerçekleştirilmiştir. Spike edilmiş örnekler, her üç metot kullanılarak aynı anda analize alınmıştır.

3.2.8 Stres adaptasyon denemeleri

3.2.8.1 Sıcaklık stresi ve toleransı

Sıcaklık şoku için, 18 saatlik kültürden 10 ml alınıp sirkülasyonlu su banyosu içerisinde bulunan 90 ml TSBYE içerisinde aktarılmıştır. Sıcaklık şoku 44 ve 48°C'lerde farklı sürelerde denenmiştir. Sıcaklık şokunun ardından hücre süspansiyonları zaman kaybedilmeden termal tolerans için kullanılmıştır. Sayım için kullanılacak hücre süspansiyonları ise buz içerisinde alınarak değişim önlenmiştir. Test organizmasının sıcaklık toleransını belirlemek için 10 ml sıcaklık şokuna maruz bırakılmış bakteri hücreleri ve 30°C'de, 1,5 saat inkübe edilmiş kontrol grubu hücreleri 90 ml TSBYE içerisinde inoküle edilmiştir (Leyer et al., 1995). Termal tolerans denemeleri 55 ve 63°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Tolerans deneylerinin ardından canlı kalan bakterileri belirlemek için örnekler gerekli oranlarda FTS içerisinde seyreltilip TSAYE, Palcam ve Oxford Agar besiyerlerine yayma plaka yöntemiyle 3 paralel petriye ekilmiştir. Plaklar 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyonun ardından sayılmıştır.

3.2.8.2 Asit stresi ve toleransı

Asit stresi denemeleri için laktik ve sitrik asit kullanılmıştır. Bakteri kültürleri asit şoku için, laktik veya sitrik asitle pH'ları 4,5; 5,0; 5,5 ve 6,0 olarak ayarlanmış TSBYE besiyerlerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kültürlerin letal pH'a toleransı incelenmiştir. Kontrol grubu olan kültür pH 7.3 olan normal TSBYE besiyerinde geliştirilmiştir. Letal pH denemeleri için asit şokuna uğratılmış ve uğratılmamış kültürler pH'ı 3,0'e ayarlanmış TSBYE içerisinde inoküle edilerek 25°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Tolerans deneylerinin ardından canlı kalan bakterileri belirlemek için örnekler gerekli oranlarda FTS içerisinde seyreltilip TSAYE, Palcam ve Oxford Agar besiyerlerine yayma plaka yöntemiyle 3 paralel olarak ekilmiştir. Plaklar 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyonun ardından sayılmıştır.

3.2.8.3 Stres kombinasyonları

Farklı stres koşullarının adaptasyon üzerine etkisini gözlemlemek için birbirini takip edecek şekilde stres kombinasyonları denenmiştir. %10 NaCl içeren TSBYE besiyerlerinde ozmotik şoka maruz bırakılan *L. monocytogenes* kültürlerinin sıcaklık toleranslarındaki değişim gözlenmiştir. Yine pH 5,5'de asit

şokuna uğratılan hücrelerin sıcaklık adaptasyonu incelenmiştir. Ozmotik stres, asit stresi ya da sıcaklık stresi ardı ardına uygulanarak gıda üretim prosesi sırasında mikroorganizmanın karşılaşabileceği şartlar yaratılmaya çalışılmıştır. Bir strese karşı adaptasyon esnasında, başka bir strese karşı da dirençlilik oluşması yani çapraz koruma durumu gözlenmeye çalışılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Metot Validasyonu

Bu çalışmada *L. monocytogenes*'in gıdalardan izolasyonunda kullanılan kültürel (ISO 11290-1), ELFA (Vidas) ve PCR (Dupont Bax Q7) metotları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada ISO 11290-1 metodu uluslar arası olarak kabul görmüş bir metot olduğundan referans kabul edilmiştir. Metotların izolasyon için uygunluğunu tespit ve teyit etmek için, ISO 16140:2003 validasyon prosedürü uygulanmıştır.

Rölatif doğruluk/relative accuracy (AC), rölatif duyarlılık/relative sensitivity (SE) ve rölatif özgüllük/relative specificity (SP) parametrelerini tespit etmek için, farklı türden 100 gıda örneği paralel olarak her üç metotla analize alınmıştır (Çizelge 4.1). Örnekleme istatistiksel hesaplamaların yapılabilmesi için, yaklaşık %50 negatif, %50 pozitif olacak şekilde dizayn edilmiştir. Bu örneklerden bir kısmı *L. monocytogenes* ile doğal olarak kontaminedir. Ancak validasyon çalışmaları için yeterince doğal kontamine örnek bulunamadığından negatif örneklere *L. monocytogenes* strainleri spike edilmiştir (10^2 - 10^3 kob/ml). Sonuçlar EN ISO 16140:2003 standardının Chapter 5.1. "Methods comparison study" kısmına göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1 Paralel analiz sonuçları

Örnek Numarası	Örnek Adı	ELFA (Vidas)	PCR (Dupont)	ISO
1	Çiğ dana eti	Pozitif	Pozitif	Pozitif
2	Çiğ kuzu eti	Negatif	Negatif	Negatif
3	Kıyma	Negatif	Negatif	Negatif
4	Kıyma	Pozitif	Pozitif	Pozitif
5	Bonfile *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
6	Sucuk	Pozitif	Pozitif	Pozitif
7	Sucuk	Negatif	Negatif	Negatif
8	Sosis	Negatif	Negatif	Negatif

Çizelge 4.1'in devamı

Örnek Numarası	Örnek Adı	ELFA (Vidas)	PCR (Dupont)	ISO
9	Sosis *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
10	Salam	Negatif	Negatif	Negatif
11	Salam *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
12	Domuz sosisi	Negatif	Negatif	Negatif
13	Domuz sosisi	Pozitif	Pozitif	Pozitif
14	Domuz pastırması	Negatif	Negatif	Negatif
15	Domuz pastırması	Pozitif	Pozitif	Pozitif
16	Hamburger köfte	Negatif	Negatif	Negatif
17	İnegöl köfte *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
18	Dana jambon *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
19	Çiğ bütün piliç	Negatif	Negatif	Negatif
20	Çiğ bütün piliç	Pozitif	Pozitif	Pozitif
21	Baget *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
22	Baget	Pozitif	Pozitif	Negatif
23	Kanat	Negatif	Negatif	Negatif
24	Kanat *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
25	Piliç pirzola	Negatif	Negatif	Negatif
26	Piliç bonfile *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
27	Piliç fileto	Negatif	Negatif	Negatif
28	Piliç incik	Pozitif	Pozitif	Pozitif
29	Piliç boyun	Negatif	Negatif	Negatif

Çizelge 4.1'in devamı

Örnek Numarası	Örnek Adı	ELFA (Vidas)	PCR (Dupont)	ISO
30	Piliç sosis	Negatif	Negatif	Negatif
31	Hindi sosis *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
32	Hindi salam *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
33	Hindi jambon	Negatif	Negatif	Negatif
34	Hindi kıyma	Negatif	Negatif	Negatif
35	Hindi kıyma *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
36	Dondurulmuş kömür balığı	Negatif	Negatif	Negatif
37	Dondurulmuş kömür balığı *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
38	Çipura *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
39	Levrek	Negatif	Negatif	Negatif
40	Levrek fileto *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
41	Alabalık	Negatif	Negatif	Negatif
42	Panga balığı	Pozitif	Negatif	Negatif
43	Panga balığı *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
44	Kalamar	Negatif	Negatif	Negatif
45	Kalamar *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
46	Karides	Negatif	Negatif	Negatif
47	Midye	Negatif	Negatif	Negatif
48	Beyaz peynir	Pozitif	Pozitif	Pozitif
49	Beyaz peynir	Negatif	Negatif	Negatif
50	Tulum peyniri	Negatif	Negatif	Negatif

Çizelge 4.1'in devamı

Örnek Numarası	Örnek Adı	ELFA (Vidas)	PCR (Dupont)	ISO
51	Çeçil peyniri	Negatif	Negatif	Negatif
52	Krem peynir	Negatif	Negatif	Negatif
53	Krem peynir *	Negatif	Pozitif	Pozitif
54	Lor peyniri	Negatif	Negatif	Negatif
55	Lor peyniri *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
56	Koyun peyniri	Negatif	Negatif	Negatif
57	Otlı peynir *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
58	Hellim peyniri *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
59	Örgü peynir	Negatif	Negatif	Negatif
60	Kaymak	Negatif	Negatif	Negatif
61	Yoğurt	Pozitif	Pozitif	Pozitif
62	Yoğurt	Negatif	Negatif	Negatif
63	Tereyağı	Negatif	Negatif	Negatif
64	Krema *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
65	Süt tozu *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
66	Dondurma	Negatif	Negatif	Negatif
67	Kazein	Negatif	Negatif	Negatif
68	Soğan tozu	Negatif	Negatif	Negatif
69	Soğan tozu *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
70	Sarımsak tozu *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
71	Kurutulmuş maydanoz	Negatif	Negatif	Negatif

Çizelge 4.1'in devamı

Örnek Numarası	Örnek Adı	ELFA (Vidas)	PCR (Dupont)	ISO
72	Kurutulmuş havuç	Negatif	Negatif	Negatif
73	Kurutulmuş havuç *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
74	Kurutulmuş dereotu	Negatif	Negatif	Negatif
75	Dondurulmuş patates	Pozitif	Pozitif	Pozitif
76	Dondurulmuş soğan	Negatif	Negatif	Negatif
77	Kültür mantarı *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
78	Doğranmış marul	Negatif	Negatif	Negatif
79	Portakal suyu	Negatif	Negatif	Negatif
80	Elma suyu	Negatif	Negatif	Negatif
81	Çoban salata	Negatif	Negatif	Negatif
82	Rus salatası *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
83	Mısır salatası *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
84	Közlenmiş biber	Negatif	Negatif	Negatif
85	Piyaz *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
86	Patlıcan salatası	Negatif	Negatif	Negatif
87	İtalyan salata	Negatif	Negatif	Negatif
88	Döner *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
89	Sushi	Negatif	Negatif	Negatif
90	Tas kebabı *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
91	Pizza	Negatif	Negatif	Negatif
92	Börek	Negatif	Negatif	Negatif

Çizelge 4.1'in devamı

Örnek Numarası	Örnek Adı	ELFA (Vidas)	PCR (Dupont)	ISO
93	Fava *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
94	Haydari *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
95	Yaprak sarma	Negatif	Negatif	Negatif
96	Çiğ köfte *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
97	Yaş pasta *	Pozitif	Pozitif	Pozitif
98	Ekler	Negatif	Negatif	Negatif
99	Tiramisu	Negatif	Negatif	Negatif
100	Kazandibi *	Pozitif	Pozitif	Pozitif

* Spike yapılmış örnekler

Rölatif özgülük/relative specificity (SP), referans metot ve alternatif metodun her ikisi ile negatif olarak bulunan toplam örnek sayısının, negatifliği kanıtlanmış örnek sayısına oranıdır. Rölatif özgülük: $SP=NA/(NA+PD) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2, 4.3, 4.4).

Rölatif duyarlılık/relative sensitivity (SE), referans metot ve alternatif metodun her ikisi ile pozitif olarak bulunan toplam örnek sayısının, pozitifliği kanıtlanmış örnek sayısına oranıdır. Rölatif duyarlılık: $SE=PA/(PA+ND) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2, 4.3, 4.4).

Rölatif doğruluk/Relative accuracy (AC), aynı örnek hem alternatif hem de referans metot ile analiz edildiğinde, iki sonuç arasındaki uyumun derecesidir. Rölatif doğruluk: $AC=[(PA+NA)/N] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.2 Referans (ISO 11290-1) ve alternatif (ELFA) metodun eşleştirilmiş sonuçları

Sonuçlar	ISO 11290-1 pozitif (R+)	ISO 11290-1 negatif (R-)
ELFA pozitif (A+)	45 (PA)	2 (PD) R-/A+
ELFA negatif (A-)	1 (ND) A-/R+	52 (NA)

Çizelge 4.3 Referans (ISO 11290-1) ve alternatif (PCR) metodun eşleştirilmiş sonuçları

Sonuçlar	ISO 11290-1 pozitif (R+)	ISO 11290-1 negatif (R-)
PCR pozitif (A+)	46 (PA)	1 (PD) R-/A+
PCR negatif (A-)	0 (ND) A-/R+	53 (NA)

Çizelge 4.4 Sonuçların karşılaştırılması

Metot	Pozitif Uyumluluk	Negatif Uyumluluk	Negatif Sapma	Pozitif Sapma	Rölatif Doğruluk %	Rölatif Özgüllük %	Rölatif Duyarlılık %	Toplam Örnek Sayısı
ELFA (Vidas)	45	52	1	2	97,00	96,30	97,83	100
PCR (Dupont Box Q7)	46	53	0	1	99,00	98,15	100,00	100

Referans metot olan ISO 11290-1 metodu ile alternatif metotlar olan ELFA (Vidas) ve PCR (Dupont Bax Q7) arasında, analiz sonucunu etkileyecek önemli farklılıkların olup olmadığını tespit etmek için EN ISO 16140:2003 Annex F'de belirtildiği şekilde gerekli durumlarda McNemar istatistik testi yapılmaktadır. Bu testin gerekliliğine karar verirken pozitif ve negatif sapmaların sayısı dikkate alınmaktadır. Pozitif sapma sayısı ile negatif sapma sayısının toplamının ($Y=PD+ND$) 6'dan büyük olduğu durumlarda bu test uygulanmaktadır. Çalışmamızda ELFA yöntemi için Y değeri 3, PCR yöntemi için ise 1 olduğundan McNemar testi uygulanmamıştır. Ancak alternatif metotların referans metotla uyumunun derecesini belirlemek için Cohen'in kappa istatistiksel yöntemi kullanılmıştır (Çizelge 4.5 ve 4.6). Metot validasyon çalışmalarında iki metot arasındaki uyumun derecesinin yüksek olması gereklidir ki bunun için $\kappa > 0,80$ olmalıdır (EN ISO 16140:2003).

Çizelge 4.5 PCR ve ISO 11290-1 arasındaki uyumun derecesi

P_0 : Gözlemlenen uyumun derecesi

P_e : Uyumun şans eseri ortaya çıkma olasılığı

	ISO 11290-1			
		+	-	Toplam
PCR (DUPONT)	+	46	1	47
	-	0	53	53
	Toplam	46	54	100
P_0	0,99			
P_e	0,50			
κ	0,98			

Çizelge 4.6 ELFA ve ISO 11290-1 arasındaki uyumun derecesi

	ISO 11290-1			
		+	-	Toplam
ELFA (VIDAS)	+	45	2	47
	-	1	52	53
	Toplam	46	54	100
p_0	0,97			
p_e	0,50			
κ	0,94			

Rölatif tespit limiti çalışması için 4 gıda grubu kullanılmıştır. Örneklerden peynir ve soğan tozuna *L. monocytogenes* ATCC 19114, sucuğa *L. monocytogenes* ATCC 19116, balığa ise *L. monocytogenes* ATCC 19111 kültürü spike edilmiştir. Bu işlem üç seviyede yapılmıştır. 1. seviye herhangi bir mikroorganizmanın eklenmediği negatif kontrol grubudur. 2. seviye en düşük mikroorganizma konsantrasyonunun eklendiği teorik tespit seviyesidir (1-10 kob/ml). 3. seviye ise tespit limiti için eklenen mikroorganizma kültürünün bir önceki dilüsyonudur (10-100 kob/ml). İnoküle edilecek kültür miktarı Tüp Dilüsyon Metodu kullanılarak hazırlanmıştır. Örnekler spike yapıldıktan sonra EMS yöntemi kullanılarak inoküle edilen gerçek sayı tespit edilmeye çalışılmıştır.

Her seviye için analizler 10 tekrarlı yapılmıştır. Yöntemlerin laboratuvar koşullarında tespit edebileceği en düşük mikroorganizma miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. 2. seviye olan teorik tespit limitinde mikroorganizma konsantrasyonu çok düşük olduğundan, bu seviyenin tespit limiti kabul edilebilmesi için sonuçların yaklaşık %50'sinin pozitif bulunması yeterlidir (EN ISO 16140:2003). Ayrıca metotlar arasında fark olup olmadığını belirlemek için Siegel'in Ki-kare (χ^2) testi yapılmıştır. %95 güven aralığında, $\chi^2 < 3,84$ olduğunda iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır, bu durum iki metodun uyumlu olduğunu göstermektedir.

Süt ürünleri için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,43) referans metot ile 7, PCR metodu ile 6 pozitif sonuç; yüksek seviyede (2,9) referans metot ile 10, PCR metodu ile 9 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,43-2,9 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, $\chi^2=0,00$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.7 Süt ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1)

Örnek: Krem Peynir									
Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,43)			Seviye 3 (EMS 2,9)			
	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P
1	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
2	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
3	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
4	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
5	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
6	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
7	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
8	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
9	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
10	-	-	-/-	+	+	+/+	+	-	+/-
Σuyumlu I/P	10	10		7	6		10	9	
SE (%)				70	60		100	90	
SP (%)	100	100							
+/+			0			6			9
+/-			0			1			1
-/+			0			0			0
-/-			10			3			0
Toplam	10	10		10	10		10	10	
χ^2						0,00			0,00

Süt ürünleri için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,43) referans metot ile 7, ELFA metodu ile 7 pozitif sonuç; yüksek seviyede (2,9) referans metot ile 10, ELFA metodu ile 8 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,43-2,9 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=0,25$, yüksek seviye için $\chi^2=0,50$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.8 Süt ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)

Örnek: Krem peynir										
Seviye 1 (EMS<0,03)			Seviye 2 (EMS 0,43)			Seviye 3 (EMS 2,9)				
	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E	
1	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+	
2	-	-	-/-	+	-	+/-	+	-	+/-	
3	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+	
4	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+	
5	-	-	-/-	+	+	+/+	+	-	+/-	
6	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+	
7	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+	
8	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+	
9	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+	
10	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+	
Σuyumlu I/E	10	10		7	7		10	8		
SE (%)				70	70		100	80		
SP (%)	100	100								
+/+			0			5			8	
+/-			0			2			2	
-/+			0			2			0	
-/-			10			1			0	
Total	10	10		10	10		10	10		
χ^2						0,25				0,50

Et ürünleri için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,11) referans metot ile 6, PCR metodu ile 6 pozitif sonuç; yüksek seviyede (4,60) referans metot ile 9, PCR metodu ile 10 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,11-4,60 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=0,17$, yüksek seviye için $\chi^2=0,00$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.9 Et ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1)

Örnek: Sucuk									
	Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,11)			Seviye 3 (EMS 4,60)		
	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P
1	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
2	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
3	-	-	-/-	+	+	+/+	-	+	-/+
4	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
5	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
6	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
7	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
8	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
9	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
10	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
Σuyumlu I/P	10	10		6	6		9	10	
SE (%)				60	60		90	100	
SP (%)	100	100							
+/+			0			3			9
+/-			0			3			0
-/+			0			3			1
-/-			10			1			0
Total	10	10		10	10		10	10	
χ^2						0,17			0,00

Et ürünleri için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,11) referans metot ile 6, ELFA metodu ile 7 pozitif sonuç; yüksek seviyede (4,60) referans metot ile 9, ELFA metodu ile 9 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,11-4,60 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=0,00$, yüksek seviye için $\chi^2=0,50$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.10 Et ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)

Örnek: Sucuk									
Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,11)			Seviye 3 (EMS 4,60)			
	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E
1	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
2	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
3	-	-	-/-	+	+	+/+	-	+	-/+
4	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
5	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
6	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
7	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
8	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
9	-	-	-/-	+	+	+/+	+	-	+/-
10	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
Σuyumlu I/E	10	10		6	7		9	9	
SE (%)				60	70		90	90	
SP (%)	100	100							
+/+			0			4			8
+/-			0			2			1
-/+			0			3			1
-/-			10			1			0
Toplam	10	10		10	10		10	10	
χ^2						0,00			0,50

Su ürünleri için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,23) referans metot ile 8, PCR metodu ile 5 pozitif sonuç; yüksek seviyede (4,60) referans metot ile 9, PCR metodu ile 9 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,23-4,60 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=1,33$, yüksek seviye için $\chi^2=0,50$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.11 Su ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1)

Örnek: Levrek fileto									
Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,23)			Seviye 3 (EMS 4,60)			
	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P
1	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
2	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
3	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
4	-	+	-/+	+	+	+/+	+	+	+/+
5	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
6	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
7	-	-	-/-	+	-	+/-	+	-	+/-
8	-	-	-/-	+	-	+/-	-	+	-/+
9	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
10	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
Σuyumlu I/P	10	9		8	5		9	9	
SE (%)				80	50		90	90	
SP (%)	100	90							
+/+			0			5			8
+/-			0			3			1
-/+			1			0			1
-/-			9			2			0
Toplam	10	10		10	10		10	10	
χ^2						1,33			0,50

Su ürünleri için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,23) referans metot ile 8, ELFA metodu ile 6 pozitif sonuç; yüksek seviyede (4,60) referans metot ile 9, ELFA metodu ile 8 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,23-4,60 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=0,50$, yüksek seviye için $\chi^2=0,00$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.12 Su ürünleri için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)

Örnek: Levrek fileto									
Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,23)			Seviye 3 (EMS 4,60)			
	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E
1	-	-	-/-	-	-	-/-	+	+	+/+
2	-	+	-/+	+	+	+/+	+	+	+/+
3	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
4	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
5	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
6	-	-	-/-	-	-	-/-	+	-	+/-
7	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
8	-	-	-/-	+	+	+/+	-	+	-/+
9	-	-	-/-	+	+	+/+	+	-	+/-
10	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
Σuyumlu I/E	10	9		8	6		9	8	
SE (%)				80	60		90	80	
SP (%)	100	90							
+/+			0			6			7
+/-			0			2			2
-/+			1			0			1
-/-			9			2			0
Toplam	10	10		10	10		10	10	
χ^2						0,50			0,00

Bitkisel ürünler için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,11) referans metot ile 6, PCR metodu ile 8 pozitif sonuç; yüksek seviyede (0,43) referans metot ile 9, PCR metodu ile 9 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,11- 0,43 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=0,17$, yüksek seviye için $\chi^2 =0,50$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.13 Bitkisel ürünler için rölatif tespit limiti sonuçları (PCR ve ISO 11290-1)

Örnek: Soğan tozu									
Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,11)			Seviye 3 (EMS 0,43)			
	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P	ISO	PCR	I/P
1	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
2	-	-	-/-	-	+	-/+	+	-	+/-
3	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
4	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
5	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
6	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
7	-	-	-/-	-	+	-/+	-	+	-/+
8	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
9	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
10	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
Σuyumlu I/P	10	10		6	8		9	9	
SE (%)				60	80		90	90	
SP (%)	100	100							
+/+			0			4			8
+/-			0			2			1
-/+			0			4			1
-/-			10			0			0
Total	10	10		10	10		10	10	
χ^2						0,17			0,50

Bitkisel ürünler için yapılan tespit limiti çalışmasında düşük seviyede (0,11) referans metot ile 6, ELFA metodu ile 6 pozitif sonuç; yüksek seviyede (0,43) referans metot ile 9, ELFA metodu ile 8 pozitif sonuç elde edilmiştir. Rölatif tespit limiti 0,11- 0,43 EMS/g arasındadır. %95 güven aralığında, düşük seviye için $\chi^2=0,17$, yüksek seviye için $\chi^2=0,00$ olduğundan iki metot arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.14 Bitkisel ürünler için rölatif tespit limiti sonuçları (ELFA ve ISO 11290-1)

Örnek: Soğan tozu									
Seviye 1 (EMS <0,03)			Seviye 2 (EMS 0,11)			Seviye 3 (EMS 0,43)			
	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E	ISO	ELFA	I/E
1	-	-	-/-	+	-	+/-	+	+	+/+
2	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
3	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
4	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
5	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
6	-	-	-/-	+	-	+/-	+	-	+/-
7	-	-	-/-	-	-	-/-	-	+	-/+
8	-	-	-/-	-	+	-/+	+	+	+/+
9	-	-	-/-	+	-	+/-	+	-	+/-
10	-	-	-/-	+	+	+/+	+	+	+/+
Σuyumlu I/E	10	10		6	6		9	8	
SE (%)				60	60		90	80	
SP (%)	100	100							
+/+			0			3			7
+/-			0			3			2
-/+			0			3			1
-/-			10			1			0
Toplam	10	10		10	10		10	10	
χ^2						0,17			0,00

4.2 Stres Adaptasyonu

Çalışmamızda *L. monocytogenes* hücreleri çeşitli subletal streslere uğratılmış ve ardından strese uğratılan ve uğratılmayan hücrelerin, öldürücü olan sıcaklık ve asit koşullarına adaptasyonu incelenmiştir. Denemelerde stres koşulları, tek tek veya ardışık olarak uygulanmıştır.

Sıcaklık ile ilgili adaptasyon denemelerinde letal sıcaklık olarak 55°C'de 1 sa ve 63°C'de 15 dk olmak üzere iki deneme yapılmıştır. 55°C'de 1 saatlik adaptasyon denemesinde subletal sıcaklık ve süreler; 44 ve 48°C, 30, 45, 60 ve 120 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Lin and Chou, 2004; Skandamis et al., 2008; Hassani et al., 2007). Canlı kalan koloni sayısı, TSAYE, Palcam ve Oxford Agar besiyerlerine yayma plaka yöntemiyle ekim yapılarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.15'de, başlangıçta ortalama 6,50 log₁₀ kob/ml olan bakteri popülasyonundaki strese uğratılmamış kontrol grubu ile strese adapte edilmiş grupların, 55°C'de 1 saatlik letal uygulama sonucundaki değişimi, logaritmik olarak verilmiştir.

Çizelge 4.15 Sıcaklık şoku ardından, 55°C'de 1 saatlik letal uygulama sonrası koloni sayısı (log₁₀ kob/ml ± SD)

Şok sıcaklık uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol	2,57±0,06	2,24±0,05	2,24±0,09
44°C, 30 dk	4,27±0,02	3,72±0,06	3,58±0,13
44°C, 45 dk	4,31±0,08	3,99±0,04	3,95±0,07
44°C, 60 dk	4,49±0,08	4,12±0,03	4,08±0,03
44°C, 120 dk	4,46±0,04	4,02±0,02	4,07±0,10
48°C, 30 dk	4,57±0,03	4,09±0,12	4,10±0,02
48°C, 45 dk	4,43±0,17	4,27±0,05	4,02±0,03
48°C, 60 dk	3,64±0,03	3,32±0,09	3,21±0,07
48°C, 120 dk	3,48±0,05	3,09±0,07	3,16±0,14

Çizelge 4.15’de görüldüğü gibi subletal sıcaklık stresine uğratılmış hücrelerle kontrol hücreleri arasında yaklaşık 1,2-2 log₁₀ kob/ml arasında değişen adaptasyon mevcuttur. En iyi adaptasyon 48°C, 30 dk’lik uygulamada görülmüştür. 48°C, 120 dk uygulama ise sürenin uzun olmasından dolayı bakteri hücrelerinin zarar görmesi nedeniyle başarılı olmamıştır. 44 °C’de yapılan stres denemelerinde ise en uygun sürenin 60 dk olduğu saptanmıştır. Besiyerleri arasında karşılaştırma yapıldığında ise, en iyi geri kazanımın yeast ekstrakt ile zenginleştirici hale getirilmiş TSAYE besiyerinde olduğu, Oxford ve Palcam besiyerlerinin ise seçicilik nedeniyle içerisine ilave edilen kimyasalların etkisiyle zarar görmüş hücreleri yeterince geliştiremediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.16’da ise sıcaklık stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan bakteri popülasyonundaki canlılık oranı % olarak karşılaştırılmıştır. Yapılan denemeler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi yapılmıştır. Bu analiz için SAS (Version 9.1) programı kullanılmıştır. Önem seviyesi %5 olarak kabul edilmiştir. Çizelgede farklı harflerle belirtilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaktadır (p<0,05).

Çizelge 4.16 Sıcaklık şokunun 55°C’de 1 saatlik termal toleransa etkisi (p<0,05)

Şok sıcaklık uygulamaları	% Canlı kalan bakteri	
Kontrol	39,54±0,35	A
44°C, 30 dk	65,69±0,29	B
44°C, 45 dk	66,31±0,22	B
44°C, 60 dk	69,08±0,17	BC
44°C, 120 dk	68,62±0,19	BC
48°C, 30 dk	70,31±0,10	C
48°C, 45 dk	68,15±0,11	BC
48°C, 60 dk	56,00±0,19	D
48°C, 120 dk	53,54±0,23	D

Çizelge 4.17’de, başlangıçta ortalama $7,45 \log_{10}$ kob/ml olan bakteri popülasyonundaki strese uğratılmamış kontrol grubu ile strese adapte edilmiş grupların, 63°C ’de 15 dakikalık letal uygulama sonucundaki değişimi, logaritmik olarak verilmiştir. Bu denemede, ilk denemeden elde edilen veriler ışığında en iyi adaptasyon görülen stres koşulları olan 44°C ’de 60 ve 120 dk ile 48°C ’de 30 ve 45 dk ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.17 Sıcaklık şoku ardından 63°C ’de 15 dakikalık letal uygulama sonrası koloni sayısı (\log_{10} kob/ml \pm SD)

Şok sıcaklık uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol	1,17 \pm 0,03	1,02 \pm 0,03	1,01 \pm 0,04
44°C , 60 dk	3,71 \pm 0,12	3,58 \pm 0,05	3,60 \pm 0,05
44°C , 120 dk	3,55 \pm 0,05	3,34 \pm 0,16	3,32 \pm 0,06
48°C , 30 dk	3,48 \pm 0,04	3,22 \pm 0,02	3,16 \pm 0,01
48°C , 45 dk	3,07 \pm 0,01	2,86 \pm 0,03	2,93 \pm 0,09

Çizelge 4.17’de görüldüğü gibi subletal sıcaklık stresine uğratılmış hücrelerle kontrol hücreleri arasında yaklaşık 1,9-2,6 \log_{10} kob/ml arasında değişen adaptasyon mevcuttur. En iyi adaptasyon 44°C , 60 dk’lık uygulamada görülmüştür.

Çizelge 4.18 Sıcaklık şokunun 63°C ’de 15 dakikalık termal toleransa etkisi ($p<0,05$)

Şok sıcaklık uygulamaları	% Canlı kalan bakteri
Kontrol	15,70 \pm 0,10 A
44°C , 60 dk	49,80 \pm 0,22 B
44°C , 120 dk	47,65 \pm 0,29 C
48°C , 30 dk	46,71 \pm 0,24 C
48°C , 45 dk	41,21 \pm 0,11 D

Çizelge 4.18'da 63°C'de 15 dakikalık letal uygulama sonucunda, sıcaklık stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan bakteri popülasyonundaki canlılık oranı % olarak karşılaştırılmıştır. Çizelgede farklı harflerle belirtilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

Farklı stres koşullarının sıcaklık adaptasyonu üzerine etkisini gözlemlemek için bakteri hücreleri, ozmotik ve asidik streslere maruz bırakılmıştır. %10 NaCl içeren TSBYE besiyerlerinde ozmotik şoka maruz bırakılan *L. monocytogenes* kültürlerinin sıcaklık toleranslarındaki değişim gözlenmiştir. Yine pH 5,5'de asit şokuna uğratılan hücrelerin sıcaklık adaptasyonu incelenmiştir. Ayrıca birbirini takip edecek şekilde stres kombinasyonları denenmiştir.

63°C'de 15 dakikalık adaptasyon denemesinde tek tek uygulanan subletal stres koşulları ve süreleri; %10 NaCl ile 1,5 saatlik ozmotik şok, pH 5,5'de 1,5 saatlik asit şoku şeklindedir. Bu denemede ardışık olarak uygulanan stres koşulları ve süreleri ise; %10 NaCl'de 1,5 sa + pH 5,5'de 1,5, %10 NaCl'de 1,5 sa + 44°C'de 60 dk, pH 5,5'de 1,5 sa + 44°C'de 60 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Skandamis et al., 2008). Canlı kalan koloni sayısı, TSAYE, Palcam ve Oxford Agar besiyerlerine yayma plaka yöntemiyle ekim yapılarak belirlenmiştir. Çizelge 4.19'da, başlangıçta ortalama 4,70 log₁₀ kob/ml olan bakteri popülasyonundaki, 63°C'de 15 dakikalık letal uygulama sonucundaki değişim, logaritmik olarak verilmiştir.

Çizelge 4.19 Farklı subletal streslerin ardından 63°C'de 15 dakikalık letal uygulama sonrası koloni sayısı (log₁₀ kob/ml ± SD)

Şok uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol	1,15±0,04	1,04±0,06	1,10±0,02
pH	1,35±0,04	1,15±0,04	1,08±0,06
NaCl	2,37±0,01	2,11±0,03	2,13±0,02
NaCl-pH	2,07±0,02	1,93±0,13	1,80±0,06
NaCl-Sıcaklık	1,88±0,03	1,83±0,04	1,81±0,10
pH-Sıcaklık	2,65±0,04	2,49±0,11	2,46±0,07

Çizelge 4.19'da görüldüğü gibi en iyi adaptasyon pH-sıcaklık kombinasyonunda gözlenmiştir. Ozmotik şokun da sıcaklık toleransını artırdığı görülmektedir.

Çizelge 4.20'de 63°C'de 15 dakikalık letal uygulama sonucunda, subletal strese maruz bırakılan ve bırakılmayan bakteri popülasyonundaki canlılık oranı % olarak karşılaştırılmıştır. Çizelgede farklı harflerle belirtilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.20 Farklı subletal streslerin 63°C'de 15 dakikalık termal toleransa etkisi ($p < 0,05$)

Şok uygulamaları	% Canlı kalan bakteri	
Kontrol	24,47±0,13	A
pH	28,72±0,08	B
NaCl	50,43±0,09	C
NaCl-pH	44,04±0,11	D
NaCl-Sıcaklık	40,00±0,17	E
pH-Sıcaklık	56,38±0,27	F

Asit stresi denemeleri için laktik ve sitrik asit kullanılmıştır. Letal asit konsantrasyonu olarak pH 3,0, süre olarak 2 saat seçilmiştir. Bakteri kültürünün asit şoku için, laktik veya sitrik asitle pH'ları 4,5; 5,0; 5,5 ve 6,0 olarak ayarlanmış TSBYE besiyerlerinde inkübasyonunun ardından letal pH'a toleransı incelenmiştir. Kontrol grubu olan kültür pH 7,3 olan normal TSBYE besiyerinde geliştirilmiştir (Caggia et al., 2009; Adriaio et al., 2008; Hassani et al., 2007; Faleiro et al., 2003).

Çizelge 4.21'de, laktik asit ile farklı pH'lara ayarlanmış TSBYE besiyerinde 24 saatlik inkübasyonun ardından TSA, Oxford ve Palcam besiyerlerindeki *L. monocytogenes* sayım sonuçları görülmektedir. İnkübasyonun ardından asit stresine uğratılmış kültürler ve kontrol grubu, pH 3,0'da 2 saatlik letal uygulamaya maruz bırakılmış ve tekrar sayım yapılmıştır (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.21 24 saatlik subletal laktik asit stresi sonrası *L. monocytogenes* sayım sonuçları (\log_{10} kob/ml \pm SD)

Şok asit uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol (pH 7,3)	7,14 \pm 0,11	7,19 \pm 0,06	7,26 \pm 0,04
pH 4,5	4,04 \pm 0,06	3,87 \pm 0,02	3,81 \pm 0,03
pH 5,0	4,75 \pm 0,05	4,62 \pm 0,06	4,62 \pm 0,01
pH 5,5	4,86 \pm 0,02	4,57 \pm 0,04	4,63 \pm 0,04
pH 6,0	4,93 \pm 0,02	4,86 \pm 0,13	4,90 \pm 0,01

Çizelge 4.22 Letal laktik asit uygulaması sonrası koloni sayısı (\log_{10} kob/ml \pm SD)

Şok asit uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol (pH 7,3)	1,02 \pm 0,09	0,69 \pm 0,12	0,75 \pm 0,21
pH 4,5	1,33 \pm 0,09	1,13 \pm 0,09	0,90 \pm 0,08
pH 5,0	1,99 \pm 0,01	1,66 \pm 0,03	1,56 \pm 0,06
pH 5,5	2,00 \pm 0,02	1,78 \pm 0,12	1,68 \pm 0,04
pH 6,0	1,71 \pm 0,11	1,06 \pm 0,08	0,95 \pm 0,07

Çizelge 4.21 ve 4.22 incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerin letal laktik asit koşullarından çok fazla etkilendiği ve başlangıç popülasyonunda yaklaşık 6 \log_{10} kob/ml gibi önemli bir azalma olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.23'de pH 3,0'da 2 saatlik letal laktik asit uygulaması sonucunda, subletal strese maruz bırakılan ve bırakılmayan bakteri popülasyonundaki canlılık oranı % olarak karşılaştırılmıştır. Çizelgede farklı harflerle belirtilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). En yüksek asit adaptasyonun pH 5,0'da stres uygulaması yapılmış grupta olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak pH 5,0 ve pH 5,5 arasında önemli fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.23 Subletal asit stresinin letal laktik asit toleransına etkisi ($p < 0,05$)

Şok uygulamaları	% Canlı kalan bakteri	
Kontrol (pH 7,3)	14,25±0,08	A
pH 4,5	32,96±0,14	B
pH 5,0	41,98±0,06	C
pH 5,5	41,10±0,04	C
pH 6,0	34,64±0,16	D

Çizelge 4.24’de, sitrik asit kullanılarak farklı pH’lara ayarlanmış TSBYE besiyerinde, 24 saatlik inkübasyonun ardından TSAYE, Oxford ve Palcam besiyerlerindeki *L. monocytogenes* sayım sonuçları görülmektedir. İnkübasyonun ardından asit stresine uğratılmış kültürler ve kontrol grubu, pH 3’te 2 saatlik letal uygulamaya maruz bırakılmış ve tekrar sayım yapılmıştır (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.24 24 saatlik subletal sitrik asit stresi sonrası *L. monocytogenes* sayım sonuçları (\log_{10} kob/ml \pm SD)

Şok asit uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol (pH 7,3)	7,71±0,09	7,60±0,04	7,46±0,04
pH 4,5	3,51±0,01	3,43±0,03	3,38±0,10
pH 5,0	5,57±0,07	5,50±0,12	5,54±0,06
pH 5,5	5,58±0,05	5,52±0,05	5,50±0,12
pH 6,0	6,64±0,10	6,56±0,07	6,40±0,05

Çizelge 4.25 Letal sitrik asit uygulaması sonrası koloni sayısı (\log_{10} kob/ml \pm SD)

Şok asit uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol (pH 7,3)	1,77 \pm 0,04	1,65 \pm 0,05	1,51 \pm 0,05
pH 4,5	1,04 \pm 0,06	0,77 \pm 0,10	1,11 \pm 0,05
pH 5,0	2,28 \pm 0,01	2,26 \pm 0,06	2,27 \pm 0,11
pH 5,5	2,30 \pm 0,03	2,31 \pm 0,04	2,30 \pm 0,01
pH 6,0	2,61 \pm 0,12	2,45 \pm 0,03	2,48 \pm 0,03

Çizelge 4.24 ve 4.25 incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerin letal sitrik asit koşullarında inkübasyonunun ardından, başlangıç popülasyonunda laktik asitte olduğu gibi yaklaşık 6 \log_{10} kob/ml gibi önemli bir azalma olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.26'da pH 3,0'da 2 saatlik letal sitrik asit uygulaması sonucunda, subletal strese maruz bırakılan ve bırakılmayan bakteri popülasyonundaki canlılık oranı % olarak karşılaştırılmıştır. Çizelgede farklı harflerle belirtilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). En yüksek asit adaptasyonun pH 5,5'de stres uygulaması yapılmış grupta olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak pH 5,0 ve pH 5,5 arasında önemli fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.26 Subletal asit stresinin letal sitrik asit toleransına etkisi ($p < 0,05$)

Şok uygulamaları	% Canlı kalan bakteri	
Kontrol (pH 7,3)	22,91 \pm 0,08	A
pH 4,5	29,60 \pm 0,14	B
pH 5,0	40,90 \pm 0,15	C
pH 5,5	41,15 \pm 0,04	C
pH 6,0	39,27 \pm 0,10	D

Sıcaklık adaptasyon denemelerinde olduğu gibi asit adaptasyon denemelerinde de farklı stres koşullarının etkisi incelenmeye çalışılmıştır. pH 3,0'da 2 saatlik letal laktik asit uygulaması öncesi, kültürler %10 NaCl ile 1,5 saatlik ozmotik şok, %10 NaCl'de 1,5 sa ozmotik şok ardından pH 5,5'de 1,5 sa asit şoku ve pH 5,5'de 1,5 sa asit şoku ardından, 44°C'de 60 dk sıcaklık stresi uygulanmıştır (Skandamis et al., 2008; Hassani et al., 2007). Canlı kalan koloni sayısı, TSAYE, Palcam ve Oxford Agar besiyerlerine yayma plaka yöntemiyle ekim yapılarak belirlenmiştir. Çizelge 4.27'de, başlangıçta ortalama 5,70 log₁₀ kob/ml olan bakteri popülasyonundaki, pH 3,0'da 2 saatlik letal laktik asit uygulaması sonucundaki değişim, logaritmik olarak verilmiştir.

Çizelge 4.27 Farklı subletal streslerin ardından pH 3,0'da 2 sa letal laktik asit uygulaması sonrası koloni sayısı (log₁₀ kob/ml ± SD)

Şok uygulamaları	Besiyeri		
	TSAYE	Oxford	Palcam
Kontrol	1,68±0,04	1,55±0,06	1,56±0,03
NaCl-pH	1,80±0,12	1,78±0,02	1,68±0,14
NaCl	3,17±0,02	2,97±0,10	2,91±0,05
pH-Sıcaklık	3,53±0,05	3,32±0,06	3,29±0,04

Çizelge 4.28 Farklı subletal streslerin pH 3,0'da 2 sa letal laktik asit toleransına etkisi (p<0,05)

Şok uygulamaları	% Canlı kalan bakteri	
Kontrol	29,24±0,13	A
NaCl-pH	31,58±0,06	AB
NaCl	55,61±0,12	C
pH-Sıcaklık	61,93±0,25	D

Çizelge 4.27’de görüldüğü gibi en iyi asit adaptasyonu pH-sıcaklık kombinasyonunda gözlenmiştir. Ozmotik şokun da tek başına asit toleransını oldukça artırdığı görülmektedir. NaCl-pH uygulamasının ise önemli bir artış sağlamadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.28’de pH 3,0’da 2 saatlik letal laktik asit uygulaması sonucundaki, subletal strese maruz bırakılan ve bırakılmayan bakteri populasyonundaki canlılık oranı % olarak karşılaştırılmıştır. Çizelgede farklı harflerle belirtilen değerler arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$). Bu tablodan da NaCl-pH uygulamasının önemli bir geri kazanım sağlamadığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

5.1 Metot Validasyonu

Gıdaların mikrobiyal analizleri, gıda güvenliğinin önemli bir parçasıdır. Gerek kontrol otoriteleri gerekse gıda üreticileri, gıda zincirinde meydana gelebilecek riskleri gözlemek amacıyla mikrobiyal analizlerden yararlanırlar. ISO, BAM, AOAC gibi standart metotlar, kontrol otoritelerince doğruluğu kabul edildiğinden referans metot olarak adlandırılırlar. Bu referans metotlar genellikle, mikroorganizmaları seçici ortamlarda üretilip, diğer florayı baskılamayı hedefleyen, sayım ya da tespiti yönelik kültürel metotlardır. Gıda mikrobiyolojisinde, dünyada birçok laboratuvar tarafından, özellikle kontrol otoriteleri tarafından ortak olarak kullanıldıkları için “altın standartlar” olarak kabul görmektedir. Bu yöntemler, çok büyük altyapı yatırımı gerektirmez, kullanılan malzemelerin temini ucuz ve kolaydır ancak gerekli katı ve sıvı ortamları ve kimyasalları hazırlamak oldukça zaman alıcı ve yorucudur. Analizin tüm aşamaları insan gücüne dayalıdır ve sonuç almak için daha uzun süreye ihtiyaç duyulur. Oysa günümüzde gerek üretim aşamalarında gıda güvenliğini tehlikeye atacak durumlar karşısında hızlı önlem alabilmek, gerekse ithalat-ihracat ürünlerinin hızla sevkiyatını gerçekleştirebilmek için daha hızlı sonuç alınabilecek yöntemlere yönelme gereksinimi ortaya çıkmıştır. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı metotlar, alternatif metot olarak adlandırılmaktadır. Alternatif metotlar, son yirmi yıldır mikrobiyolojide birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak bu metotların kullanımına geçilmeden önce, altın standartlarla karşılaştırılarak güvenilirliği kontrol edilmelidir (Jasson et al., 2010).

Bir validasyon çalışması, aynı örneğin alternatif metot kullanılarak analize alınmasından elde edilen sonuç ile referans metot kullanılarak analize alınmasından elde edilen sonuç arasındaki uyumunun derecesini kapsar. ISO 16140 standardına göre, kalitatif yöntemlerin validasyonunda, rölatif doğruluk, rölatif özgüllük, rölatif duyarlılık ve rölatif tespit limiti temel parametrelerdir (Anon., 2003).

Çalışmamızda, ELFA (Vidas) ve PCR (Dupont Bax Q7) alternatif metotlarının referans metot olan ISO 11290-1 metodu ile uyumlarının derecesi ISO 16140:2003 validasyon prosedürü kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır.

100 gıda örneği kullanılarak yapılan paralel çalışmalar sonucunda, ELFA (Vidas) için rölatif doğruluk %97,00, rölatif özgüllük %96,30, rölatif duyarlılık %97,83; PCR (Dupont Bax Q7) için rölatif doğruluk %99,00, rölatif özgüllük %98,15, rölatif duyarlılık %100 olarak bulunmuştur. Afnor (2004) tarafından Vidas ile yapılan validasyon çalışmasında, rölatif doğruluk %99,10, rölatif özgüllük %98,80, rölatif duyarlılık %99,40 olarak bulunmuştur. Prade et al., (2009), Avrupa Komisyonu tarafından düzenlenen gıda güvenliği sempozyumunda, Vidas ve ISO metotlarını kullanarak yaptıkları *L. monocytogenes* izolasyon çalışması sonuçlarını rölatif doğruluk %89,2, rölatif özgüllük %100, rölatif duyarlılık %88,9 şeklinde sunmuşlardır. Silbernagel et al. (2004), Dupont Bax Q7 ile gerçekleştirdikleri denemede et ürünleri ve süt ürünleri için ayrı ayrı validasyon çalışmaları yapmışlar, sonuçları et ürünleri için rölatif doğruluk %92, rölatif özgüllük %100, rölatif duyarlılık %96, süt ürünleri için rölatif doğruluk %96, rölatif özgüllük %100, rölatif duyarlılık %98 olarak belirtmişlerdir.

Yapılan tespit limiti çalışmalarında düşük ve orta seviye olmak üzere iki seviyede spike yapılmıştır. Bir grup ise kontrol olarak bırakılmıştır. Bulunan tespit limitleri, süt ürünleri için 0,43-2,9 EMS/g, et ürünleri için 0,11-4,60 EMS/g, su ürünleri için 0,23-4,60 EMS/g, bitkisel ürünler için ise 0,11-0,43 EMS/g'dır. Alternatif metotlar ve referans metot arasında fark olup olmadığını belirlemek için Siegel'in Ki-kare (χ^2) testi yapılmıştır. %95 güven aralığında, elde edilen tüm sonuçlar $\chi^2 < 3,84$ olduğundan, metotlar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Yaptığımız validasyon çalışmasında elde ettiğimiz veriler ışığında, gıdalardan *L. monocytogenes* izolasyonunda kullanılan iki alternatif metot olan ELFA ve PCR metotlarının, referans metot olan ISO 11290-1 ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Denemelerde kullanılan ISO 11290-1 metodu, klasik kültürel metottur. Bu metot iki zenginleştirme aşamasını içermektedir. Ön zenginleştirme, seçici olmayan, zarar görmüş ya da az sayıdaki hedef mikroorganizmanın geri kazanımını ve çoğalmasını amaçlamaktadır. İkinci zenginleştirme aşaması ise seçici olan, rekabetçi floranın baskılanmasını, hedef mikroorganizmanın ise tespit edilebilir seviyeye ulaşmasını amaçlamaktadır. Kullandığımız ELFA ve PCR metotlarında da bu iki zenginleştirme aşaması mevcuttur. Klasik kültürel metotta, zenginleştirme basamaklarının ardından, seçici ayırt edici katı besiyerleri (Oxford,

Palcam vb.) kullanılarak *L. monocytogenes*'in izolasyonu hedeflenmektedir. Bu aşamada zenginleştirilmiş kültürden çizgi ekimiyle besiyerlerine inokülasyon yapılmaktadır. Çizgi ekim tekniğinin doğru şekilde gerçekleştirilmesi ve kullanılan katı besiyerlerinin doğru şekilde hazırlanması izolasyon için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle kullanılan ayırt edici besiyerlerinin her hazırlamada, referans kültürler kullanılarak negatif ve pozitif kalite kontrolünün yapılması gerekmektedir. Bu besiyerlerinde şüpheli koloniler geliştiğinde, bu koloniler genel besiyeri kullanılarak saflaştırılmakta ve ardından biyokimyasal ve serolojik tanımlama testleri uygulanmaktadır. Biyokimyasal testler için kit kullanılmıyorsa, bu testlerin hazırlanması ve uygulanması oldukça uzun zaman ve emek gerektirmekte, yorumlama için de dikkat ve tecrübeye ihtiyaç duyulmaktadır. Oysa kullandığımız ELFA ve PCR metotlarında, zenginleştirme aşaması ardından mikroorganizmanın varlığı ya da yokluğu kısa süre içerisinde, otomatize sistemlerle tespit edilebilmektedir. Her iki sistemde de kitler içerisinde bulunan negatif ve pozitif standartlar ile hem kullanılan kitlerin kalitesi hem de cihaz aşamasının düzgün gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol altında tutulmaktadır.

Çalışmamızda uygulanan üç metodun da bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Klasik kültürel metot çok zaman alıcıdır ve iş gücü gerektirir ancak düşük maliyetlidir. PCR ve ELFA yöntemleri daha hızlıdır ancak özel cihazlarla yapıldığından mali açıdan yatırım gerektirir, kullanılan kitler daha pahalıdır. Kültürel metotta kullanılan besiyerleri birçok tedarikçi firmadan sağlanabilir, diğer metotlar için sadece belli sayıda tedarikçi mevcuttur. Klasik metotta sonuçların yorumlanması için çok tecrübeli personele ihtiyaç vardır. Diğer metotlarda sonuç pozitif veya negatif şeklinde cihaz tarafından otomatik olarak verilir. Geriye dönük izlenebilirlik açısından cihazlarla yapılan alternatif metotlar daha avantajlıdır. Cihaz kayıtlarından analizin yapıldığı tarih, analiz sonucu, analizi gerçekleştiren personel, kullanılan kitlerin lotu gibi bilgilere kolaylıkla ulaşılabilir. Cihazlarla çok sayıda örnek aynı anda analize alınıp aynı anda sonuçlandırılabilen, ayrıca farklı analizler de aynı anda yapılabilir. Klasik metot, her türlü gıdadan *L. monocytogenes* izolasyonu için uygundur. ELFA ve PCR metodunda bazı kısıtlamalar söz konusu olabilmektedir. Bazı durumlarda ölü hücreler pozitif sonuca sebep olmaktadır. Kakao, kahve gibi çok koyu pigmentli gıdalarda, cihazlar doğru floresan okuma yapamadığından ekstra işlemlere gerek duyulabilmektedir. Özellikle PCR ile çalışılırken, gıda partikülleri soruna yol açtığından küçük gözenekli filtreleri bulunan homojenizasyon poşetlerine ve daha hassas pipetlemeye ihtiyaç duyulmaktadır. Rekabetçi floranın

çok yoğun olduğu çiğ kanatlı etlerinde, yanlış pozitifler meydana gelebilmektedir. Bu nedenlerden ötürü alternatif metotlarda çıkan pozitif sonuçların kesinlikle klasik kültürel metotlarla doğrulanması gerekmektedir. Gıdalarda kıvam artırıcı olarak kullanılan katkı maddeleri tıkanmaya neden olduğundan, cihazlarda çalışılmamaktadır. Cihazlarda analiz sırasında güç kaynağı kesintisi vb durumlar ortaya çıktığında, analizlerin cihazdaki aşamalarının tekrarlanması gerektiğinden kit maliyeti artabilmektedir. PCR ve ELFA analizlerinde, gıdanın yapısında kitler içerisinde bulunan reaktif ve enzimleri baskılayacak maddeler bulunmamalıdır. Son yıllarda alternatif metotlar her ne kadar altın çağını yaşıyor olsa da, klasik kültürel metotlara her zaman ihtiyaç olduğu ve bu metotların “altın standart” olmaya devam ettiği unutulmamalıdır. Çizelge 5.1’de metotların avantaj ve dezavantajları kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 5.1 Metotların avantaj ve dezavantajları

Özellikler	PCR	ELFA	Klasik metot
Dayandığı temel	DNA ya da RNA dizileri	Antikor-antijen bağlayıcılar	Fenotipik testler
Duyarlılık	10^2 - 10^3 kob/ml	10^4 - 10^5 kob/ml	1 kob/25 g
Güvenirlilik	A	A	A
Tekrar üretilebilirlik	A	A	D
Süre	2 gün	2 gün	3-7 gün
Otomasyon potansiyeli	A	A	D
Maliyet	D	D	A
Ekipman-alt yapı ve yatırım	D	D	A
Tecrübeli personel	A	A	D
Ölü ve canlı hücrelerin ayırt edilebilmesi	D	D	A
Gıda ile ilgili sınırlamalar	D	D	A
Kontaminasyon riski	A	A	D
Analiz kapasitesi	A	A	D
İş yükü	A	A	D
A: kullanıcı için avantaj			
D: kullanıcı için dezavantaj			

5.2 Stres Adaptasyonu

L. monocytogenes'in önemli bir gıda patojeni olmasının altında, bakterinin düşük sıcaklık, düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi elverişsiz ortamlarda yaşayabilme yeteneği yatmaktadır. Mikroorganizmanın genotipik yapısından kaynaklanan bu direnç mekanizmasının, gıda üretim süreci sırasında ortaya çıkan çeşitli çevresel koşullarla indüklenebilmesi, organizmanın gıda güvenliği açısından oluşturduğu riski artırmış ve araştırmacıları bakterinin stres adaptasyon mekanizmalarını incelemeye yönlendirmiştir.

Çalışmamızda *L. monocytogenes*'in sıcaklık ve asit adaptasyonu üzerine stres koşullarının etkisi in vitro koşullarda araştırılmış, elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş daha önce yapılan çalışmalar da dikkate alınarak, gıda üretim süreci sırasında risk oluşturabilecek durumlar hakkında yorum yapılmaya çalışılmıştır. Deneyde kullanılan sıcaklık, tuz ve asit miktarları ile uygulama süreleri, az pişirilen ürünler, paketleme sonrası yapılan pastörizasyon işlemleri, vakumlanarak uzun süreli düşük sıcaklıkta pişirme yöntemi (sous-vide) tipi üretim teknikleri, et ürünlerine uygulanan düşük sıcaklıktaki ısısal işlemler, koruma amaçlı organik asit uygulamaları ve peynir gibi salamura suyunda olgunlaştırma süreçleri göz önüne alınarak belirlenmiştir (Ikeda et al., 2003; Samelis et al., 2002, Ingham et al., 2005; Osaili et al., 2006).

Termal tolerans ile ilgili denemelerde sıcaklık, asit ve ozmotik stresler ile bunların bir arada uygulanması sonucu oluşan adaptasyon incelenmiştir. 55°C'de 1 sa letal sıcaklık öncesi oluşturulan, sıcaklık stres koşullarından en yüksek adaptasyon, 48°C'de 30 dk uygulaması ile elde edilmiştir (%70,31). 44°C'de 60 dk ile elde edilen 69,08'lik adaptasyon da oldukça iyi olmasına karşın, istatistiksel olarak aynı sıcaklıkta 120 dk uygulama ile de benzer sonuç elde edilmiştir. Lin and Chou (2004) ve Lou and Yousef (1997), 55°C'de 60 dk letal sıcaklık öncesi uyguladıkları 45°C-1 sa sıcaklık şoku uygulamasında benzer sonuçları elde etmişlerdir. Ancak 48°C-10 dk sıcaklık şokunda kontrol hücreleri ile önemli bir fark oluşmadığını gözlemlemişlerdir. Bu durum, kullanılan bakteri suşu ile bağlantılı olabilir. Linton et al., 1990'da yaptıkları denemelerde, 55°C'de 50 dk öncesi uyguladıkları 40-44 ve 48°C'lik sıcaklık şoklarından, en iyi sonucu 48°C ile elde etmişlerdir. Yine Linton et al. (1992), 48°C-10 dk sıcaklık şoku ile D₅₅ değerinin (1 log₁₀ kob/g düşüş için gereken süre) 2,2 kat arttığını belirtmiştir. 63°C'de 15 dakikalık letal uygulamada ise en iyi adaptasyon, 44°C, 60 dk'lik uygulamada görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda, *L. monocytogenes*'in termal toleransının, bakteri subletal sıcaklıklara maruz kaldığında arttığı görülmektedir. Bu durum, gıda endüstrisi açısından önemle dikkate alınması gereken bir konu olmaktadır.

İstenen merkezi sıcaklığa yavaş yavaş ısıtılarak getirilen et ve et ürünlerinde, bu ısıtma aşaması sıcaklık şoku cevabının oluşmasına neden olabilmekte ve mikrobiyal hücrelerin sıcaklığa karşı dirençleri yükselebilmektedir. Yani yavaş sıcaklık yükselmesi artan sıcaklık toleransını ortaya çıkarmaktadır. Sous-vide yöntemi ile yapılan ürünlerde de aynı risk söz konusu olmaktadır (Sergelidis and Abraham, 2009). Paketleme sonrası 70-100°C'de 60-120 s sıcak su ile yapılan pastörizasyon işlemlerinde de gıdanın merkezinde olması gerekenden daha düşük sıcaklıklar meydana gelebilmektedir (Ingham et al., 2005).

Katı gıdalarda, parçalar arasındaki sıcaklık geçişi yavaş olduğundan, bu gıdalarda bulunan mikroorganizmalar son sıcaklığa ulaşıncaya kadar geçen sürede bir sıcaklık gradientine maruz kalarak sıcaklık toleranslarında artış meydana gelebilir. Yine yapılarındaki bazı bileşiklerin termal hassasiyetinden dolayı yavaş ısıtılması gereken sıvı yumurta gibi bazı sıvı gıdaların da üretim prosesi sırasında bir sıcaklık gradientine karşı sıcaklık şoku cevabı ortaya çıkabilmektedir (Hassani et al., 2005; Manas et al., 2003).

Gıdanın yapısından kaynaklanan bazı faktörler de mikrobiyal hücrelerin sıcaklık toleransını artırabilmektedir (yağ miktarı, su aktivitesi vb.). Bu faktörler, termal proses sırasında ortaya çıkan pişirme süresi ve şiddeti, nem, ısıtma/soğutma oranları gibi kompleks çevresel koşullarla birleşerek mikroorganizmanın yok edilmesini etkileyebilmektedir (Sergelis and Abraham, 2009).

Laktik asit, propiyonik asit, sitrik asit ve asetik asit gibi kısa zincirli organik asitler ve bunların tuzlarının antimikrobiyal ajan olarak gıdalarda kullanımı oldukça yaygındır. Bu organik asitler direkt gıdanın içerisine konulabildiği gibi, gıda yüzeylerine spreylenecek ya da gıdanın asit içerisine daldırılması şeklinde uygulanabilmektedir. Bazı gıda patojenleri belli seviyelerde kısa zincirli organik ya da inorganik (HCl) asitlere maruz kaldıklarında, normalde öldürücü olan asit koşullarına daha dayanıklı hale gelebilmektedirler. Gıdada veya gıda üretim alanlarında asit toleransı kazanmış patojenlerin bulunması gıda güvenliği açısından tehlike oluşturabilecek bir durumdur. Buna ek olarak, *L. monocytogenes*'in düşük pH koşullarında canlılığını sürdürebilme kabiliyeti,

mikroorganizmanın virulansı üzerinde de önemli rol oynamaktadır. Çünkü bu bakteri, insan sindirim sisteminde ve makrofajlar içerisinde de benzer ekstrem koşullarla karşılaşmakta ve canlılığını sürdürebilmektedir (Cotter et al., 2001).

Asit toleransı ile ilgili yaptığımız denemelerde, subletal asit şokunun etkisi incelenmiştir. Subletal laktik ve sitrik asit uygulamalarında, pH 3,0'da 2 saatlik letal uygulamaya karşı en iyi toleransın pH 5,0 ve pH 5,5'de geliştirilen bakterilerde görüldüğü gözlenmiştir. Laktik asit için kontrol grubunda canlılık oranı %14,25 iken pH 5,0'da şok uygulanan grupta %41,98, pH 5,5'de şok uygulanan grupta ise %41,10 canlılık tespit edilmiştir. Sitrik asit için de benzer durum söz konusudur. Kontrol grubu %22,91 canlılık gösterirken pH 5,0 ve 5,5'de subletal asit şokuna uğratılan gruplar sırasıyla %40,90 ve 41,15 canlılık göstermiştir. Okereke and Thompson (1996), sitrik asitle pH 5,4'e ayarlanmış besiyerinde inkübe ettikleri *L. monocytogenes* hücrelerinin pH 3,35'deki 4 saatlik letal uygulama sonucunda, kullanılan organik asitin türü fark etmeksizin önemli ölçüde resistant kazandıklarını saptamışlardır. Pickett and Murano (1996), bu kez sitrik asit ile pH 5,0'da yaptıkları subletal uygulama sonucunda, pH 2,8'lik letal sitrik aside direncin arttığını gözlemlemişlerdir. Yine aynı yıl laktik asit kullanılarak yapılan adaptasyon çalışmasında, pH 5,5'de 60 dk uygulanan asit şoku sonrası *L. monocytogenes* kültürünün 2 saatlik pH 3,5'deki letal uygulamaya karşı resistantlık kazandığı görülmüştür (O'Driscoll et al., 1996). Gahan et al. (1996), pH 5,5'de laktik asit ile şoka uğrattıkları organizmayı süzme peynir (pH 4,71), yoğurt (pH 3,90), portakal suyu (pH 3,76) ve salata sosu (pH 3,0) içerisine inoküle ettiklerinde, mikroorganizmanın üremesini artırarak sürdürdüğünü belirtmişlerdir.

Gerek yaptığımız denemelerin sonuçları gerekse diğer araştırmacıların konu ile ilgili yaptıkları çalışmalar, asidik koşullara adapte olmuş hücrelerin öldürücü pH koşullarında üreyebildiğini ya da canlılığını sürdürebildiğini göstermektedir. Geçmişte portakal suyu, limon suyu gibi ticari olarak hazırlanan meyve sularının uygulanan ısı işlem ve asiditeleri nedeniyle patojenler yönünden tehlike oluşturmadığı düşünülürdü. Oysa adaptasyon ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu, bu tür asidik gıdaların da patojenler yönünden analize alınmasının gerekliliğini göstermiştir.

Üretim aşamaları sırasında birçok işlem, gıda patojenlerinin asit adaptasyonu kazanmasına neden olabilmektedir. Gıda ya da gıda katkı maddelerine direkt olarak eklenen asitleştirici ajanlar mikroflorada şok etkisi

yaratarak, mikrofloranın asitlere karşı daha fazla resistant hale gelmesine yol açabilmektedir. Örneğin laktik asit, peynir telemesine, tuzsuz tereyağına, yumurta beyazı ve sarısına, biraya, süt tozu içeren bebek mamalarına aroma ve kaliteyi artırmak için ilave edilmektedir. Fermente gıdalarda ise durum biraz farklıdır. Laktik asit bakterileri, ürettikleri metabolitlerle uzun zaman içerisinde pH'yı düşürdükleri için bir pH gradientinin oluşması ve florada bulunabilecek patojenlerin de bu durum sonucu asit toleransı kazanmaları söz konusu olabilmektedir. Et karkaslarının organik asitlerle spreyleme yöntemi ile sanitize edilmesi, et florasındaki bakterilerde asit adaptasyonu cevabının oluşmasına neden olabilmektedir (Davidson and Harrison, 2003).

Gıda üretiminde önemli bir diğer durum çapraz korumadır. Üretim aşamalarında hem gıdanın kendi florasında hem de üretim alanında bulunabilecek patojen bakteriler, temizlik ve dezenfeksiyon ajanları, tuz, açlık, yetersiz ısı, fermentasyon gibi çeşitli stres faktörleri ile karşılaşmakta, bir kısmı elimine olurken bir kısmı da direnç kazanmaktadır.

Çapraz koruma ile ilgili yaptığımız çalışmalarda, bakteri hücrelerine 63°C'de 15 dakikalık letal sıcaklık öncesi, pH-sıcaklık kombinasyonu uygulandığında bu hücrelerin sayısının kontrol hücrelerinden, yaklaşık 1,5 log₁₀ kob/ml yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç, yeterli ısıl işlem görmeyen ve ılıman asitli gıdaların gıda güvenliğini tehlikeye düşürebileceğini düşündürmektedir. Cheddar peyniri (pH 5,16-5,25) ve diğer yumuşak peynirler (pH 5,5; %5,8 NaCl), laktik ve asetik asit gibi organik asitlerle yüzey dezenfeksiyonu yapılan et ürünleri (pH 4,7-5,92) *L. monocytogenes* hücrelerinin adaptasyonunu tetikleyen ortamlardır (Skandamis et al., 2008). Tek başına uygulanan %10'luk NaCl şokunun ise %50,43 gibi oldukça yüksek canlılık oranı sağladığı tespit edilmiştir (Kontrol %24,47). Bu oran tek başına uygulanan ve en iyi adaptasyon sağlayan 44°C, 60 dk'lik uygulamada elde edilen canlılık oranından (%49,80) daha yüksektir. Bu sonuç, ozmotik şokun *L. monocytogenes*'in sıcaklık adaptasyonu üzerine önemli etkisi olduğunu kanıtlar. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir (Skandamis et al., 2008; Doyle et al., 2001; Jorgensen et al., 1995). Sıcaklık toleransında olduğu gibi pH-sıcaklık kombinasyonu letal laktik asit (pH 3,0, 2 sa) toleransını da artırmıştır. Stres uygulanan hücrelerin sayısı uygulanmayanlara göre 2 log₁₀ kob/ml civarında artış göstermiştir. Ozmotik şokun da tek başına asit toleransını oldukça artırdığı görülmektedir (%55,61). Bu nedenle, düşük ısıl işlem görmüş gıdalara yüksek ozmolariteye sahip peynir, salamura veya salamurada olgunlaştırılan ürünlerden

L. monocytogenes kontaminasyonu, düşük tuz konsantrasyonu olan gıda veya çevrelerden kontaminasyondan çok daha büyük risk oluşturmaktadır (Cox et al., 1989; Bolton and Frank, 1999; Faleiro et al., 2003).

6. ÖNERİLER

Son yıllarda, gıda endüstrisinin küreselleşmesi, ithal ürünlere ve etnik gıdalara olan talebin artışı, değişen beslenme alışkanlıkları nedeniyle tüketicilerin az işlem görmüş, tüketime hazır ya da dondurulmuş gıdalara yönelmesi gıda patojenlerinin insidansında artışa neden olmuştur. *L. monocytogenes* bir gıda patojeni olarak, 20. yüzyılda ortaya çıkmış ve yüksek ölüm vakaları ile sonuçlanan listeriozis salgınlarına neden olmuştur. Gerek sağlık gerekse üretim alanında önemli ekonomik kayıplara yol açması sebebiyle araştırmacılar, bu mikroorganizmanın yayılımını kontrol altına alabilmek için koruyucu önlemler geliştirmeye yönelmişlerdir. Devam eden araştırmalar, bu patojenin düşük sıcaklık, asidik pH ve ozmotik stres gibi suboptimal koşullarda nasıl hayatta kalabildiğini ve üreyebildiğini deşifre etmeye odaklanmıştır.

Mikroorganizmanın fizyolojisinin anlaşılması ve bu fizyolojik karakterlerin dayandığı moleküler temellerin aydınlatılmasının, listeriozis salgınlarının sistemli bir şekilde gözlenmesinin, gıda endüstrisinde HACCP önlemlerinin alınması ve gıda güvenliği sistemlerinin kurulmasının, gıda üretim alanlarının planlı şekilde denetlenmesi ve ürünün mikrobiyolojik kontrollerinin düzenli sıklıkta yapılmasının, bu patojenin kontrolü için fayda sağlayacağı düşüncesindeyiz. Başta konuyla ilgili devlet kurumları olmak üzere akademisyenlerin ve gıda üreticilerinin bir araya gelerek ortak çalışmalar yapması, kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için daha yararlı olacaktır. Bu zincirin son halkasında yer alan tüketicilerin de, bu konuda bilinçli ve dikkatli olması gıda güvenliğinin sağlanması için kaçınılmaz bir gerekliliktir.

Gıda üretim aşamalarında uygulanan HACCP sistemlerinde, zaman alıcı olmaları ve dolayısıyla üretimi aksatmaları nedeniyle mikrobiyolojik analizler çok tercih edilmemektedir. Mikrobiyolojik analizler yapıyor olsa da bazı durumlarda sevkiyat için analiz sonucu beklenememektedir. Olumsuz çıkabilecek sonuçlar, hem tüketici sağlığı açısından risk oluşturabilmekte hem de geri çağırma yapmak zorunda olan üretici için büyük maddi kayıplara yol açmaktadır. Gıda mikrobiyolojisinde hızlı yöntemlerin kullanılması, gıda güvenliği açısından önem taşımaktadır. Mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, yeni otomatik sistemlerin geliştirilmesi, yapılacak modifikasyonlarla analiz süresinin minimuma indirilmesi ve artan talebe karşılık maliyetlerin düşürülmesi sayesinde, önümüzdeki yıllarda gıda mikrobiyolojisinde bu tür hızlı metotların daha yaygın olarak kullanılacağı görüşündeyiz. Ancak gerek bağımsız

kontrol laboratuvarlarında gerekse üretim içerisinde bulunan kalite kontrol laboratuvarlarında, hızlı olduğu kadar amaca uygun ve güvenilir metotların seçilmesi gerektiği inancındayız.

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan metodun hassasiyeti kadar analiz sonucunu etkileyebilecek birçok parametre olduğu unutulmamalıdır. Mikrobiyoloji analizlerinde ortaya çıkan belirsizliklerin çoğunun örnek matriksinden kaynaklandığı unutulmamalıdır. Mikroorganizmanın gıdanın üretim, paketlenme ve saklama aşamalarında hangi koşullara maruz kaldığı, bu aşamalarda zarar görüp görmediği izolasyonu etkileyen önemli bir parametredir. Gıda örneğinin büyük bir partiden alınırken, partiyi temsil edebilecek şekilde ve miktarda alınması, laboratuvara getirilme aşamasında uygun koşulların sağlanması, laboratuvarında örnek homojenizasyonunun ve analiz aşamalarının tecrübeli personel tarafından yapılması, kullanılan cihazların kalibre ve kontrollü olması, kullanılan besiyeri, kit ve kimyasalların doğru hazırlanması ve saklanması, inkübasyonun uygun sıcaklık ve sürede yapılması, laboratuvar koşullarının çapraz kontaminasyonu önleyecek şekilde düzenlenmiş olması gibi analiz sonucunu etkileyen birçok etken bulunmaktadır. Mikrobiyolojide, özellikle gıda gibi çabuk değişime uğrayan bir örnekle çalışıldığında, analizin tekrarlanması ve doğru sonuçların alınması hemen hemen imkânsız olduğundan, analizi etkileyebilecek bütün koşulların kontrollü olması, sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği açısından zorunludur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adriao, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Andrew, P. W. and Faleiro M.L.,** 2008, Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces, J of Food Microbiology, 123:142-150.
- Afnor,** 2004, Vidas *Listeria monocytogenes* II validation study, France.
- Anon.,** 1997, International Organisation for Standardisation ISO, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*, Part1: Detection Method, , Geneva, ISO 11290-1.
- Anon.,** 2003, Protocol for the validation of alternative methods, International Standard Microbiology of food and animal feeding stuffs, 1st (ed.), ISO 16140.
- Anon.,** 2009, Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, No 2009/6.
- Adak, G. K., Long, S. M. and O'brien, S. J.,** 2002, Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales, 1992 to 2000, Gut. 51: 832-841.
- Arsene, F., Tomoyasu, T. and Bukau, B.,** 2000, The heat shock response of *Escherichia coli*, Int Food Microbiology, 55:3-9.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A. M., Aarnisalo, K., Bjorkroth, J., Mattila-Sandholm, T. and Korkeala, H.,** 1999, Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold -smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing, Applied Environmental Microbiology, 65:150-155.
- Avcıbaşı, Y.,** 2005, Vakum paketli dumanlanmış (füme) balıklarda *Listeria* türlerinin varlığı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Barbosa, W. B., Cabedo, L., Wenderquist, H. J., Sofos, N. J. and Schmidt G. R.,** 1994, Growth variation among species and strains of *Listeria monocytogenes*, J. Food Protection, 57: 765-769.

Baylis, C. L., Jewell, K., Oscroft, C. A. and Brooks, F. L., 2001, Guidelines for establishing the suitability of food microbiology methods, Campden and Chorleywood Food Research Association.

Biomerieux miniVidas User Guide, 2008.

Bolton, L.F. and Frank, J.F., 1999, Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food, Letters Applied Microbiology, 29:350–353.

Bremer, P. J., Osborne, C. M., Kemp, R. A. and Smith, J. J., 1998, Survival of *Listeria monocytogenes* in sea water and effect of exposure on thermal resistance. J. Applied Microbiology, 85:545-553.

Bremer, E. and Krämer, R., 2000, Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria, In Bacterial Stress Responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washinton D.C., American Society for Microbiology, 99-116.

Buchanan, R. L. and Bagi, L. K., 1999, Microbial competition, effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*, Food Microbiology, 16(5):523-529.

Bunning, V.K., Crawford, R.G., Tierney, J.T. and Peeler, J.T., 1990, Thermotolerance *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock, Applied Environmental Microbiology, 56:3216-3219.

Caggia, C., Scifo, G. O., Restuccia, C. and Randazzo, C. L., 2009, Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices, Food Control 20:59-66.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. and Garcia-Fernandez, M. C., 2001, Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection, Int. J. Food Microbiology, 65:75-82.

Cataldo, G., Conte, M.P., Chiarini, F., Seganti, L., Ammendolia, M.G., Superti, F., and Longhi, C., 2007, Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses, J Applied Microbiology, 103:185-193.

- Chakraborty, T., Leimmeister-Wachter, M., Doman, E., Haril, M., Goebel, W., Nichterlein, T. and Notermans, S.,** 1992, Coordinate regulation of the virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriology*, 174:568-574.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M. and Boor, K. J.,** 2008, Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*, *Trends in Microbiology*, 16:388-396.
- Chou, C. C. and Lin Y. D.,** 2004, Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses, *Food Microbiology*, 21:605-610.
- Clouser, C.S., Doores, S., Masl, M.G. and Knabel, S. J.,** 1995, The role of defeathering in the contamination of turkey skin by *Salmonella* species and *Listeria monocytogenes*, *Poultry Science*, 74:723-731.
- Cotter, PD., Gahan, CG. and Hill, C.,** 2001, A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid, *Molecular Microbiology* 40: 465-475.
- Cox, L. J., Kleiss, T., Cordier, J. L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. and Siebenga, A.,** 1989, *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments, *Food Microbiology* 6:49-61.
- Cox, N. A., Bailey, J. S. and Berrang, M. E.,** 1997, The presence of *Listeria monocytogenes* in the integrated poultry industry. *J. Applied Poultry Research*, 6:116-119.
- Cronan, J. E.,** 2002, Phospholipid modifications in bacteria, *Current Opinion Microbiology*, 5:202-205pp.
- Çolak. H., Hampikyan, H., Bingöl, EB. and Ulusoy. B.,** 2007, Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese, *Food Control* 18:576-579.
- Davidson, P. M. and Harrison, M. A.,** 2003, Microbial adaptation to stresses by food preservatives, *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, CRC Pres, New York, 1-19.
- 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, *Applied Environmental Microbiology*, 53:1433-1438.

Doyle, M. E., Mazzota, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W. and Scott, V. N., 2001, Heat resistance of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, 64:410–425.

Drevets, D. A., 1998, *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells, *Infect. Immun.*, 66:232-238.

Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P. and Dousset, X., 1999, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C, *Int. J. Food Microbiology*, 47:33-42.

Dupont Qualicon Bax System User Guide, 2009.

Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P., 2004, Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence, *Annu. Rev. Microbiology*, 58: 587-610.

Dykes, G. A. and Moorhead, S. M., 2000, Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin, *Int. J. Food Microbiology*, 56:161-166.

Erol, İ., 2007, *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*, Pozitif Matbaacılık, Ankara.

Embareck, P. K., 1994, Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods, a review, *Int. J. Food Microbiology*, 23: 17-34.

Farber, J. M., and Brown, B. E., 1990, Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat, *Applied Environmental Microbiology* 56:1584-1587.

Farber, J. M. and Peterkin, P. I., 1991, *Listeria monocytogenes* a food borne pathogen. *Microbiology Review*, 55:476-511.

Farber, J. M. and Peterkin, P. I., 1999, Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products, 505-564. In. Ryser, E. T., Marth, E. H. (ed.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, Marcel Dekker, New York, N. Y.

- Farber, J. M., Sanders, G. W., Dunfield, S. and Prescott, R., 1989**, The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*, Lett. Applied Microbiology, 9:181-183.
- Faleiro, M. L., Andrew, P. W. and Power, D., 2003**, Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods, Int. J. Food Microbiology, 84(2):207-216.
- Fenlon, D. R., 1999**, *Listeria monocytogenes* in the natural environment, 21-37. In Ryser, E. T. and Marth, E. H. (eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety* 2nd (ed.), New York.
- Fenlon, D. R., Stewart, T. and Donachie, W., 1995**, The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks, Lett. Applied Microbiology, 20:57-60.
- Fernández, P. S., George, S. M., Sills, C. C. and Peck, M. W., 1997**, Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*, Int. J. Food Microbiology, 37:37-45.
- Fernández-Garayzábal, J. F., Suárez, G., Blanco, M. M., Gibello, A. and Domínguez, L., 1996**, Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*, Int. J. System. Bacteriology, 46: 832-834.
- Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C. P. and Boor, K. J., 2003**, Role of *Listeria monocytogenes* sigma (B) in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response, Applied Environmental Microbiology, 69:2692-2698.
- Gahan, C. G. M., O'Driscoll, B. and Hill C., 1996**, Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation, Applied Environmental Microbiology, 62:3128-3132.
- Gahan, C. G., O'Mahony, J. and Hill, C., 2001**, Characterization of the groESL operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (gfp and hly) for evaluating in vivo expression. Infect. Immunology 69:3924-3932.

Gahan, C. G. M., and Hill C., 2003, Relationship between stress adaptation and virulence in foodborne pathogenic bacteria, *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, CRC Pres, New York, 1-33.

Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S. and Berche, P., 2000, The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*, *Molecular Microbiology*, 35:1286-1294.

Gandhi, M. and Chikindas, M. L., 2007, *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive, *International Journal of Food Microbiology* 113:1-15.

Genigeorgis, C. A., Oanca, P. and Dutulescu, D., 1990, Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Protection*, 53:282-288.

Hanawa, T., Fuduka, M., Kawakami, H., Hirano, H., Kamiya, S. and Yamamoto, T., 1999, The *Listeria monocytogenes* DnaK chaperone is required for stress tolerance and efficient phagocytosis with macrophages, *Cell Stress Chaperon*, 4:118-128.

Hassani, M., Manas, P., Raso, J., Condon, S. and Pagan, R., 2005, Predicting heat inactivation of *Listeria monocytogenes* under non isothermal treatments, *Journal of Food Protection*, 68:143–736.

Hassani, M., Manas, P., Pagan, R. and Condon, S., 2007, Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs, *International Journal of Food Microbiology* 116:228-238.

Heisick, J. E., Wagner, D. E., Nierman, M. L. and Peeler, J. T., 1989, *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Applied Environmental Microbiology*, 55:1925-1927.

Hill, C. and Gahan, C., 2000, *Listeria monocytogenes*, role of stress in virulence and survival in food, *Irish J Agric Food Res.*, 39:195-201.

Hudson, J. A., 1992, Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*, *Lett. Applied Microbiology*, 14:178-180.

Huss, H. H., Reilly, A. and Ben Embarek, P. K., 2000 Prevention and control of safety hazards in cold smoked salmon production. *Food Control*. 11: 149-156.

ICMSF (International Commission on Microbial Specifications for Foods), 2003, *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of microbial pathogens*, 141p.

Ikeda, J.S., Samelis, J., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N., 2003, Acid adaptation does not promote survival or growth of *Listeria monocytogenes* on fresh beef following acid and nonacid decontamination treatments, *J. Food Protection*, 66:985-992.

Ingham, S.C., Devita, M.D., Wadhwa, R.K., Fanslau, M.A. and Buege, D.R., 2005, Evaluation of small-scale hot-water postpackaging pasteurization treatments for destruction of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat beef snack sticks and natural-casing wieners, *J. Food Protection*, 68:2057-2067.

Jarvis, B., 2008, *Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods*, Academic Press, Amsterdam.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., 2010, Alternative microbial methods: An overview and selection criteria, *Food Microbiology* 27:710-730.

Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A., 2005, Foodborne listeriosis, 591-611p. *Modern Food Microbiology*, 7th (ed.), Springer Science and Business Media, New York, USA.

Jensen, A., 1993a, Excretion of *Listeria monocytogenes* in faeces after listeriosis: rate, quantity and duration, *Medical Microbiology Letter*, 2:176-182.

Jensen, A., 1993b, *Listeria* in faecal and genital specimens, *Medical Microbiology Letter*, 2:125-130.

Jeong, D. and Frank, J., 1994, Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments, *J. Food Protection*, 57:576-586.

Jones, D. and Seeliger, H. P. R., 1991, The Genus *Listeria*., *The Prokaryotes*, Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H., Springer-Verlag, 1598-1616pp.

Jorgensen, F., Stephens, P. J. and Knochel, S., 1995, The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Applied Bacteriology*, 79:274-281.

- Kallipolitis, B. H. and Ingmer, H.**, 2001, *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis, FEMS Microbiology Letter, 204:111-115.
- Kerr, K. G., Rotowan, A., Hawkey, P. M. and Lacey, R. W.**, 1990, Incidence of *Listeria* spp. in pre-cooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunoassay (ELISA), J. Food Protection, 7:606-607.
- Lawlor, K. A.**, 1999, Effect of modified atmosphere packaging on growth of *Listeria monocytogenes* and nonproteolytic *Clostridium botulinum* in cooked turkey, Ph.D. dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA.
- Leistner, L.**, 2000, Basic aspects of food preservation by hurdle technology, Int Food Microbiology, 55:181-186.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P. and Thuault, D.**, 2002, Modeling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH, and organic acid concentration, Int. J. Food Microbiology, 73:219-237.
- Leyer, G.J., Wang, L.-L., Johnson, E.A.**, 1995, Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods, Applied Environmental Microbiology, 61:3752-3755.
- Linton, R. H., Pierson, M. D. and Bishop, J. R.**, 1990, Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sub lethal heat shock, Journal of Food Protection, 53:924-927.
- Linton, R.H., Webster, J.B., Pierson, M.D. and Hackney, C.R.**, 1992, The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A, J. Food Prot. 55:84-87.
- Loncarevic, S., Tham, M. L. D. and Tham, W.**, 1995, Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden, Int. J. Food Microbiology, 26:245-250.
- Lou, Y., and Yousef, A.E.**, 1996, Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses, J Food Protection, 59:465-471.

- Lou, Y., and Yousef, AE.,** 1997, Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors, *Applied Environmental Microbiology*, 63:1252-1255.
- Lyytikäinen, O., Auto, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttil, V. J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H. and Sutonen, A.,** 2000, An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland, *J. Infectious Diseases*, 181:1838-41.
- Manas, P., Pagan, R., Alvarez, I. and Condon, S.,** 2003, Survival of *Salmonella seftenberg* 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments, *Food Microbiology*, 20:593–600.
- Mandin, P., Fsihi, H., Dussurget, O., Vergassola, M., Milohanic, E., Toledoarana, A., Lasa, I., Johansson, J. and Cossart, P.,** 2005, *VirR*, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence, *Molecular Microbiology*, 57: 1367-1380.
- Merrell, DS. and Camili, A.,** 2002, Acid tolerance of gastrointestinal pathogens, *Current Opinion in Microbiology*, 5:51-55.
- McCormick, J. K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K. L., McMullen, L. M., Vederas, J. C., Stiles, M. E. and Vanbelkum, M. J.,** 1998, Genetic characterization and heterologous expression of brochoicin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochotrix campestris* ATCC 43754., *Applied Environmental Microbiology*, 64:4757-4766.
- McClure, P. J., Roberts, T. A. and Oguru, P. O.,** 1989, Comparison of the effects of sodium chloride, pH, and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett. Applied Microbiology*, 9:95-99.
- McKellar, R. C.,** 1994, Use of the CAMP test for the identification of *Listeria monocytogenes*, *Applied Environmental Microbiology*, 60:4219–4225.
- McLauchlin, J.,** 1990, Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis, *Eur. J. Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 9:210-213.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., Mccaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V., 1999, Food related illness and death in the United States, *Emerging Infectious Diseases*, 5:607–625.

Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V. and Berche, P., 1999, ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 31:185-196.

Neidhardt, FC. and Van Bogelen, RA., 2000, Proteomic analysis of bacterial stress response, in *Bacterial Stress Responses*. G. Storz and R. Hengge-Aronis, (Eds.), Washington, DC., American Society for Microbiology Press, 445-452.

Noack, D. J. and Jockel, J., 1993, *Listeria monocytogenes*, its occurrence and significance in meat and meat products, and the application of detection procedures, *Fleischwirtsch*, 73:581–584.

Nolan, D. A., Chamblin, D. C. and Troller, J. A., 1992, Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*, *Int. J. Food Microbiology*, 16:323-335.

O’Driscoll, B., Gahan CG., and Hill C., 1996, Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*, Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence, *Applied Environmental Microbiology* 62:1693-1698.

Ojeniyi, B., Christensen, J. and Bisgaard, M., 2000, Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark, *Epidemiological Infection*, 125:303-308.

Okereke A. and Thompson S.S., 1996, Induced acid-tolerance response confers limited nisin resistance on *Listeria monocytogenes* Scott A, *J. Food Protection*, 59:1003-1006.

Oliver, M., Garmyn, D., Rousseaux, S., Lemaitre, J. P., Piveteau, P. and Guzzo, J., 2005, Truncated internalin A and asymptomatic *Listeria monocytogenes* carriage: in vivo investigation by allelic exchange, *Infection and Immunology*, 73:644-648.

- Osaili, T., Griffis, C.L., Martin, E.M., Beard, B.L., Keener, A. and Marcy, J.A.,** 2006, Thermal inactivation studies of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken-fried beef patties. *J. Food Protection*, 69:1080-1086.
- Palumbo, S. A. and Williams, A. C.,** 1991, Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods, *Food Microbiology*, 8:63–68.
- Pamer, E. G.,** 2004, Immune responses to *Listeria monocytogenes*, *Nature Reviews Immunology*, 4:812-823.
- Peterson, M. E., Pelroy, G. A., Paranjpye, R. N., Poysky, F. T., Almond, J. S. and Eklund, A. M. W.,** 1993, Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging method, *J. Food Protection*, 56(11):938-943.
- PHAC,** Listeriosis outbreaks, (Erişim tarihi:13 Nisan 2010), <http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/archive/archive-eng.php>.
- Phadtare, S., Alsina, J., and Inouye, M.,** 1999, Cold-shock response and cold-shock proteins, *Current Opinion Microbiology*, 2:175-180.
- Pickett, E.L. and Murano, E.A.,** 1996, Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers after exposure to a chemical shock, *J. Food Protection*, 59:374-378.
- Portnoy, D. A., Chakraborty, T., Goebel, W. and Cossart, P.,** 1992, Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis, *Infection and Immunology*, 60:1263-1267.
- Prade, J. M., Cote, D. and Remy, V.,** 2009, A new method for detection of *Listeria monocytogenes* in Food, European Symposium.
- RASFF,** 2009 weekly overview reports, (Erişim tarihi: 20 Eylül 2010), http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_weekly_archives_en.htm.
- Rees, C. E. D. and Barnard, F. M.,** 2001, Cold shock proteins in *Listeria*: Evidence for role of DNA binding proteins in low temperature induction. ISOPOL XIV-International Symposium on Problems of Listeriosis, 13-16 May, Mannheim, 25p.

- Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Suárez, M., Brehm, K., Berche, P. and Vázquezboland, J. A.,** 1996, Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition, *Research in Microbiology*, 147:371-384.
- Rocourt, J. and Bille, J.,** 1997, Foodborne listeriosis, *World Health Statistics Quarterly*, 50:67-73.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C. and Piffaretti, J. C.,** 1992, Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*, *Int. J. Systematic Bacteriology*, 42:171-174.
- Rouquette, C., De Chastellier, C., Nair, S. and Berche, P.,** 1998, The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages, *Molecular Microbiology*, 27: 1235-1245.
- Russell, N. J., Evans, R. I., ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, T.,** 1995, Membranes as a target for stress adaptation, *Int J Food Microbiology* 28:255-261.
- Samelis, J. and Metexopoulos, J.,** 1999, Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and meat processing plant, *Food Microbiology*, 16:465-477.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A. and Smith, C.,** 2001, Influence of the natural microbial flora on the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in a model system of fresh meat decontamination fluids, *Applied Environmental Microbiology*, 67:2410-2420.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. and Smith, G.C.,** 2002, Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum packages, *J. Food Protection*, 65:299-307.
- SAS,** 2001. *SAS User's Guide: Statistics (Version 9.1)*. SAS Institute Inc., Gary, NC.

- Sasahara, K. C. and Zottola, E. A.,** 1993, Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems, *J. Food Protection*, 56: 1022-1028.
- Schuchat, A., Swaminathan, B. and Broome, C. V.,** 1991, Epidemiology of human listeriosis, *Clinical Microbiology, Rev.*, 4:169-183.
- Seeliger, H. P. R. and Jones, D.,** 1986, *Listeria*, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Sneath, P. H. A. et al.(eds), Williams & Wilkins, Baltimore, 1235-1245pp.
- Sergelidis, D. and Abraham A.,** 2009, Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety, *Food Control* 20:1-10.
- Shahamat, M., Seaman, A. and Woodbine, M.,** 1980, Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene*, 246:506-511.
- Sırıken, B., Pamuk, Ş., Özakin, C., Gedikoğlu, S. and Eyigör, M.,** 2006, A note on the incidences of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausage, *Meat Science*, 72: 177-181.
- Silbernagel, K. and Jechorek, R.,** 2004, Evaluation of the Bax system for detection of *Listeria monocytogenes* in foods, *J AOAC International*, 87:395-410.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendallb, P. A. and Sofosa J. N.,** 2008, Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses, *Food Microbiology* 25:294-303.
- 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.
- Sleator, R. D., Gahan, C. G. and Hill, C.,** 2003, A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*, *Applied Environmental Microbiology*, 69:1-9.
- Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W. and Cossart, P.,** 2007, *Listeria monocytogenes*. In Doyle, M. P., Beuchat, L. R. (ed.). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, 3rd (Ed.), ASM Pres, Washington, D.C., 457-491pp.

- Şireli, U. T., Erol, İ., Şahin, S. and Terzi, G.,** 2002, Prevalence and Contamination Levels of *Listeria* spp. in Poultry Minced, Poultry Meatballs and Poultry Burgers, Tr. J. Veterinary and Animal Sciences, 26: 1271-1276.
- Uyttendaele, M.R., Neyts, K.D., Lips, R. M. and Debevere, J. M.,** 1997, Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and products obtained from Belgian and French abattoirs, Food Microbiology, 14: 339-345.
- Uyttendaele, M.R., De Troy, P. and Debevere, J.,** 1999, Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. Int. J. Food Microbiology, 53: 75-80.
- Van Der Elzen, A. M. and Snijders, J. M.,** 1993, Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*, Veterinary Q, 15:143-145.
- Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Gorski, L., McCluskey, B. J. and Perdue, M. L.,** 2004, Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies, J. Dairy Sciences, 87:2822-2830.
- Varma, P. R. G. and Lyer, T. S. G.,** 1993, Viability of *Listeria monocytogenes* in water, Fish Technol, 30:164-165.
- Vialette, M., Pnon, A., Chasseignaux, E. and Lange, M.,** 2003, Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment, Int. J. Food Microbiology, 82:121-131.
- Wenger, J. D., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Grean, S. S., Prett, M., Pinner, R. W., Schuchat, A. and Broome, C. V.,** 1990, *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks: evaluation of a production facility, J. Food Protection, 53:1015–1019.
- Wong, H. C., Chao, W. L. and Lee, S. J.,** 1990, Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan, Applied Environmental Microbiology, 56: 3101-3104.
- Yousef, A. E. and Courtney, P. D.,** 2003, Basics of stres adaptation and implications in newgeneration foods, Microbial Stres Adaptation and Food Safety, CRC Pres, New York, 1-25pp.

Yousef, A. E. and Juneja, K. V., 2003, *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, CRC Pres, New York.

Zheng, W. and Kathariou, S., 1997, Host-mediated modification of Sau3AI restriction in *Listeria monocytogenes*: prevalence in epidemic-associated strains, *Applied Environmental Microbiology*, 63:3085-3089.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İzmir’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini İzmir’de tamamladı. 1997 yılında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D.’de üniversite eğitimine başladı. 2001 yılında Pınar Et mikrobiyoloji laboratuvarında, 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.’de stajlarını tamamladı. 2002 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek lisansa başladı. İzmir İli’ndeki XIV-XIX. Yüzyıllar Arasındaki Bazı Tarihi Yapıların Fungal Florasının İncelenmesi ve İlaçlama Deneyleri konulu tez çalışmasını hazırladı. 2005 yılında LET Danışmanlık Ltd. Şti.’ de proje sorumlusu olarak çalışma hayatına başladı. 2006-2010 yılları arasında Aybak Natura Analiz Laboratuvar Hizmetleri Tur. San. Ltd. Şirketi’nde Mikrobiyoloji Laboratuvarı Bölüm Sorumlusu olarak görev aldı.