

Listeria monocytogenes'in Gıdalarla Olan Kişisel Özellikleri, İzolasyonu ve Patojenitesi

Araş. Gör. Mert KAYTANLI

H.Ü. Gıda Mühendislik Bölümü — Beytepe/ANKARA

Gıda Müh. Füsun Esen KAYTANLI

Etimesgut Halk Sağlığı Laboratuvarı — ANKARA

1. GİRİŞ

1930'lu yıllara kadar *Listeria monocytogenes*'in yalnızca hayvanlar için patojen bir mikroorganizma olduğu görüşü yaygındı. Ve mikroorganizma henüz yeteri kadar iyi tanımlanamadığı için *L. monocytogenes* içeren örnekler çoğu kez patojenite açısından negatif olarak kabul edilmişlerdir. Tesadüfen mikroorganizma varlığı fark edildiği zaman laboratuvar kontaminasyonu kabul edilip, gereken önem verilmeyip, sonuç olarak *Listeria* infeksiyonlarından başka mikroorganizmalar sorumlu tutuluyorlardı.

Mikroorganizmanın tanımlanmasından sonra gıda zehirlenmelerindeki rolü ve epidemiyolojisi açıkkık kazanmaya başlandı. Eldeki verilere göre 1979 yılında Boston'da, 1983 yılında Massachusetts ve 1985 yılında Kalifornia'da görülen listeriosis vakalarında infekte olan insanların % 30'unun ölümüyle *L. monocytogenes*'in patojenik potansiyelinin çok yüksek olduğu kanıtlanmıştır.

Gerekli önlemler alınmadığı takdirde gelecekte yüksek ölüm oranına yol açan *Listeria* infeksiyonlarından sıkça söz edileceği muhakkaktır.

2. *Listeria monocytogenes* Tanımı

Familya : Henüz kesin olarak tanımlanamamıştır.

monocytum, monocyte : Kan hücresi.

gennaio : üretmek,

monocytogenes : Kan hücresi üretimi demektir (1).

L. monocytogenes mikrobiyolojik incelemler sırasında morfolojik yönden bazen *Erysipelothrix* ve *Corynebacterium diphtheriae* ile karıştırılabilir. Fakat G+C oranının ve diğer biokimyasal özelliklerinin farklılığı; yeni bir genus olan *Listeria*'nın tanımlanmasını sağlamıştır (1).

Listeria'nın başlıca türleri; *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welchii*, *L. seeligeri*, *L. dentrificans*, *L. grayi*, *L. murrayi*'dır (1).

3. Morfolojisi

Gram (+), sporsuz, mukopolisakkarit yapısında kapsüllü, 0,4 - 0,5 μm genişliğinde ve 0,5 - 2 μm uzunluğunda, aerobik veya mikro-aerofilik, % 5 - 10 CO₂ ve düşük konsantrasyonda oksijen içeren ortamda gelişebilen, 20°C'de maksimum hareketlilik özelliği gösteren bir bakteridir (1).

Küçük olanların uçları yuvarlaktır ve kısa zincirler yapabilirler. Hareket flagella ile sağlanır. Peritriş flagellalli olan alt türleri 20 - 25°C'da geliştiğinde, tek bir flagellumu olanlar ise 37°C'de geliştiğinde hareket etmektedir. Flagellumu olmayan hareketsiz türleri de vardır (9).

Hücre duvarı, % 20 heksoz, glükoz ve galaktoz, % 5 heksozamin ve % 5 protein (Alanin, glutamik asit, diamino pimelik asit, aspartik asit ve lösün) içermektedir (1).

L. monocytogenes % 0,25 Agar, % 8 jelatin ve % 1 glükoz içeren yarı katı ortamda 37 °C'de 24 saatte düzensiz ve mat koloniler oluşturur. Maksimum büyümeye yüzeyden 3 - 5 mm aşağıda ve şemsiyeye benzer şekildedir. Koyun Karaciğer Ekstrakt Agarında koloniler yuvarlak, parlak ve düzgün şekilli olarak görürlüler (1). Aynı besiyerinde bazı alt türler ayılar sonra sarı veya kırmızı pigment oluştururlar (11).

Mikroorganizma Pepton Agarda, Karaciğer Ekstrakt Agarından daha zayıf bir gelişme gösterir. Kanlı Agarda ise kolonilerin etrafında hernaliz gözlenir (1).

Selektif bir besiyeri olan Mc Bride Agarında ise parlak mavi - yeşil tipik *L. monocytogenes* kolonileri oluşmaktadır (4).

4. Biyokimyasal Özellikler.

L. monocytogenes'in çeşitli karbonhidratları fermente edebilme özellikleri incelenmiştir. Fermentasyon sonucu başlıca son ürün laktik asittir (1).

L. monocytogenes, glükoz levüloz, maltoz, salisilin, trehaloz, mannos, ksilos gibi karbonhidratlardan yalnız asit oluşturur. Dulitol, inositol, inulin ve rafinoz gibi karbonhidratları ise kullanarak heterofermantasyona ugratır. Bazı alt türler hariç arabinoz, galaktoz, sorbitol, gliserol ve sükrozu kullanamaz (3).

Düger biyokimyasal özellikleri ise şu şekilde özetlenebilir; Nitrat (—), MR (+), VP (+), indol (—), katalaz (+), jelatin, üre, nişasta (—), β -hemoliz (+), farelerde patojenite (+) ve G+C oranı % 38'dir (1, 3).

5. Büyüme Faktörleri.

Mikroorganizma büyümeye faktörü olarak bazı vitaminlere ve amino asitlere gereksinim duyar. Bunlar, biotin, riboflavin, tiyamin gibi vitaminler ile glutamin, izotiosin, lösin, valin, sistein ve diğer bazı amino asitlerdir. Ayrıca histidin, metionin ve triptofan gibi amino asitler de *L. monocytogenes* için gelişmeyi teşvik edici etkide bulunurlar (1).

Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*'in tetrasilin, kloramfenikol, eritromisin, ampicilin ve neomisine karşı hassas olduğu, penisilin ve sülfanomidlere karşı daha az duyarlı, polimixin B'ye karşı ise dirençli olduğu tespit edilmiştir (1).

Mikroorganizmanın optimum gelişme sıcaklığı 37 °C olup, minimum 2,5 °C'da gelişebilir (11).

Ayrıca *L. monocytogenes* ağırlıkça % 25,5 Na Cl konsantrasyonunda gelişebilmektedir (12).

6. Gelişmesine Etki Eden Faktörler

6.1. Sıcaklık Etkisi :

L. monocytogenes'in sıcaklığa direnci konusunda çeşitli görüşler vardır. Fikir ayrılıklarının bir kısmı *L. monocytogenes*'in sıcaklığa dayanıklılığını ölçmek için kullanılan yöntemin eksiksliğinden ortaya çıkmıştır. Bearns ve Giard, yaptıkları çalışmada 61,7°C'de 35 dakika-

lik pastörizasyon normunda *L. monocytogenes*'in ml'de 5×10^3 adeti aşlığında canlı kalabileceğini tespit etmişlerdir (5,7).

Bradshaw ve Ark. (1987) ise işaretlenmiş borosilikat cam tüpleri kullanarak *L. monocytogenes*'in pastörizasyon normunda canlı kalıp kalamayacağını inceledikleri araştırmalarında. *L. monocytogenes*'in termal direncini tespit etmek amacıyla kullanılan test tüpü yönteminin hatalı olduğunu ve *L. monocytogenes*'in pastörizasyon normunda canlı kalamayacığını kesinlikle ispatlamışlardır (4).

Bu konuda başka bir araştırmada Garayzabal ve Ark., tarafından İspanya'da yapılmıştır. Bu çalışmada *L. monocytogenes* 78 °C'de 15 sn. pastörize edilmiş sütten izole edilmiştir (10).

Düger bir kaynaka ise *L. monocytogenes*'in genel olarak sıcaklığı az duyarlı olduğu ve D değerinin 80°C'de 5 dakika olduğu için pastörizasyon işleminin dikkatli yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. Mikroorganizma besiyeri üzerinde 4°C'de 3 - 4 yıl virülansını muhafaza etmiştir (9).

4°C'de rahatlıkla faaliyet gösterebilmesi başka bir ifadeyle psikrofilik yapısı nedeni ile buzdolabı koşullarında gelişebilmesi mikroorganizmanın önemini artırmaktadır. Örneğin süt, düşük konsantrasyonda *L. monocytogenes* ile kontamine olsa bile soğutma aşamasında uzun süre bekletilirse insanlar üzerinde etkili olabilecek efektif dozun çok üzerinde *L. monocytogenes* popülasyonu içerebilir (10).

L. monocytogenes üzerinde yapılan çalışmalar gelişmesinin yalnızca sıcaklığa bağlı olmadığını, mikroorganizmanın alt türüne ve bulunduğu besi ortamına bağlı olduğunu göstermektedir. Örneğin aynı sıcaklıkta aynı alt türlerin çikolatalı sütteki gelişimi yağlı süt, yağsız süt ve kremadaki gelişimi ile karşılaştırıldığında çikolatalı sütte 10 misli daha fazla üreme gözlenmiştir. Önceleri *L. monocytogenes*'in gelişimine sükrozin etki ettiği düşünüldü ise de, sonrasında kakaonun mikroorganizma üzerinde geliştirici etkisi olduğu saptandı. Bu sonuç kakaonun pek çok bakteri için germisid etkili olduğunu bileyen araştırmacılar için şaşırtıcı olmuştur (10).

6.2. pH Etkisi :

L. monocytogenes'in gelişeceği optimum pH değerinin saptanması için Camembert peyniri üretimi sırasında prosesin çeşitli aşamalarında ve değişik pH değerlerinde *L. monocytogenes*'in gelişmesi araştırılmıştır. Çalışılan pH değerleri 4,6, 5,5, 6,1 ve 7,4'dür. *L. monocytogenes*'in rahatlıkla üreyebildiği pH değerinin 6,1 olarak saptanması üzerinde pH 5,8 - 7,1 aralığında deneme tekrarlanmış ve sonuçta *L. monocytogenes* için optimum pH'ın 6 - 6,4 olduğu görülmüştür (12).

6.3. H₂O₂ :

Cheddar ve İsviçre tipi peynirlerinde kullanılan serbest olan H₂O₂'tin *L. monocytogenes* üzerine etkisi incelenmiştir. Araştırma süt üzerinde yapılmıştır. Sonuçta; *L. monocytogenes* ile süt mikroflorasının H₂O₂'deki dayanıklılığı kıyaslandığında, refrigerasyon sıcaklığında depolama sırasında *Listeria*'nın selektif olarak zenginleştiği ve halk sağlığını önemli derecede etkileyebileceği kanıtlanmıştır (6).

7. İzolasyon.

7.1. Stok Kültürden İzolasyon :

Stok kültür Triptoz Brotha transfer edilip +4°C'de depolanır' Triptoz Brotha transfer edilen stok kültürden bir miktar alınıp tekrar aynı besiyerine inokülasyon yapılır ve 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Bundan sonraki basamak olarak Triptoz Broth'dan 0,05 ml inokulum alınır. Inokulum 121°C'de 15 dakika sterilize edilen 210 ml yağsız süt içeren erlenie aktarılır. 24 saat 30°C'de inkübe edildikten sonra erlen içeriğinden 0,05 ml alınır ve aynı şartlarda hazırlanan yağsız süt içeren erlenie ikinci bir aktarma yapılır. Inkübasyon 30°C'de 48 saatte tamamlanır. Bu aşamadan sonra bakteri sayısı genellikle 9x10⁷ ile 3x10⁸ adet/ml arasında değişmektedir. Fakat kullanılan alt türe göre bu sayı değişiklik gösterebilir (10).

Aynı izolasyon yöntemi yağsız sütün yanı sıra, yağlı süt, çikolatalı süt ve kremada tekrarlanmış fakat sonuçlar değişimmemiştir (10).

7.2. Gıdada İzolasyon :

Alınan çiğ süt örnekleri +4°C'de taşınıp aynı sıcaklıkta depolanaarak muhafaza edilmiş-

tir. Analizler örneklemeden 1 hafta sonra başlamıştır.

Zenginleştirme Sıvısı :

İzolasyonda zenginleştirme işlemi için zenginleştirme sıvısı kullanılır. Burada zenginleştirme sıvısı olarak % 0,6 Yeast Ekstrakt ile desitelenmiş tritikaz, 15 mg akriflavin HCl/L, 40 mg naftadiksik asit/L ve 50 mg sikloheksimide L seçilir. Zenginleştirme sıvısı *Listeria* kontaminasyonu görülen örneklerde optimum zenginleştirme koşullarının sağlanması için 30°C de inkübe edilir (8).

İzolasyon Agar :

İzolasyon Agar olarak, bileşimindeki ikan yerine sikloheksimid eklenerek modifiye edilmiş Mc Bride Agar kullanılır. Modifiye edilen Mc Bride Agar (M.M.), 35,5 g-feniletanol agar/L, 10 gr. glisin anhidrit/L, 0,5 g litium klorid/L ve 200 mg sikloheksimid/L ile takviye edilir (8).

İzolasyon Prosedürü :

225 ml zenginleştirme sıvısına 25 ml süt inoküle edilip, 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Daha sonra zenginleştirme sıvısı kültüründen 24 saatte ve 48 saatte alınan inoküller direk olarak Mc Bride Agar sürme yöntemiyle aktarılır. Ayrıca 9 ml % 0,5 lik KOH çözeltisi 1 ml zenginleştirme sıvısı kültürune eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra Mc Bride Agara yine sürme yöntemiyle inoküle edilir. Tüm plakalar 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonunda plakalarda sayımlı olur (8).

7.3. *L. monocytogenes* için EMS Yöntemi :

90 ml zenginleştirme sıvısı üzerine 10 ml süt ilave edilir. Sonra 1, 0,1 ve 0,01 ml süt 10 ml zenginleştirme sıvısına eklenir. Tüm kültürler üç tüp yöntemine göre hazırlanmış olup, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmalıdır. Inkübasyondan sonra kültürler yukarıda anlatıldı McBride Agara sürme yöntemi ile aktarılır. Daha sonra tüm plakalar 35°C'de 48 saat inkübe Daha sonra tüm plakalar 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra tipik koloniler besiyeri üzerinde görülür (8).

8. Epidemiyoloji ve Gıdalarla İlişkisi.

L. monocytogenes doğada oldukça yaygındır. Bugüne kadar topraktan, lağım sularından,

hayvan yemlerinden, sağlıklı ve mastitisli ineklerin sütlерinden, hasta insan ve hayvanların fezeslerinden, klinik semptomlar göstermeyen sağlıklı insanların geçeslerinden, kemirgenlerden, bazı yapraklı sebzelerden, yetersiz pastörize edilmiş gıdalarдан, bazı peynir çeşitlerinden (Liederkranz, Brie, yumuşak Meksika tipi) çok sayıda izolasyon yapılmıştır (13).

Epidemik veya ayrı ayrı gözlenen listeriosis vakaları daha çok koyun, sığır ve kümes

hayvanları gibi evcil hayvanlarda sıkça görülürken, domuz ve köpek gibi hayvanlarda daha az görülür (2).

Eldeki verilere göre ilk kez 1971 yılında A.B.D.'de 31 eyalette görülen 104 olayın 56'sı listeric menengit diğerleri ise listerianın meydana getirdiği başka hastalıklardır (9).

Daha sonraki yıllarda *L. monocytogenes*'in izole edildiği gıdalar ve ilgili açıklamalar Tablo 1'de verilmiştir (8, 10, 12, 13).

Tablo 1: *L. monocytogenes*'in Izole Edildiği Gıdalar

Gıda	Açıklama
Çiğ sebze ve meyve ile pastörize edilmemiş sütten yapılan gıdalar (1979 Boston).	23 ölüm
Lahana salatası, süt ve yumuşak tip peynir (1980, A.B.D.)	—
Lahana salatası (1981 Kanada).	Mezeci dükkanlarından çok sayıda izole edilmiştir.
Pastörize süt (1983, Massachusetts).	49 hasta, 14 ölüm. 42 hastanın immüno yönden dayaniksız yetişkin, 7 hastanın yeni doğmuş bebek olduğu gözlenmiştir.
Yumuşak Meksika tipi peynir (1985, Massachusetts).	Üretimde pastörize edilmemiş veya yetersiz ısıt işlem görmüş süt kullanılmıştır. 100'ün üzerinde insanın hayatını tehlikeye sokmuştur.
Yumuşak Meksika tipi peynir (1985, Kaliforniya).	% 39 oranında ölüm görülmüştür. Bazı peynir örnekleri fosfataz (+) çıkmıştır.
Liederkranz peyniri (1985, A.B.D.).	Pek çok vakadan izole edilmiştir.
Brie peyniri (1986, A.B.D.).	% 60 <i>L. monocytogenes</i> kontaminasyonu saptandığından piyasadan toplatılmıştır.

- Gözlenen olaylar sonucu *L. monocytogenes* için iki acil gereksinim ortaya çıkmıştır;
- Kolay ve kısa bir izolasyon yöntemi,
 - Mikroorganizmanın süt üreticilerine taşınılması (8).

9. Patojenite.

İnfeksiyon hayvandan veya diğer bulaşı yollarından insana geçebilmektedir. *L. monocytogenes*'in toprakta, lağım sularında, sütte ve feceste yaşama süresi diğer gıda kökenli patojenlerden (*Salmonella* dahil) daha fazladır (13).

Bugüne kadar *L. monocytogenes*'in listeriosis, septisemi, abortus, bakteremi, endokarditis (Endokart İltihabı), meningeonsefaliitis (Beyin ve zarları İltihabı), konjunktivit (göz İltihabı), ménengit, lokal lezyonlar ve çeşitli deri hastalıklarına yol açtığı anlaşılmıştır (3,9).

Ayrıca karaciğerde siroz benzeri önemli bir hastalık ve immün yetersizlige neden olabilemede çok tehlikeli sonuçlara yol açabilmektedir (13).

Günümüzde hamile kadınlar, yeni doğmuş bebekler ve immuno yetersizliği görülen yetişkinler gibi duyarlı bireylerde infeksiyona yol açan oral doz kesin olarak bilinmemektedir. Ancak Centers for Disease Control (C.D.C.) 1985 yılında Meksika tipi yumuşak peynirin neden olduğu listeriosis olayında, infeksiyona yaklaşık $10^2 - 10^3$ adet/gr. mikroorganizma içeren peynirlerin tüketiminin yol açtığını saptamıştır (12).

10. Tedavi ve Korunma

Mikroorganizmanın invitro deneylerinde penisilin, streptomisin, kloramfenikol, tetrasilin, eritromisin gibi antibiotiklere karşı duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Etkili antibiotikler hastalık tedavisinde kullanılmalıdır. Listeria doğada çok yaygın olduğu için korunma tedbirleri almak güçtür. İnsanlara yakın çevrede yaşayan hasta hayvanların saptanması ve bunların tedavi olanağı bulunmazsa öldürülmeleri zorunludur. Hastalar izole edilmeli portörler tedavi edilmelidir (9).

11. Sonuç.

Son yıllarda *L. monocytogenes*'in önemli anlaşılarak bu konuda yapılan çalışmalar gün geçtikçe yoğunlaşmaktadır.

L. monocytogenes'in doğada çok fazla yaygın olması nedeniyle,

— Kolay ve kısa izolasyon yöntemi, ve

— Süt üreticilerine *L. monocytogenes*'in tanıtılması, üzerinde durulması gereken önemli sorumlardır (8).

F.D.A. süt ve süt ürünlerinin pastörizasyonunda 71, 7°C'de en az 15 saniyelik normun kullanılmasını önermektedir. Ancak ürünlerin yağ içeriği % 10 veya daha fazla ise sıcaklık 2,9°C daha arttırılmalıdır (4).

Ayrıca süt pastörizasyondan sonra kontamine olursa hiçbir ürüne işlenmemelidir. Giada ürünlerinin depolama sıcaklığı olan 4°C'de *L. monocytogenes*'in gelişip üreyebilmesi ve pek çok gıdanın tüketime hazır pH'sı olan 6-6,4 değerinde mikroorganizmanın optimum pH sınırları içinde yer alması, *L. monocytogenes*'in depolama aşamasında rahatlıkla faaliyet göstermesine yol açmaktadır.

L. monocytogenes'in yol açtığı infeksiyonların önlenmesi için bilişen hijyenik koşullarda gıdaların korunması şimdilik önerilecek bir yoldur. *L. monocytogenes*'in insanlar için etkili efektif dozu henüz saptanamadı ise çok düşük konsantrasyonda bile infeksiyona neden olduğu ortaya konmuştur.

Korunmada ilk dikkat edilecek konu kontaminasyonun önlenmesidir. Bunun için diğer patojenler için dikkat edildiği gibi çiğ gıdalar ile ısıl işlem uygulanmış gıdaların kontaminasyonunun önlenmesi, personel hijyenine önem verilmesi, gıdaların işlendiği bölgelerde mikrobiyal standartlara uyulması ve gıdalarla temas eden her türlü yüzeyin mikroorganizmalardan arındırılmış olması gereklidir.

K A Y N A K L A R

1. Anonymous. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth ed. The Williams and Wilkins Comp., Baltimore, p. 594-595.
2. Anonymous, 1978. Microorganism in Foods 1, Their significance and methods of enumeration, University of Toronto, p. 47-48.
3. Anonymous. 1984. Difco Manual, Tenth edition, Difco Laboratories, U.S.A., p. 520-524.
4. Bradshaw, J.G.; Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M., Tierney, J.T., Larkin, E.P., ve Twedt, R.M., 1985. Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* in Milk. Journal of Food Protection, 48 (9) : 743-745.
5. Dominguez, L., Garayazabal, J.F., Ferri, E.R., Vazquez, J.A., GomezLucia, L., Ambrosio C., ve Suarez, G., 1987. Viability of *Listeria monocytogenes* in Milk Treated with Hydrogen Peroxide, Journal of Food Protection, 50 (8) : 636-639.
6. Products, Journal of Food Protection, 50 (7) : 543-544.

7. Donnelly, C., Briggs, E., ve Donnelly S., 1987. Comparison of Heat Resistance of Listeria monocytogenes in Milk as Determined by Two Methods, Journal of Food Protection, 50 (1) : 14-17.
8. Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M., 1987. Listeria monocytogenes in Raw Milk : Detection, Incidence, and Pathogenicity, Journal of Food Protection, 50 (3) : 188-192.
9. Onul, B., 1980. İnfeksiyon Hastalıkları, A.U. Tıp Fakültesi Yayınları No : 391, s. 697-700.
10. Rosenow, E.M., Marth, E., 1987. Growth of Listeria monocytogenes in Skim, Whole and Chocolate Milk, and in Whipping Cream During Incubation at 4, 8, 13, 21 and 35 °C. Journal of Food Protection, 50 (6) : 452-459.
11. Robinson, R.K., 1983. The Microbiology of Milk, Vol. I, Dairy Microbiology, Applied Science Publishers, U.K., p. 61-62.
12. Ryser, E.T., ve Marth, E.H., 1987. Fate of Listeria monocytogenes During the Manufacture and Ripening of Camambert Cheese, Journal of Food Protection, 50 (5) : 372-378.
13. Siliker, J.H., 1986. New Bacteria in the News, Food Technology, Augst. p. 24

ROBOT

LAB

C-64 + DİĞER
TÜM EV KOMPUTERLERİ
VE P.C. LERLE
GERÇEKLEŞTİRİLEBİLEN

ÇİZGİ İZLEYEN BÖCEK
ISI VE İŞİĞE DUYARLI BÖCEKLER
GRAFİK DIGITİSER
TURTLE
MİKROBOT
ROBOT KEDİ
SERVİS ROBOTU
ROBOT KOL
EV ROBOTU
PRATİK UYGULAMALAR
AKILLI EVLER

ŞAHAP PEKÇEVİK

