

Alabalık Fletolarında Farklı Yöntemlerle *Listeria monocytogenes*'in Araştırması

Osman CENET¹

¹Balıkesir Üniversitesi, Bandırma Meslek Yüksekokulu, Bandırma, Balıkesir

Makale Geliş ve Kabul Tarihi: 14.02.2007–29.05.2007 Sorumlu Araştırmacı: e-mail: oenet@hotmail.com

Özet: Bu çalışmada balık eti örneklerinde *Listeria monocytogenes*'in tanısına yönelik EIA (Enzyme Immuno Assay) ile klasik bakteriyolojik metotlar karşılaştırılmalı olarak çalışılmıştır. Alabalık fletosundan toplam 66 örnek kullanılmıştır. Bakteriyolojik kültürlerde *Listeria* türü bakteri üretilmemiştir. EIA yöntemi ile 3 örnekte pozitiflik saptanmıştır. *L.monocytogenes*'in düşük dozda çok efektif olmasından ve çapraz kontaminasyona yol açabilmesinden dolayı *Listeria* tanısında kültür yöntemlerinin yanında ELISA yönteminin de kullanılmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Listeria monocytogenes*, Listeriozis

An Investigation for *Listeria monocytogenes* on Trout Fletos Using Different Methods

Summary: In this study EIA (Enzyme Immuno Assay), aimed at diagnosis of *Listeria monocytogenes* on fish samples and classical bacteriologic methods, have been compared. Totally 66 samples have been analyzed. In bacteriologic cultures *Listeria* type bacterias couldn't be breded. With EIA method 3 positive samples have been fixed. Because of the fact that *Listeria monocytogenes* are fairly plenty at low dosage and can cause contamination crosswise, it has been concluded that Elisa method can usually be applied as well as culture methods for *Listeria* diagnosis.

Key words: *Listeria monocytogenes*, Listeriozis

GİRİŞ

Dünyada yılda ortalama olarak yetmiş beş milyon ton düzeyinde deniz ürünü avlanmaktadır. Bunların %70'i direkt insan gıdası olarak tüketilmektedir. Balıkların kas dokuları diğer memeli hayvan kaslarından çok daha hızlı bozulduğu için çok kolay bozulabilen gıda kaynakları olarak bilinmektedirler [1].

Salmonella, *Listeria*, *Staphylococ*, *Yersinia* gibi mikroorganizma cinsleri et, süt ve süt ürünlerine hammadde bazında, üretim aşamalarında, muhafaza veya tüketim sırasında bulaşabilmektedirler. *Listeria monocytogenes* 1929'dan beri insanlarda patojen, 1981'den beri ise gıda kaynaklı patojen olarak tanınmaktadır. *Listeria monocytogenes* son yıllarda gıdalara bulaşan patojen bir mikroorganizma olarak gıda endüstrisinde önemli bir sorun haline gelmiştir [2]. *L. monocytogenes*' in insanlarda diyare, bakteriyemi, menenjit, beyin absesi, endokardit, osteomyelit ya da pnömoni klinik tablosu oluşturan gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğu saptanmıştır. Yeni doğanlarda ve immun sistemi zayıflamış kişilerde bu hastalık daha ciddi sonuçlar doğurmaktadır. Bununla birlikte hastalık, milyonda 2 ile 10 arasında görülmesine rağmen ölüm oranı yüksek bir hastalıktır. Çeşitli çiğ tüketilen sebzeler, süt ve süt ürünleri, et ürünleri, sıcak ve soğuk tütülenmiş balıklar gibi bazı tüketime hazır su ürünleri bu bakterinin görüldüğü gıdalar arasında yer almaktadır [3, 4, 5].

Bu tür patojen mikroorganizmaların gıdalarda aranmasında çok çeşitli yöntemler bulunmasına

rağmen, klasik metotlar genelde daha uzun zamana ihtiyaç duymaktadır. Nitekim balık etinde *Listeria monocytogenes*'in klasik bakteriyolojik metotlarla aranması zaman alıcı ve çok besli yeri harcanmasına neden olmaktadır. Bu yüzden daha ucuz ve çabuk sonuç veren yöntemlere gereksinim vardır [6].

Bu çalışmada *Listeria monocytogenes*'in tanısına yönelik birkaç saatte sonuç verebilecek olan EIA (Enzyme Immuno Assay) yönteminin balık eti örneklerinde geliştirilmesine çalışılması ve klasik bakteriyolojik metotla EIA metodunun karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Manisa'da bulunan bir Alabalık Çiftliğinden satışa sunum aşamasındaki 33 adet vakumlu donmuş alabalık fletosu 4-8°C'lik buzdolabı ortamında çözündürülmüştür. Daha sonra steril bir makas ile bu vakum torbaları kesilerek fletoların iki ayrı yerinden 25'er g örnekler alınarak bakteriyolojik kültür ve EIA testi için kullanılmıştır. Örnek toplama işlemi 3 aylık periyot boyunca her hafta tesadüfi seçilen bir gün esas alınarak yapılmıştır.

Bakteriyolojik kültür 33 balıktan alınan 66 örnek ile iki aşamalı USDA yöntemiyle çalışılmıştır [7]. Bu yöntemde göre, örnekler, iki aşamalı zenginleştirme ortamında inkübe edildikten sonra, seçici bir agar yüzeyine, çizgi ekimle kolonize etme işlemi uygulanmıştır. Zenginleştirme işlemi için *Listeria* broth I (*Listeria* Primary Enrichment Broth) ve *Listeria* broth II (*Listeria* Secondary Enrichment Broth) kullanılmıştır. Seçici besiyeri ise, lithium chloride phenylethanol moxalactam (LPM) içermektedir. Besi yerleri DIFCO ürünlerinden kullanılmıştır. Inkübasyondan sonra gram boyama ve

morfolojik identifikasyon doğrulanmıştır. Gram (+), katalaz (+), β hemoliz (+), CAMP (+) ve ramnozu fermente edebilen koloniler *L. monocytogenes* olarak kabul edilmiştir [8, 9].

EIA işlemleri için anti-listeria antikorlarının hazırlanmasında; farklı *Listeria* türleri ile immünize edilmiş keçi serumlarından izole edilen spesifik, saf, 1 mg'lık liyofilize ticari antikorlar (Bactrace Antibodies, kpl Inc., USA) kullanılmıştır. *Listeria* antijenlerinin hazırlanmasında; ısıyla öldürülmüş *L. monocytogenes* hücrelerinden elde edilen liyofilize ticari *Listeria* antijeni kullanılmıştır (Bactrace Antibodies, kpl Inc., USA). Süt tozu, fosfat tampon solusyonu ile % 1 oranında dilüe edilerek negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *Listeria* cinsine spesifik fosfotaz işaretli ticari, liyofilize, konjugatlar kullanılmıştır (Bactrace Antibodies, kpl Inc., USA). Substrat olarak; Orto – phenyl diamin (OPD), H₂O₂, Substrat buffer; 0.1 M citric acid, 0.2 M Na₂HPO₄, distile su kullanılmıştır. Stop solüsyonu olarak; 3M H₂SO₄ kullanılmıştır. EIA kaplama buffer olarak Na₂CO₃ (1.59 g/l), NaHCO₃ (2.93g/l), NaN₃ (0.2g/l) kullanılmıştır. Yıkama solusyonu olarak Tween 20 (500 μ l), PBS (1000 ml) kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada 50-200 μ l'lik mikropipetler ile EIA plate yıkayıcı ve okuyucu olarak; SORIN (Biomedica System, Italy) kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada 33 Gökkuşığı vakumlu Alabalık fletosundan toplam 66 örnek kullanılmıştır. Bakteriyolojik kültürlerde izolasyon için kullanılan zenginleştirilmiş ve seçici besiyerlerinin hiç birisinde *Listeria* türü bakteri üretilmemiştir.

EIA testlerinde pozitif kontrollerin ortalama optik dansitesi OD= 0.72, ortalama negatif kontrollerin optik dansitesi OD= 0.07 olarak saptanmıştır. Örneklerin optik dansitelerinin hesaplanması sonucunda, negatif kontrollerin üzerinde ve OD \geq 0.12 olarak saptanan optik dansiteler pozitif kabul edilmiştir. Gökkuşığı alabalıklar üzerinde yapılan bu çalışmada, örneklerde kültür yöntemi ile *L. monocytogenes* izole edilemez iken EIA yöntemi ile 3 örnekte pozitiflik saptanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Listeria türleri çevrede, toprakta, suda, kötü kaliteli silajlarda yaygındır [10]. *Listeria monocytogenes*'in gıdalarla kontaminasyonu ile ilgili çalışmalar daha çok hayvansal ürünlerde ve çeşitli sebzelerde yapılmıştır. Karides, yengeç, istakoz gibi çeşitli deniz ürünlerinde de bazı çalışmalar yapılmış olmakla birlikte balıklarda yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Ürünler arasında kros kontaminasyon ve personel elleri patojenik mikroorganizmaların yayılmasını devam ettirebilmektedir [11]. Bundan dolayı, *L. monocytogenes*'in gıda işletmelerinde eradikasyonunun oldukça güç olduğu bildirilmiştir [12].

Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes* varlığı farklı oranlarda saptanmıştır. Taze veya donmuş balık

ve ürünlerinde *Listeria* türlerinin çoğunlukla bulunabileceği ve *L. monocytogenes* bulunma olasılığı oranlarının %4 ile % 12 arasında değişebileceği belirtilmiştir [13].

Farber, [6] US/FDA yöntemine göre, Kanada'da çeşitli deniz ürünlerin toptan ve perakende satışının yapıldığı yerlerden aldığı 113 örnekten 15 tanesinin *L. monocytogenes* içerdiğini bulmuştur. Bununla birlikte perakende satılan ürünlerde karides örnek miktarı daha az olmasına rağmen *L. monocytogenes* tarafından daha fazla kontamine edildiğini belirtmiştir. Yine toptan satış aşamasındaki balık kalıpları, konserve som balığı, morina fletosu, bütün som balığı, som bifteği ve dilimlenmiş mürekkep balığı gibi ürünlerin de *L. monocytogenes* içermedikleri tespit edilmiştir [14]. *L. monocytogenes*'in deniz ürünlerinde düşük bulunmasının nedeni, bu ürünlerin 1 hafta gibi kısa raf ömrünün olmasına bağlanmaktadır. Ayrıca balık öldükten sonra kas dokusunda ortaya çıkan bir takım değişikliklerin bulunduğu da ileri sürülmüştür [15]. Fuchs ve ark., [16] 35 balık ve balık ürünüde *Listeria* varlığına yönelik olarak yaptıkları çalışmada, 10 taze balığın 3'ünde, 14 dondurulmuş balığın 5'inde *L. innocua* türünü saptamışlardır. Buna rağmen kurutulmuş ve tuzlanmışlar dahil, balıkların hiçbirisinde *L. monocytogenes* türü saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Hartemink ve ark. [17] İzlanda da yaptıkları bir çalışmada 91 balık ve balık ürününün % 10'unda, 37 balık salatasının % 19'unda *L. monocytogenes* türü saptadıklarını bildirmiştir. Heinitz ve ark.'nın [18] yaptıkları bir çalışmada tütsülenmiş balık ve tütsülenmiş kabukluları içeren toplam 1.080 örneğin %14'ünden *L. monocytogenes* izole edilmiştir. Yapılan diğer bazı çalışmalarda ise soğuk tütsülenmiş ürünlerde *L. monocytogenes* varlığının %8.1-19 arasında olduğu belirtilmiştir [18,19,20].

Curiale ve ark. [21]. yaptıkları bir çalışmada, deneysel olarak *L. monocytogenes* inokule edilen, içinde deniz ürünlerinin de bulunduğu besin maddelerinde EIA ve kültür metodlarının karşılaştırılmasında, bazı besin maddelerinde EIA, bazılarında kültür yöntemi daha duyarlı olmasına karşılık, süt örneği hariç, besin maddelerinin duyarlılıkları arasındaki fark % 10 oranında bulunmuştur. Bu çalışmada duyarlılıklardaki bu farklılığın besin tipinden çok, besinin işlenmesinden olabileceği de ileri sürülmüştür. Kerdahi ve ark., [22] yaptıkları bir çalışmada çeşitli besin örneklerinde *L. monocytogenes*'in inokulum veya doğal infeksiyon sonuçları arasında %100'e yakın uyumluluk tespit etmişlerdir.

Balık ve balık ürünlerinde *Listeria*'nın doğal kontaminasyonunun araştırıldığı sınırlı sayıdaki çalışmalardan da anlaşılacağı gibi, sonuçlar birbirinden çok farklı olarak saptanmaktadır. Sonuçlara genel olarak bakıldığında zaman, *Listeria* balık ürünlerinde, balık etinden daha sık izole edilebilmektedir. Bunun nedeni ürünün hazırlanması sırasında kontaminasyon riskinin artması olabilmektedir. Buna karşılık, *Listeria*'ların türlerinin balığın normal florasında bulunmaması ve balıkta hastalık yapmamaları nedeniyle, bu bakteriler balıklara çokça yerleşip kolonize olmamaktadırlar [23]. Sadece yaşadıkları ortamdan veya herhangi bir işlem sırasında kontamine olabilmektedirler. Buna bağlı olarak *Listeriaların*, özellikle de *L. monocytogenes*'in balıklardan izolasyon sıklığının

azaldığı kanısına varılmıştır. Bu sonuç, kontamine balıklarla listeriosis salgınları arasındaki ilişkinin zayıflığından [24] ve sporadik vakaların sayısının azlığından da anlaşılmaktadır [25].

Bu çalışmada balık fletolarından yapılan bakteriyolojik kültür sonucunda, örneklerin hiç birisinde *Listeria* türü bakteri saptanmamıştır. Bakteriyel antijen tespiti için yapılan EIA testlerinde ise, sadece 3 örnekte *Listeria* antijen pozitifliği görülmüştür (%9,1). Balık kasındaki glikojen, ölümden sonra laktik aside dönüşür ve bu olay kasdaki glikojen bitinceye kadar devam eder. Bu duruma bağlı olarak balık etinde pH düşer [26]. *Listeria* türleri bu düşük pH'da üreyemezler [23]. *Listeria*'ların üremesine olumsuz etki eden başka bir faktör de, ortamdaki tuz konsantrasyonudur. Tuz konsantrasyonunun artması da

pH'nın azalması gibi inhibitör etkiye neden olmaktadır. Bu aşamadan sonra balık etinde pH asidik karakter kazanmakta ve *Listeria*'ların yaşamını olumsuz yönde etkilemektedir [27]. Mikrobiyolojik kültür yönteminde üremenin saptanmamasının buna bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; gıdalara mikroorganizma kontaminasyonu ciddi hastalıklara neden olduğundan bu durum halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. *L.monocytogenes*'in düşük dozda çok efektif olmasından ve çapraz kontaminasyona yol açabilmesinden dolayı güvenli gıda için, canlı balıktan başlayıp son tüketiciye kadar ulaşan, çiftlikten çatala anlayışını içeren detaylı bir kontrol programının oluşturulmasının, *Listeria* tanısında kültür yöntemlerinin yanında ELİSA yönteminde kullanılmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Menaprito, A.P., Regenstein, J.M (1988):** Shelf – Life Extension of Fresh Fish, A Review Part 1 Spoilage of Fish. Journal of Food Quality. 11: 117-127.
- Farber, J.M., Losos, J.S (1988):** *Listeria monocytogenes*: A Food Borne Pathogen, CMAJ.138: 413-418.
- Kılınç B (2001):** Su Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi. 18 (3-4): 565–574.
- Midi İ., Ekinci G., Yaroğlu S., Aktan S (2005):** *Listeria Monositogenez'e* Bağlı Beyin Absesi: Olgu Sunumu. Fırat Tıp Dergisi. 10, (1): 36-39.
- Weinstein KB, Ortiz J (2004):** *Listeria monocytogenes*. Infectious disease.emedicine.com. available at: <http://emedicine.com/med/topic1312.htm>
- Prentice, G.A., Neaves, P (1988):** *Listeria monocytogenes* in Food, Its Significance and Methods for Its Detection. Bull.Int. Dairy Food. 3: 233.
- McClain, D., Lee, W.H (1988):** Development of USDA-FSIS Method for Isolation of *Listeria monocytogenes* from Raw Meat and Poultry. J. Assoc. Off.Anal. Chem.71: 660-664.
- Baird, R.M., Corry, J., Curtis, G.D.V., Mossel, D.A.A., ve Skovgaard, N.P (1989):**Harmococpoeia Of Culture Media For Food Microbiology-Additional Monographs Media For *Listeria spp*. Int. J. Food Microbiol. 9: 89-127.
- Van netten, P., Perales, I., Curtis, G.D.V., Mossel, D.A.A (1989):** A Selective Differential Media for the Detection and Enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria spp*. Int. J.Food Microbiol. 8: 299-316.
- Brackett, R. E (1988):** Presence and Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food and Water. Food Technol. April: 162-164.
- Sammarco M.L., Ripabelli G., Ruberto A., Iannitto G., Grasso G.M (1997):** Prevalance of *Salmonella*, *Listeria* and *Yersinia* in the Slaughterhouses Environment and on Work Surfaces, Equipment and Workers. J. Food Protect. 60: 367-371.
- Gobat P. F., Jemmi T (1990):** Epidemiologische Studien über *Listeria spp*. In hlachthöfen. Fleischwirtsch.70: 1455-1459.
- Ben Embarek, P. K (1994):** Presence, Detection, And Growth Of *Listeria monocytogenes* in Seafoods: A Review. Int. J. Food Microbiol. 23: 17-34.
- Farber J.M., Peterkin P.I (1991):** *L. monocytogenes*, A Food-Borne Pathogen, Microbiol Rev. 55: 476-511.
- Gianfranceschi, M. and Aureli, P. (1996)** Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. Ital. J. Food Sci. N. 4, 303-309
- Fuchs, R.S., Surendran, P.K (1989):** Incidence of *Listeria* in tropical Fish And Fishery products, Letters in Applied Microbiology. 9: 49-51.
- Hartmink, R., Georgsson, F (1991):** Incidence of *Listeria* species in Seafood and Seafood Salads. Int. Journal of food Microbiology. 12: 189-196.
- Heinitz, M. L., Johnson, J. M (1998):** The Incidence of *Listeria* species, *Salmonella* species and *Clostridium botulinum* in Smoked Fish and Shellfish. Journal of Food Protection. 61: 318-323.
- Hansen C.H., Vogel B.F., Gram L (2006):** Prevalence survival of *Listeria monocytogenes* in Danish Aquatic and Fish-Processing Environments. J Food Prot. 69 (9): 2113-22.
- Hu, Y., Gall, K., Ho, A. J., Ivanek, R. Gröhn, Y. T., Wiedmann, M (2006):** Daily Variability of *Listeria* Contamination Patterns in a Cold-Smoked Salmon Processing Operation. J. Food Prot. 69: 2123--2133.
- Curiale, M.S., Lepper, W (1994):** Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of *Listeria monocytogenes* in Dairy products, Seafoods, and Meats: Collaborative study. Journal of AOAC International. 77, (6): 1472-1489.
- Kerdahi, K.F., Istafanos, P.F (1997):** Comparative Study of Colorimetric and Fully Automated Enzyme-Linked Immunoassay System for Rapid Screening of *Listeria spp*.in Foods, Journal of AOAC International. 80, (5): 1139-1142.
- Küçüköner, E., Küçüköner Z (1990):** Balık Mikroflorası ve Balıklarda Meydana Gelen Mikrobiyal Değişmeler. Gıda. 15, (6): 339-341.

Alabalık Fletolarında Farklı Yöntemlerle *Listeria monocytogenes*'in Araştırması

24. Kuanberg, J.E (1988): Outbreaks of Listeriosis. Microbiological Science. 5, (12): 355-358.

25. Farber, J.M (1991): *Listeria monocytogenes* in Fish Products, Journal of Food Protection. 54, (12): 922-924.

26. Gianfranceschi, M., Aureli, P (1996): Freezing and Frozen storage on The Survival of *Listeria Monocytogenes* in Different Foods. Ital. J. Food Sci. 4; 303-309.

27. Fuchs, R.S., Sirvas, S (1991): Incidence of *L. monocytogenes* in an Acidified Fish Product, Ceviche. Letters In Applied Microbiology. 12; 88-90.