

KEÇİ SÜTLERİNDE *LISTERIA* PP. PREVALANSI VE VİRÜLENT *LISTERIA MONOCYTOGENES*' İN REAL-TIME PCR İLE BELİRLENMESİ

Serap Kılıç ALTUN¹ ✍

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Şanlıurfa/Türkiye

Geliş Tarihi: 15.04.2017 Kabul Tarihi: 09.05.2017

Makale Kodu: 306465

ÖZET

Keçi sütü tüm dünyada yaygın olarak tüketilen koyun ve inek sütüne alternatif bir gıdadır. Bu çalışmada Şanlıurfa ilinin Akçakale ve Eyyübiye ilçelerinde bulunan küçük ölçekli işletmelerde üretilen çiğ keçi sütü örneklerinde virulent *L. monocytogenes* prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. 88 adet çiğ keçi sütü örneği altı farklı işletmeden toplanmıştır. *L. monocytogenes* suşları ISO 11290-1 metodu ile izole edilmiş ve *hlyA* gen bölgesine spesifik primer kullanılarak Real-time PCR metodu ile tanımlanmıştır. Çalışmada analiz edilen 88 adet çiğ keçi sütü örneğinden 4'ü *Listeria* spp. (%4.54) olarak izole edilmiş, bunlardan 2'si (%2.27) virulent *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma keçi sütlerinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu, ısıl işlem ve hijyen kurallarına dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: Keçi sütü, *L. monocytogenes*, Real-time PCR

PREVALANCE OF *LISTERIA* SPP. AND DETECTION OF VIRULENT *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* IN GOAT MILK BY REAL-TIME PCR

ABSTRACT

Goat milk is an alternative food to sheep and cow milk which is widely consumed all over the world. In this study, it was aimed to determine the prevalence of virulent *L. monocytogenes* in raw goat milk samples produced in small scale farms located in Akçakale and Eyyubiye districts of Şanlıurfa province. 88 samples of raw goats' milk were collected from six different farms. *L. monocytogenes* strains were isolated by the method of ISO 11290-1 and identified by Real-time PCR method using primer specific to *hlyA* gene region. Of the 88 raw goat milk samples analyzed in the study, 4 (4.54 %) were *Listeria* spp., and 2 (2.27 %) of them were identified as virulent *L. monocytogenes*. This study emphasizes that goat's milk is contaminating with *L. monocytogenes* and heat treatment and hygiene rules should be considered.

Key Words: Goat milk, *L. monocytogenes*, Real-time PCR



İletişim / Correspondence

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Eyyübiye Yerleşkesi,
63200 Merkez/ŞANLIURFA



+90 414 318 39 41

+90 414 318 31 90



skilicaltun@harran.edu.tr

GİRİŞ

Keçi sütü; dünyada yaygın olarak tüketilen, koyun ve inek sütüne alternatif olan besin değeri yüksek bir gıdadır. Genellikle gelişmekte olan ülkelerin küçük ölçekli aile işletmelerinde üretilen keçi sütü her yaşta insan için iyi bir gıda olmasının yanı sıra tıbbi amaçlı kullanımı ve bebek beslenmesinde tercih edilmesi önemini artırmaktadır (1). Keçi sütü inek sütüne alerjisi olan bireyler için önemli bir alternatiftir. Türkiye’de keçi sütü içme sütü olarak kullanımın yanı sıra dondurma, peynir ve benzeri gıdaların üretiminde de kullanılmaktadır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın verilerine göre Türkiye’de 2015 yılında toplam 481.174 ton keçi sütü üretilmiştir (2).

L. monocytogenes *Listeria* genusunda bulunan gram pozitif, sporsuz, fakültatif anaerob, zoonoz bir bakteri olarak tanımlanır (3). 13 farklı serotipi bulunan *L. monocytogenes*’in özellikle 1/2a, 1/2b ve 4a serotipleri gıdalardan izole edilmektedir (4). Tüm dünyada süt ve süt ürünleri tüketimi sonucu oluşan listeriosis salgınları pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (5,6). Rahimi ve ark.(7) çığ süt tüketiminin listeriosis salgınlarını artırdığını bildirmişlerdir. Sütü fazlaca tüketmesi gereken yeni doğanlar, hamile kadınlar, yaşlı ve immun sistemi baskılanmış insanlar listeriosis’e yüksek riskli gruplardır (8). Özellikle çığ süttten üretilen yöresel süt ürünleri bulaşmada önemli kaynaklardır (7). *L. monocytogenes* insanlarda, invaziv listeriosis (listeriyoz) ve invaziv olmayan gastrointestinal listeriyoz (febril gastroenterit) olmak üzere iki farklı klinik formda seyreder (9). Salmonella türlerinden sonra gıda kaynaklı ölümlerde ikinci sırayı alan *L. monocytogenes* hayvanlarda başka hiç bir klinik semptom göstermeksizin laktasyon periyodunda

sadece mastitise sebep olabilmektedir. (10, 11,12,13) Çığ keçi sütü, *L. monocytogenes* ile sağım ekipmanı, kirli meme veya listeriyal mastitli hayvanlar yoluyla kontamine olabilmektedir. Sağım ekipmanlarında biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip olan *L. monocytogenes*’in, enfekte hayvanların dışkıları ve düşük kaliteli silaj ile çiftlik hayvanları için kontaminasyon riski artar (14).

Türkiye’de *L. monocytogenes*’in keçi sütlerinde prevalansını araştıran sınırlı sayıda araştırma olup bu çalışmanın amacı keçi yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı Akçakale ve Eyyübiye ilçelerinde çığ keçi sütlerinde virülent *Listeria* spp. prevalansını ve Real-time PCR metodu ile virulens genlerini belirlemektir.

MATERYAL VE METOD

Örneklerin Toplanması:

Bu çalışmada 2016 yılının Nisan-Ağustos aylarında Şanlıurfa ilinin Akçakale ve Eyyübiye ilçesinde bulunan altı farklı küçük ölçekli işletmeden toplanan çığ keçi sütü örnekleri (n=88) steril falkon tüplere alınarak buz aküleri ile sağlanan soğuk zincirde 3 saatte analiz için Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi laboratuvarına getirilerek analize başlanmıştır. Çığ keçi sütü örnekleri son 28 günde antibiyotik uygulanmamış laktasyondaki keçilerden aseptik olarak alınmıştır.

Listeria spp. izolasyonu:

Çığ keçi sütü örneklerinden *Listeria* spp. izolasyonu yapmak için ISO 11290-1 (15) metodu kullanıldı. Bu amaçla çift aşamalı (Half Fraser ve Fraser) ön zenginleştirme işlemi uygulandı. 25 mL çığ keçi sütü örneği 225 mL *Listeria* Enrichment Broth’(Oxoid,

CM0862) a ilave edildi, iyice çalkalandıktan sonra 30 °C'de 24 saat inkübe edildi. Ardından 1 mL alınarak 9 mL Fraser Broth'(Oxoid, CM0895) a eklendi ve tekrar 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı her bir örnekten ön zenginleştirme aşamasının ardından bir öze dolusu alınarak ALOA Agar (Oxoid, CM1084)'a ekim yapıldı ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda petrilere *Listeria* spp. şüpheli kolonilerden Real-time PCR için %0,6 Yeast Extract ilaveli Tryptic Soy Agar (Oxoid, CM0862) a geçildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak *Listeria monocytogenes* (ATCC 19118) suşu kullanıldı.

Real-time PCR ile virulent L. monocytogenes identifikasyonu:

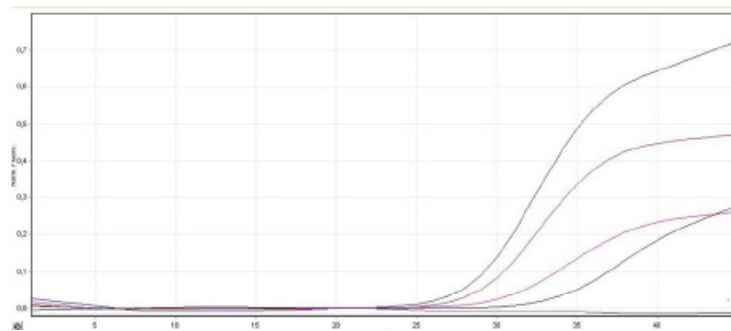
Şüpheli kolonilerin DNA izolasyonları sırasıyla 8500 x g de 5 dakika santrifüjün ardından 20 µL lizozim enzimi eklenerek (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA pH:8.0, 0,1 %(w/v) SDS) 37°C'de 15 dakika bekletilerek lizatlar oluşturuldu. Bu lizatlardan DNA izolasyonu, High Pure PCR template DNA ekstraksiyon kiti (11796828001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) üretici firma talimatı doğrultusunda yapıldı. Elde edilen 4 adet şüpheli koloninin miktarı DNA'ları nanodrop cihazı ile ölçülerek 260/280 nm saflığı ve ng/µL olarak tespit edildi. İzole edilen DNA örnekleri derhal Real-time PCR analizine alındı (16).

Real-time PCR işlemi, Rotorgene Q (Qiagen, Hilden, Almanya) sisteminde Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (03003230001; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile yapıldı. *Listeria monocytogenes*'in, Listeriolysin O gen (*hlyA*) bölgesi için spesifik dizayn edilmiş primerler kullanılarak analizi gerçekleştirildi (16). Bu amaçla amplifikasyon için PCR karışımına 2 µL 10× SYBRGreen mix (Taq-polymerase içeren), 2 µL 25 mM MgCl₂, 12 µL ddH₂O ve her bir primerden 1µL (10 µmol) ve şüpheli DNA (50 ng/µL) 2 µL ilave edildi. 95°C'de 30 sn ve 45 döngü, 95°C'de 10 sn, 62°C'de 30 sn tekli okundu. Erime eğrisi analizi için 1 döngü 62°C'den erime eğrisi 95°C'de 0 saniye 1°C/sn sürekli okundu. Soğuma 40°C'de, 30 sn ile gerçekleştirildi (17).

BULGULAR

Bu çalışmada incelenen 88 adet çiğ keçi sütü örneğinde virulent *L. monocytogenes*' in varlığı araştırıldı. Bu amaçla ISO 11290-1 metoduyla 4 örnekte (%4.54) şüpheli *Listeria* spp. kolonisi tespit edildi. *Listeria* spp. şüpheli örneklerin 3 tanesi Eyyübiye ilçesine, 1 tanesi ise Akçakale ilçesine ait süt örneklerinden izole edildi. Real-time PCR metodu ile 2 örnekte (%2.27) *hlyA* gen bölgesi tespit edildi. *hlyA* gen bölgesi pozitif olan bu izolatların virulent *L. monocytogenes* olduğu saptandı (Şekil 1).

İzole edilen 2 adet *L. monocytogenes* su-



Şekil 2. Pozitif örneklerin Real-Time PCR görüntüsü

şunun Eyyübiye ilçesinden alınan 48 örneğe ait olduğu belirlendi (Tablo 1).

cytogenes izole edilmesine rağmen 15 keçi sütü örneğinin hiçbirinde etkene rastlanmamıştır (20). Abou-Eleini ve ark.'nın 2000

Tablo. 1. Keçi sütlerinde *Listeria monocytogenes* prevalansı

Yerleşim yeri	Analiz edilen örnek sayısı (n)	<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i> (n)
Eyyübiye	48	3	2
Akçakale	40	1	0

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1988 yılı raporunda *L. monocytogenes*'in insanlara genellikle kontamine gıdalar vasıtasıyla geçtiği bildirilmiştir (18). *L. monocytogenes*'in özellikle çiğ süttten yapılan yöresel ürünlerden bulaş riskinin son yıllarda arttığı Soncini ve Valnegri (2005) tarafından bildirilmiştir. Etkenin buzdolabı ısısında da üreyebildiği göz önünde bulundurulduğunda süt ve çiğ süttten üretilen gıdaların kontaminasyonu halk sağlığı için önemlidir (19).

Bu çalışmada analiz edilen keçi sütü örneklerinde % 4.54 oranında *Listeria* spp. izole edilmiş ve izolatların %2.27'sinde virülent *L. monocytogenes* identifiye edilmiştir. Rahimi ve ark.'nın 2007 ile 2009 yılları arasında 60 keçi sütü örneği ile yapmış oldukları bir çalışmada 4 (% 6.7) örnekte *Listeria* spp. izole edilmiş ve bu örneklerden 1 (%1.7) tanesinin *L. monocytogenes* olduğu bildirilmiştir (7). Soncini ve Valnegri (2005) tarafından İtalya'nın Valtellina ve Valchiavenna şehirlerinde 2002-2003 yıllarında 96 çiğ keçi sütü ile yapılan çalışmada örneklerin 2' sinde (% 2.1) *Listeria* spp. tespit edilirken, identifikasyonda ise bunların *L. innocua* ve *L. ivanovii* olduğu bildirilmiştir (19). Türkiye'de Adıyaman ve Şanlıurfa illerinde Durmaz ve ark.'nın 2015 yılında keçi sütü ve silajlarda yapmış oldukları bir çalışmada 90 silaj örneğinin 2'sinde *L. mono-*

yılında 39 keçi çiftliğinden topladıkları 450 çiğ keçi sütü örneği ile yaptıkları başka bir çalışmada ise % 3.8 oranında *L. monocytogenes* izole edilmiştir (21). İran'ın Tahran kentinde 2008-2010 yılları arasında 41 çiğ keçi sütünde duplex –PCR metodu ile yapılan bir çalışmada 2 örnekte (% 4.9) *Listeria* spp. izole edilirken, bunlardan birinin *L. monocytogenes* olduğu bildirilmiştir (22) Osman ve ark.'nın Mısır'ın Kahire kentinde 2013 yılında 107 adet keçi sütü ile yapmış oldukları çalışmada multiplex PCR metodu kullanılmış ve izole edilen iki suşun *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir (14). Bu araştırma bulguları dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında sonuçların paralel olması keçi sütünün *Listeria* enfeksiyonları için kontaminasyon kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Çiftlik hayvanları; kontamine yemler, patojenin inhalasyonu, kaynağa direk temas, düşük kaliteli silaj, kontamine sular veya toprak, hasta hayvanlar ile *Listeria* enfeksiyonlarına maruz kalabilir (14, 22) Gıdalarda *L. monocytogenes*'in izolasyonunda konvansiyonel kültür, API sistem ve PCR gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır (7,14,20,22). Bu çalışmada Real-time PCR ile *L. monocytogenes*'in *hlyA* virülens gen bölgesi analiz edildi. *Listeria* türlerinin identifikasyonuna yönelik mevcut genetik testler 16S ve 23S rRNA gen bölgeleri farklılıklarına spesifik

yapılmaktadır (23) *Listeria* türlerinin hedef spesifik virülens genlerinden olan *hlyA* geni kan hücrelerinin hemolizinden sorumlu genidir (24). *L. monocytogenes*'in virulent suşlarının belirlenmesine kullanılan *hlyA* geni LIPI-1 gen dizininde yer alır (14). Çalışma bulguları virulent *L. monocytogenes*'in keçi sütlerinde bulunabildiğini ve bölgede farklı hayvan sütlerinin *L. monocytogenes* açısından virulent ve patojenik farklı gen bölgelelerine spesifik detaylı çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

SONUÇ

Çalışma sonuçlarına göre Eyyübiye ilçesinden alınan keçi sütü örneklerinde virulent *L. monocytogenes* varlığı, hem hayvan hem de insan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Keçi sütü ve keçi sütünden üretilen ürünlerin *L. monocytogenes* ile kontaminasyonunun önlenmesi için;

- İşletme hijyenine önem verilmesi
- Sağlıklı sağıım tekniklerinin uygulanması
- Sağıım ekipmanlarının temizlik ve dezenfeksiyonuna dikkat edilmesi
- Hayvanların beslenmesinde kaliteli silaj kullanılması
- Keçi sütünün tüketimi ile oluşan riskin önlenmesi için pastörize sütün tüketimi ile ilgili tüketici bilincinin oluşturulması ile gerçekleşecektir.

Tüm bu konularda hayvan yetiştiricilerinin ve gıda üretim işletmelerinin bilinçlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res.* 2004;51:155–63.
2. <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/Sag-MenuVeriler/HAYGEM.pdf>. Erişim tarihi: 15.03.2017
3. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Teknolojisi. Birin-

- ci Baskı . 2007. Ankara : Pozitif Matbaacılık.
4. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of food protection.* 2002; 65(11), 1811-1829.
5. Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda, SE. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne pathogens and disease.* 2009; 6(7), 793-806.
6. Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P, Rupitsch W, Pietzka AT, Werber D. Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. 2010.
7. Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control.* 2010; 21, 1448e1452.
8. McLauchlin J, Mitchell R, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of food microbiology.* 2004; 92(1), 15-33.
9. FSANZ. Microbiological risk assessment of raw goat milk. Canberra: Food Standards Australia New Zealand. 2009
10. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991; 55:476–511.
11. Fthenakis GC, Saratsis Ph, Tzora A, Linde K. Naturally occurring subclinical ovine mastitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Small Ruminant Res.* 1998; 31:23–7.
12. Sharp MW. Bovine mastitis and *Listeria monocytogenes*. *Vet Rec.* 1989;125:512–3.
13. Conly JM, Johnston BL. *Listeria*: a persistent food-borne pathogen. *Can J Infect*

- Dis Med Microbiol. 2008;9:327–8.
14. Osman KM, Zolnikov TR, Samir A, Orabi A. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. *Pathogens and global health*. 2014; 108(1), 21-29.
 15. Anonim: EN ISO 11290-1 Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -Part 1: Detection International Organisation for Standardisation. 1997, Cenevre.
 16. Berrada H, Sariano JM, Pico Y, Manes J. Quantification of *Listeria monocytogenes* in Salads by Real Time. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 107:202-206.
 17. Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M, Scotti M, Esteve T, Vazquez-Boland JA, Pla M. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real Time PCR: Assessment of hly, iap and lin02483 Targets and AmpliFlour Technology. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70(3):1366-1377.
 18. De Felip, G. Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti. *Tecniche Nuove*. 2001.
 19. Soncini G, Valnegri L. Analysis of bulk goats' milk and milk-filters from Valtellina and Valchiavenna (Lombardy Prealps) for the presence of *Listeria* species. *Small Ruminant Research*. 2005; 58: 143-147.
 20. Durmaz H, Avci, M, Aygün O. The Presence of *Listeria* Species in Corn Silage and Raw Milk Produced in Southeast Region of Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2015; 21(1).
 21. Abou-Eleinin AM, Ryser ET, Donnelly CW. Incidence and seasonal variation of *Listeria* species in bulk tank goat's milk. *Journal of Food Protection*. 2000; 63, 1208-1213.
 22. Jamali H, Radmehr B, Thong KL. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control*. 2013; 34(1), 121-125.
 23. Sallen BA, Rajoharison S, Desverenne S, Quinn F, Mabilat C. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:669–74.
 24. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Franjeul L, Jacquet C, Kunst F, et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun*. 2004;72:1072–83.