

KAYSERİ'DE SATIŞA SUNULAN BALIKLARDA *LİSTERİA* SPP. VARLIĞININ
KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ*

DETECTION OF *LİSTERİA* SPP. THROUGH CULTURAL METHOD IN FISH SAMPLES SOLD IN KAYSERİ

Katade ERDOĞAN¹, Yeliz YILDIRIM¹

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD, Kayseri

ÖZ

Bu çalışma, Orta Anadolu, Kayseri'de satışa sunulan çeşitli balık türlerinin listeriozis açısından taşıdığı halk sağlığı risklerini değerlendirmek amacıyla planlanmıştır. Dört farklı balık türüne çipura (*Sparus aurata*), alabalık (*Salmo trutta*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) ait toplam 100 balık örneği Kayseri'deki balık marketlerinden toplanarak örneklendirilmiştir. Balık örnekleri iki aşamalı zenginleştirme prosedürünü takiben iki ayrı selektif besi yerine ekim ve biyokimyasal identifikasyon yapılmak suretiyle *Listeria* spp. açısından test edilmiştir. Toplam 8 örnek (%8) *Listeria* spp. açısından pozitif bulunurken örneklerden sadece üçünün (%3) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamında 25 hamsi örneğinin 2'si (%8), ve 25 levrek örneğinin biri (%4) *L. monocytogenes* ile kontamine bulunurken, bir hamsi (%4), bir alabalık (%4) ve bir çipura (%4) örneğinin *L. ivanovii* ile ve bir çipura (%4) ve bir levrek (%4) örneğinin ise *L. welshimeri* ile kontamine olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türlerinin Kayseri'de sıklıkla tüketilen balık türlerinde yaygın olarak bulunmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Balık türleri, klasik kültür yöntemi, *Listeria* spp

GİRİŞ

Listeria monocytogenes, insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde ciddi, sporadik enfeksiyonlara neden olan önemli bir etkidir. *L. monocytogenes*'in insan ve hayvanlar için patojen olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Hastalık oldukça düşük bir insidensle seyretmesine rağmen risk grubunda bulunan bireylerde yaklaşık %30'lara varan ölüm oranlarına ulaşması hastalığın ciddiyetini ortaya koymaktadır (1, 2).

Listeria türlerinin birçok hayvan türlerinde izole edildiği bilinmesine rağmen, balık ve diğer deniz mahsulelerindeki *Listeria* insidensi hakkında çok az veri elde

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-12-3876 no'lu proje ile desteklenen yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 28.11.2013
Makale Kabul Tarihi: 03.12.2015

ABSTRACT

This study was designed to evaluate public health risks in respect to listeriozis due to consumption of fish species sold in Kayseri, Middle Anatolia. One hundred fish samples belonging to four different fish species; gilt head seabream (*Sparus aurata*), trout (*Salmo trutta*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from fish markets of Kayseri were sampled and tested for presence of *Listeria* spp. using a two step enrichment procedure, followed by plating on two selective agars and subsequent biochemical identification of the isolates. Eight fish samples (8%) were positive for *Listeria* spp. and in only three samples (3%) *L. monocytogenes* was detected. Two of 25 anchovy samples (8%) one of 25 sea bass samples (4%) were found to be contaminated with *L. monocytogenes* whereas *L. ivanovii* was isolated from one of anchovy (4%), one of trout (4%) and one of gilt head seabream (4%) samples. *L. welshimeri* was detected only in one of gilt head seabream (4%) and one of sea bass (4%) samples. The present study shows that *L. monocytogenes* and other *Listeria* species are not commonly found in the samples of raw and fresh fish samples at the retail level in Kayseri, Middle Anatolia.

Keywords: Cultural method, fish species, *Listeria* spp.

edilmiştir (3). *L. monocytogenes*'in çeşitli su ürünlerinde bulunması ve bu ürünlerin listeriozisin potansiyel kaynakları olduğu düşünülmeye rağmen, su ürünleri ile insan listeriozisinin bağlantılı oldukları son yıllarda anlaşılmıştır (4, 5).

Balık ve diğer su ürünleri *L. monocytogenes*'in taşınmasında rol alabileceği için söz konusu patojenin bu gıdalarda varlığına ilişkin çalışmalar önem kazanmaktadır. Kayseri ve civarında üretilen ve satışa sunulan balıklarda *L. monocytogenes*'in varlığı ve halk sağlığı açısından oluşturduğu risklerin belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışmada Kayseri ve civarında üretimi ve satışı yapılan balıklarda *Listeria* spp. varlığının

Corresponding Author: Doç.Dr.Yeliz YILDIRIM
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni Ve Teknolojisi
Tel: 03522076666
Email: yyildirim@erciyes.edu.tr

klasik kültür yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede Kayseri'de satışa sunulan balık türlerinin *L. monocytogenes* açısından taşıdığı halk sağlığı riskinin belirlenmesi ve konuya ilişkin literatür bilgilerine zenginlik kazandırılması mümkün olacaktır.

MATERYAL VE METOD

Çalışma kapsamında Kayseri'de 2012 Mayıs-Eylül ayları arasında dört farklı balık türüne ait 25'er adet olmak üzere toplam 100 çiğ taze balık numunesi kullanıldı. Çalışma kapsamında her hafta her bir balık örneğinden beşer adet olmak üzere bir haftada toplam 20 numune işleme alındı. Steril poşetlere alınan balık örnekleri soğuk zincir altında laboratuara ulaştırıldıktan sonra en geç 1-2 saat içerisinde analize alındı.

Listeria monocytogenes'in izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılmak üzere *L. monocytogenes* ATCC 7644 referans suşu kontrol suşu olarak kullanıldı. Aseptik şartlarda alınarak soğuk zincir altında laboratuara getirilen balık örneklerinde *Listeria* spp. varlığı ISO 11290-1/A1- 2004 metodu ile saptandı (6). ISO 11290-1/A1-2004 metodu çerçevesinde 25'er g balık örneği steril filtreli numune poşetlerinde (Bag Fitler 400P, Interscience, St. Nom La Breteche, Fransa) tartıldı. Üzerine 225 ml 1/2 konsantrasyonda (inhibitörleri yarım konsantrasyonda içeren)

negatif, 25 °C'de hareketli olan koloniler *Listeria* spp. pozitif kabul edildi. Söz konusu koloniler Microbact test kitinde (Microbact *Listeria* 12L *Listeria* identification system MB1128 Oxoid) biyokimyasal özellikleri (Esculin, Mannitol, Ksiloz, Arabitol, Ribose, Rhamnose, Trehalose, Tagatose, Glucose-1-Phosphate, Methyl-D-Glucose, Methyl-D-Mannose, Hemolysis) açısından değerlendirilerek tür bazında tanıya edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada, Mayıs-Eylül 2012 tarihleri arasında Kayseri balık marketlerinden toplanan 100 balık örneğinde *Listeria* türlerinin varlığı araştırıldı. Her balık türünden 25'er tane olmak üzere toplam 4 balık türünden çipura (*Sparus aurata*), alabalık (*Salmo trutta*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) örnekleme yapıldı. Toplam 8 örnek (%8) *Listeria* spp. açısından pozitif bulunurken örneklerden sadece üçünün (%3) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlendi. Çalışma kapsamında 2 hamsi (%8) ve bir levrek (%4) örneği *L. monocytogenes* ile kontamine bulunurken, bir hamsi (%4), bir alabalık (%4) ve bir çipura (%4) örneğinin *L. ivanovii* ile ve bir çipura (%4) ve bir levrek (%4) örneğinin ise *L. welshimeri* ile kontamine olduğu tespit edildi (Tablo 1' de özetlenmiştir.)

Tablo 1. Balık örneklerinde *Listeria* spp. Varlığı

Balık Türü	Örnek Sayısı	Pozitif örnek sayısı ve yüzdesi		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>
Hamsi	25	2 (%8)	1 (%4)	-
Levrek	25	1 (%4)	-	1 (%4)
Çipura	25	-	1 (%4)	1 (%4)
Alabalık	25	-	1 (%4)	-
Toplam	100	3 (%3)	3 (%3)	2 (%2)

Fraser *Listeria* Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398) besiyeri ilave edilerek stomacherde (BagMixer, Interscience, France) 2 dakika homojenize edildi ve ön zenginleştirme amacı ile 30 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ön zenginleştirme yapılmış kültürlerden 0.1 ml alınarak 10'ar ml'lik tam kuvvette hazırlanan (inhibitörleri normal konsantrasyonda içeren) Fraser *Listeria* Selective Enrichment Broth Base (Merck 1.10398) tüplerine ilave edildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra brothlardan öze yardımcıyla polymyxin- acriflavin-lithium chloride-ceftazidime-esculin-mannitol içeren Oxford *Listeria* Selective Agar besiyerlerine (Merck 1.07004.0500) çizme plak yöntemiyle ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. *L. monocytogenes* şüpheli kolonilerden 1-5 adet koloni seçilerek biyokimyasal testleri gerçekleştirme için kanlı agara geçildi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Kanlı agarda β-hemoliz oluşturarak üreyen kolonilere sırasıyla Gram boyama, Katalaz (Hydrogen Peroxide Merck; 110011), Oksidaz (Bactident Oxidase, Merck; 113300) ve hareketlilik testleri yapıldı. Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz

TARTIŞMA VE SONUÇ

ılıman bölgelerde *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri 1980'li yıllardan itibaren su ürünlerinden izole edilmiştir (7,8). Embarek (8) dünya çapında deniz ürünlerinde *Listeria* türlerinin insidensini taramış ve *L. monocytogenes* prevalansının ılıman bölgelerde %4 - 12 arasında değişiklik gösterdiğini bildirmiştir. Genel olarak Avrupa'daki balıklardan elde edilen veriler *L. monocytogenes* kontaminasyonunun %3 civarında olduğunu bildirmektedir (9).

Farklı ülkelerde balık ve diğer su ürünlerinde *L. monocytogenes* ve *Listeria* türlerinin araştırıldığı çalışmalarda; İzlanda'da satışa sunulan taze balıklardan % 54'ünün *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri ile kontamine olduğu (3), Yunanistan'da 120 çiğ balık örneğinden %5'inin *Listeria* spp. ile ve sadece birinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu, yine Yunanistan'da 75 taze balık örneğinden 2'sinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu bildirilmiştir (7, 10). Benzer şekilde Meksika'da, 12 aylık periyotta (Haziran 2001- Mayıs 2002) 66 istiridye, 66 balık ve 144 deniz suyu örneğinden sadece balık ve su numunelerinde sırası ile %22.7

ve %30.5 oranında *Listeria* spp. bulunduğu ve yine aynı örneklerin sırasıyla %4.5 ve %8.3'ünün *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirtilmiştir (11). ABD'deki marketlerde perakende olarak satılan taze gökkuşuğu alabalıklarında %54'e varan yüksek derecelerde *L. monocytogenes* kontaminasyonu belirlenmiştir (12). Hindistan'da ise 115 çiğ deniz ürününden 10'unun (%8.6) *L. monocytogenes* ile 18'inin de *L. innocua* ile kontamine olduğu ortaya konmuştur (13). Yapılan diğer bazı çalışmalarda *L. monocytogenes* prevelansının çiğ balıklarda % 0-1 arasında ve %0-10 arasında değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (14, 15, 16). Gudbjörnsdottir ve ark.(17) tarafından yapılan bir çalışmada çiğ deniz ürünlerinin %39'unun *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Jallewar ve ark., 200 balık örneğinin 39'unda *Listeria* türleri saptamış ve bunların 26'sının *L. monocytogenes* olduğunu rapor etmişlerdir (18). Yan ve ark., 343 deniz ürünü inceledikleri çalışmalarında 4 örnekte *L. monocytogenes* izolatı elde ettiklerini bildirmişlerdir (19).

Bu çalışmada *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türlerinin taze balık örneklerindeki insidensi sırasıyla %3 (2 hamsi ve bir levrek) ve %5 olarak belirlenmiş, *L. ivanovii* insidensi %3, *L. welshimeri* insidensi ise %2 olarak saptanmıştır. Diğer *Listeria* türleri ise saptanamamıştır. Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada Ertaş ve Şeker(20), Keban barajından yakaladıkları 150 tatlı su balığının 10'unun barsak içeriğinde (%6.6) *L. monocytogenes* bulduklarını bildirmişlerdir. Cenet (21), Manisa'da bulunan bir alabalık çiftliğinden satın aldığı 66 alabalık fletosundan 3'ünün (%4.5) *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu rapor etmiştir.

Bu çalışmada levrek örneklerinden sadece bir tanesi *L. monocytogenes* ile kontamine bulunmuştur. Genel olarak *L. monocytogenes* açık sularda avlanan balıklarda bulunmamaktadır. Bununla birlikte bu balıklardaki kontaminasyon satış yerindeki iç organ temizleme işlemlerinden kaynaklanmış olabilir. Bu durumda *L. monocytogenes*'in potansiyel kontaminasyon kaynakları satış esnasında kullanılan buz, taşıma, kesim ve temizleme aletleri ve insan kaynaklı kontaminasyonlar olarak sıralanabilir. *L. monocytogenes* sıklıkla kıyı sularında ve göllerin yüzey sularında bulunduğundan bu kaynaklardan yakalanan veya kültüre edilen balıkların bu mikroorganizmayı taşımaları olasıdır (22).

Balıkların satış noktalarında potansiyel *Listeria* spp. kontaminasyonuna ilişkin çok az veri bulunmaktadır. Soutos ve ark., (7) balık marketlerde bulunan 100 bıçak, el, ambalaj materyalinden yapılan örneklemede beş örneğin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Kapalı tanklarda taşınan veya satıştan önce ikinci kez paketlenen ürünlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonu daha sık görülmektedir. Bu çalışmada *L. monocytogenes* kontaminasyonunun en çok hamsi balıklarında görülmesi söz konusu balık türünün Karadeniz bölgesinden genellikle dondurulmuş olarak Kayseri'ye taşınması ve çözündürülerek satışa sunulmasına bağlanabilir.

Balık ve çeşitli su ürünlerinin hazırlanma süreçleri ve tüketime sunulma biçimleri de *Listeria* türleri ile kontaminasyonlarda önemli rol alabilmektedir. Soğuk tütsülenmiş balık ürünleri üretim aşamasında teknolo-

jisi gereği *Listeria* türlerini inaktive edecek herhangi bir işlemden geçmemekte dolayısıyla listeriosis bulaşmasında risk teşkil etmektedir (23).

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan 4 farklı balık türünden sadece hamsi ve levrek türüne ait örneklerde *L. monocytogenes* kontaminasyonu tespit edilmiştir. Çalışma bulguları, Kayseri balık marketlerinden toplanan ve çeşitli türlere ait balık örneklerinde *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türlerinin çok düşük düzeylerde bulunduğunu ortaya koymuştur. Balıklar-daki farklı immun sistem yapıları, tür farklılıkları, çevresel koşullar, mikrobiyal flora farklılıkları, deniz veya tatlı su balığı olmaları ve genel sağlık ve stres durumlarından ileri gelen farklılıklardan dolayı *Listeria* spp. kontaminasyonları farklılık gösterebilmektedir.

Temas yüzeylerinin ve diğer alanların sanitasyon koşulları ve personel hijyeni uygulamaları satış noktalarındaki *L. monocytogenes* kontaminasyonunu azaltabilecek önlemlerin başında gelmektedir. Balık satışı yapan işletmeler, sattıkları ürünlerin *L. monocytogenes* ve diğer patojen bakterilerle kontaminasyonlarının, işletmede gıdanın temas halinde olduğu yüzeyler ve diğer ortam koşullarıyla ilgili olduğunu göz ardı etmemelidirler. Bu işletmeler, *L. monocytogenes* kontaminasyonuna ilişkin riskler hakkında bilgilendirilmeli ve gerekli önlemleri almalıdırlar. Balık ve diğer su ürünlerinin satış noktalarında gıda ile temas halinde olan yüzeylere ve personel hijyenine ilişkin koşulların uygun hale getirilmesi için sıkı yaptırımların uygulanması gerekmektedir.

Tezgahlarda çözündürülmüş balıkların bulundurulması yine hastalık riskini artıran bir unsur olarak karşımıza çıkabilmektedir. Yine balığın temizlenmesi esnasında açığa çıkan kan ve et suyu kalıntıları *Listeria* türlerinin üremesini destekleyen bir ortam oluşturabilmektedir. Dolayısıyla işletmelerin temiz ve kuru tutulması ve özellikle hamsi balığının taze şekilde satışa sunulması bu bakterinin yayılımının önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Su ürünlerinin işlenmesinde *L. monocytogenes*'in getireceği sağlık sorunlarının ortadan kaldırılmasına ilişkin genel olarak; soğuk depolama koşullarının sağlanması, satış yerlerinde gerekli önlemlerin alınarak kontaminasyonların engellenmesi, tezgahlarda çözündürülmüş balık satışının engellenmesi ve etkin ısı işlemi uygulamaları önerilebilir.

Sonuç olarak Kayseri'de satışa sunulan taze balık örneklerinden alabalık ve çipuralardan hiçbirinin *L. monocytogenes* ile kontamine olmadığı, analiz edilen diğer balık türlerinin (hamsi ve levrek) ise çok düşük düzeylerde kontamine olduğu belirlenmiştir. Bu veriler, Kayseri'de satışa sunulan taze balıkların *L. monocytogenes* açısından herhangi bir halk sağlığı riski yaratmadığını ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Rantsiou K, Alessandria V, Urso R, et al. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. Int J Food Microbiol 2008; 121: 99-105.
2. Hein I, Klein D, Lehner A. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria*

- monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res Microbiol* 2001; 152: 37-46.
3. Hartemink, R, Georgsson F. Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. *Int J Food Microbiol* 1991; 12: 189-196.
 4. Breer C, Schopfer K. *Listeria* in food. *Schweiz Med. Wochenschr* 1989; 119: 306-311.
 5. Zarei M, Maktabi S, Ghorbanpour M. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. in Seafood Products Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9: 108-112.
 6. Anonymous, Horizontal Method for Detection of *Listeria monocytogenes* International Standardization Organization ISO NORM, 11290-1 -/A1.2004.
 7. Soultos N, Abraham A, Papageorgiu K, et al. Incidence of *Listeria* spp. in fish and environment of fish markets in Northern Greece. *Food Control* 2007; 18: 554-557.
 8. Embarek PKB. Presence, detection and growth of *L. monocytogenes* in seafoods: a review. *Food Microbiol* 1994; 23: 17-34.
 9. Davies AR, Capell C, Jehanno D, et al. Incidence of foodborne pathogens on European Wsh. *Food Control* 2001; 12, 67-71.
 10. Salamoura C, Papadopoulou C, Vrioni G, et al. Detection of *L. monocytogenes* from fresh fish using real time PCR, PCR and standard ISO methods. In Proceedings of 3rd Hellenic Symposium on Food Hygiene and Food Technology. Vol A Athens Greece 2004; 276-279.
 11. Rodas-Suarez OR, Flores-Pedroche JF, Betancourt-Rule JM, et al. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 7410-7412.
 12. Draughon FA, Anthony BA, Denton ME. *Listeria* species in fresh rainbow trout purchased from retail markets. *Dairy Food Environ Sanit* 1999; 19: 90-94.
 13. Parihar VS, Barbuddhe SB, Danielsson-tham ML, et al. Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control* 2008; 19: 566-569.
 14. Autio T, Hielm S, Miettinen M, et al. Sources of *L. monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-Weld gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 150-155.
 15. Johansson T, Rantala L, Palmu L, et al. Occurrence and typing of *L. monocytogenes* strains in retail vacuum packed fish products and in a production plant. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 111-119.
 16. Jemmi T, Keusch, A. Occurrence of *L. monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. *Food Microbiol* 1994; 11: 309-316.
 17. Gudbjornsdottir, B., Suikho M. L. Gustavsson, P., et al. . The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiol* 2004; 21: 217 - 225.
 18. Jallewar PK, Kalorey DR, Kurkure NV, et al. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *Int J Food Microbiol* 2007; 114: 120-123.
 19. Yan H, Neogi SB, Mo Z, et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. *Int J Food Microbiol* 2010; 144: 310-316.
 20. Ertaş HB, Şeker E. Isolation of *Listeria monocytogenes* from fish Intestines and RAPD Analysis. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29: 1007-1011.
 21. Cenet O. Alabalık Fletolarında Farklı Yöntemlerle *Listeria monocytogenes*'in Arastırması. *YYÜ Vet Fak Derg* 2007; 18: 41-44.
 22. Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO). Fisheries Report No. 604. Expert consultation on the trade impact of *Listeria* in Fish products. Amherst, MA, USA. 1999,
 23. Oliver HF, Wiedmann M, Boor KJ. Environmental Reservoir and Transmission into the Mammalian Host, in *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Goldfine H, Shen H. (Ed). Springer Science+Business Media, LLC. 233 Spring Street, New York 2007, USA. pp. 111-139.