

KREMALI PASTALARDAN LISTERIA'LARIN SAPTANMASI

U. Tansel ŞİRELİ¹

İrfan EROL²

Sevda PEHLİVANLAR³

Detection of Listeria spp. in cream pastries

Summary: In this study a total of 90 pastry samples obtained from different pastry-shops in Ankara, including 30 butter-cream, 30 chocolate-cream and 30 fruit-cream pastry samples were tested for the presence and contamination level of *Listeria spp.* Food and Drug Administration (FDA) suggested method was used for the isolation and identification of *Listeria spp.* while the number of *Listeria spp.* was determined by Most Probable Number (MPN) technique.

Listeria spp. and *L. monocytogenes* were found in 3.3 % and 2.2 % of the samples, respectively. *Listeria spp.* and *L. monocytogenes* were isolated from 6.6 % and 3.3 % of the butter-cream pastry, 3.3 % of the fruit-cream pastry samples respectively, while the chocolate-cream pastry samples contained no *Listeria spp.* The positive samples contained *Listeria spp.* at the level of 1.5-24 MPN/g.

It is concluded that hygienic precautions should be provided for consumer protection from foodborne listeriosis.

Key words: Cream pastry, *L. monocytogenes*, *Listeria spp.*, MPN.

Özet: Bu çalışmada kremalı pastalarda *Listeria*'ların varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çerçevede Ankara'daki değişik pastanelerden alınan 30'u sade, 30'u meyveli ve 30'u çikolatalı olmak üzere toplam 90 kremalı pasta örneği materyal olarak kullanılmıştır. *Listeria*'ların izolasyon ve identifikasyonunda FDA (Food and Drug Administration) tarafından önerilen yöntem kullanılırken, *Listeria*'ların kontaminasyon düzeyleri En Muhtemel Sayı (EMS) tekniğiyle saptanmıştır.

Bu çalışmada, *Listeria spp.* ve *L. monocytogenes* örneklerin sırasıyla % 3.3 ve % 2.2'sinden izole ve tanıya edilmiştir. Çikolatalı kremalı pasta örneklerinde *Listeria* saptanamazken, *Listeria spp.* ve *L. monocytogenes* sade kremalı pasta örneklerinin % 6.6 ve % 3.3'ünden, meyveli kremalı pasta örneklerinin % 3.3'ünden saptanmıştır. Pozitif örneklerde *Listeria spp.* sayısı 1.5-24 MPN/g olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, gıda kaynaklı *Listeria* infeksiyonlarından tüketicinin korunması için, yapımda uygun hijyenik önlemlerin alınması önerilir.

Anahtar kelimeler: EMS, Kremalı pasta, *Listeria spp.*, *L. monocytogenes*.

1. Dr. Araş. Gör., AÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
2. Prof. Dr. AÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.
3. Araş. Gör., MKÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Hatay.

Giriş

Kremalı pastalar, besin maddeleri yönünden zengin bileşimleri, uygun pH ve su aktivitesi (a_w) değerleri ile birçok patojen mikroorganizmanın gelişimi için ideal bir ortam niteliğindedir (9,17). Özellikle bileşimine giren kremanın süt bazlı ve kolay kontamine olması, her zaman pastörize edilmeksizin kullanılması, ayrıca yapımında işletme ve personel hijyenine ilişkin temel kurallara uyulmaması sonucu patojen mikroorganizmalar ile kontamine olan kremalı pastalar, gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir (1,3,18).

Listeria'lar ubiquiter özelliği nedeniyle doğada yaygın olarak bulunan ve psikrofilik özelliği nedeniyle de buzdolabı sıcaklığında üreyebilen bir mikroorganizmadır (16,20). Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda süt ve süt ürünlerinin *L. monocytogenes* ile önemli düzeylerde kontamine olduğu bildirilmektedir. (11,13,15). Ayrıca yapılan epidemiyolojik çalışmalar, %30'a ulaşan ölümlerle sonuçlanan gıda kaynaklı listeriaz olgularının 1/2a ve 4b serotipleri ile kontamine süt ve süt ürünleri tüketiminden kaynaklandığını ortaya koymaktadır (8,10,19)

Yapılan literatür taramalarında Türkiye'de kremalı pastalarda *Listeria*'ların varlığı üzerine bir çalışmaya rastlanmamış olup, değişik ülkelerde de konuyla ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye'de kremalı pastaların yapım ve muhafaza koşulları ve buna ilişkin olarak hijyenik kalitesinin düşük olması (6) noktasından hareketle bu çalışmada, süt bazlı gıda infeksiyonlarının oluşumunda büyük önem taşıyan *Listeria monocytogenes* esas olmak üzere, *Listeria*'ların kremalı pastalarda varlığı ve *Listeria* infeksiyonlarının oluşumunda önemli olan kontaminasyon düzeyinin belirlenerek, halk sağlığı yönünden oluşturacağı potansiyel riskin saptanması ve konuyla ilgili olarak yapılacak çalışmalara zemin oluşturması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Ankara'daki değişik pastanelerden alınan 30'u sade, 30'u meyveli ve 30'u çikolatalı olmak üzere toplam 90 kremalı pasta örneği materyal olarak kullanılmıştır.

Örneklerin alınması, *Listeria*'ların izolasyon ve identifikasyonu

Aseptik koşullarda alınarak, soğuk zincir altında laboratuvara getirilen pasta örneklerinden *Listeria*'ların izolasyon ve identifikasyonu Hitchins (14) tarafından bildirilen FDA (Food and Drug Administration) metodu ile aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır. *Listeria* izole edilen örneklerde kontaminasyon düzeyi ise En Muhtemel Sayı (EMS; Most Probable Number; MPN) tekniğine (4) göre saptanmıştır. İki aşamalı olarak gerçekleştirilen çalışmanın ilk aşamasında 25 g örnekte *Listeria*'ların varlığı, ikinci aşamada ise *Listeria* saptanan örneklerde kontaminasyon düzeyi saptanmıştır.

Zenginleştirme

Bu amaçla her bir pasta örneğinden steril plastik torbalara 25g tartılıp, üzerine 225 ml Modifiye *Listeria* Enrichment Broth (MLEB), (Difco 0205) ilave edilmiş ve 2-3 dakika süreyle stomacher'da homojenize edildikten sonra, 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Selektif katı besi yerine ekim

Zenginleştirme işleminden sonra homojenattan bir öze dolusu alınarak, Oxford Agara (Difco 0225+0214) çizme yöntemiyle ekim yapılarak plaklar 35°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Kolonilerin değerlendirilmesi

Modifiye Oxford Agar'da üreyen *Listeria* şüpheli kahverengimsi yeşil ve/veya siyah halledi kolonilerden 5'i seçilerek biyokimyasal testler için Tryptic Soy Yeast Extract Agar'a (TSYEA), (Difco 0370) geçilmiş ve plaklarda 30°C'de 24-48 saat sonra üreyen kolonilerden sırası ile; Gram boyama, katalaz (%3'lük H₂O₂ ile), oksidaz (Oxidase paper, Merck 13303) ve SIM mediumda (Oxoid CM 435) hareketlilik testleri yapılmıştır. Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve SIM mediumda 25°C'de 7 gün içerisinde şemsiye tarzında üreme gösteren hareketli koloniler *Listeria* olarak değerlendirilmiştir.

Listeria türlerinin identifikasyonu

Pasta örneklerinden izole edilen *Listeria*'ların identifikasyonu amacıyla % 7'lik koyun kanlı agarda β -hemoliz ile L-Ramnoz, D-Ksiloz, Mannitol, Salisin, Dulsit, Metil red, Voges Preskauer, Nitrat redüksiyon ve CAMP testleri yapılmıştır.

L. monocytogenes suşlarının patojenite testi

Örneklerden izole ve identifiye edilen *L. monocytogenes* suşlarının patojeniteleri Hitchins (14) tarafından bildirilen fare patojenite testi ile belirlenmiştir.

Listeria Türlerinin Sayısal Tespiti

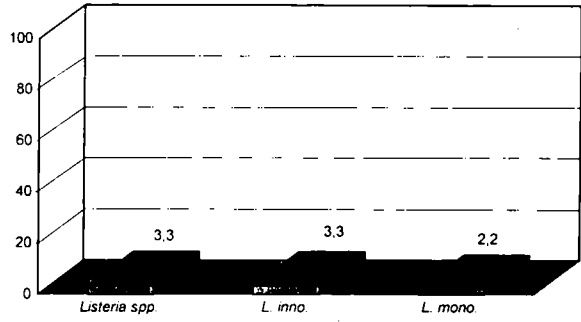
Listeria saptanan pasta örneklerindeki *Listeria* türlerinin sayısal dağılımı açıklanan izolasyon tekniği doğrultusunda 3'lü tüplere yapılan ekimlerle En Muhtemel Sayı tekniğiyle belirlenmiştir (4).

Bulgular

Bu çalışmada, incelenen toplam 90 kremalı pasta örneğinin 3'ünden (% 3.3) *Listeria* spp., 2'sinden (% 2.2) *L. monocytogenes* izole ve identifiye edilmiştir. Tablo 1 ve şekil 1, 2 ve 3'de görüldüğü gibi, sade kremalı örneklerin 2'si (% 6.6), meyveli kremalı örneklerin 1'i (% 3.3) *Listeria* ile kontamine bulunurken, çikolatalı kremalı pasta örneklerinde *Listeria*'ların varlığına rastlanmamıştır. *Listeria* izole edilen sade kremalı örneklerin birinden *L. innocua* ve *L. monocytogenes* birlikte, diğerinden yalnızca *L. innocua* identifiye edilirken, *Listeria* saptanan bir meyveli kremalı pasta örneğinden *L. innocua* ve *L. monocytogenes* birlikte identifiye edilmiştir.

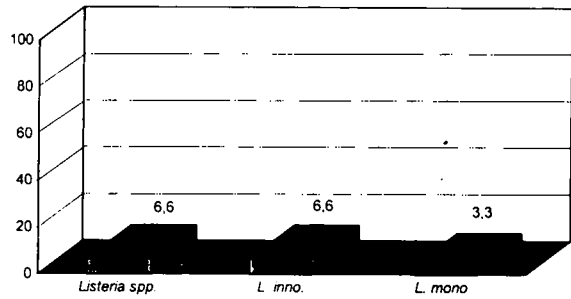
Tablo 1: Değişik tip pasta örneklerindeki *Listeria* türlerinin dağılımı.
Table 1: Distribution of *Listeria* spp. in different type of pastry samples.

Örnek Tipi	MPN/g	<i>Listeria</i> spp. n (%)	<i>L. innocua</i> n (%)	<i>L. monocytogenes</i> n (%)
Sade (n:30)	1.5-4.3	2 (6.6)	2 (6.6)	1 (3.3)
Meyveli (n:30)	24	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)
Çikolatalı (n:30)	-	-	-	-
Toplam (n:90)	-	3 (3.3)	3 (3.3)	2 (2.2)



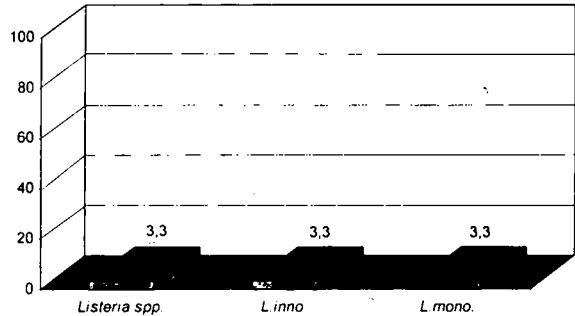
Şekil 1: Kremalı pasta örneklerinde *Listeria*'ların genel dağılımı (%).

Figure 1: Overall distribution of *Listeria* spp. in cream-pastry samples (%).



Şekil 2: Sade kremalı pasta örneklerinde *Listeria* türlerinin dağılımı (%).

Figure 2: Distribution of *Listeria* spp. in butter-cream pastry samples (%).



Şekil 3: Meyveli kremalı pasta örneklerinde *Listeria* türlerinin dağılımı (%).

Figure 3: Distribution of *Listeria* spp. in fruit-cream pastry samples (%).

Örneklerin *Listeria*'lar ile kontaminasyon düzeyine ilişkin olarak, sade kremalı ve meyveli kremalı pasta örneklerinde *Listeria* spp. sayısı sırasıyla 1.5-4.3 ve 24 MPN/g olarak bulunmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Kremalı pastalarda *Listeria*'ların varlığı ve kontaminasyon düzeyine yönelik olarak yapılan kapsamlı çalışmalarında Ferron ve Michard (7) Belçika'nın batısında 100 farklı pastaneden aldıkları toplam 300 kremalı pasta örneğinin % 21.7'sinden *Listeria* türlerini, % 13.7'sinden *L. monocytogenes*'i, % 10'undan *L. innocua*'yı ve % 2.3'ünden *L. seeligeri*'yi izole ve edentifiye etmişlerdir. Çalışmada 52 örneğin yalnızca 1 *Listeria* türü ile kontamine olduğu (30'u *L. monocytogenes*, 17'si *L. innocua* ve 5'i *L. seeligeri*) saptanırken, 13 örneğinin 2 tür ile kontamine olduğu (11'inde *L. monocytogenes* ve *L. innocua*, 2'sinde *L. innocua* ve *L. seeligeri* birlikte) saptanmıştır. *Listeria* pozitif 65 örnekten MPN ve direkt plak tekniği ile *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* sayısı örneklerin büyük bölümünde (59/65 ve 35/41) $<0.03-5$ MPN/g, 6 örnekte ise $2.5 \times 10^1 - >3.0 \times 10^5$ kob/g düzeyinde saptanırken, araştırmacılar kontaminasyon seviyesinin yapım yerine bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Ferron ve Michard'ın (7) inceledikleri kremalı pastalarda *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* izolasyon oranları, bu çalışmadaki izolasyon oranından (% 3.3 ve % 2.2) daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılık araştırmacılarında belirttiği şekilde muhtemelen yapım yerinin farklılığından kaynaklanmaktadır. Her iki çalışmada da identifiye edilen türler (*L. innocua* ve *L. monocytogenes*) ile aynı örnekte birden fazla türün saptanması ve araştırmacıların örneklerin büyük bölümünde saptadıkları düşük kontaminasyon düzeyi ile bu çalışmada saptanan kontaminasyon düzeyi arasında önemli benzerliklerin olduğu görülmektedir.

Greenwood et al. (11) İngiltere ve Galler'de içlerinde kremalarında bulunduğu süt ve süt ürünlerinde *Listeria*'ların varlığını be-

lirlemeye yönelik ulusal tarama çalışmalarında, 48 çiğ krema örneğinin 2'sinden (% 4.2) *L. monocytogenes*, 4'ünden (% 8.3) diğer *Listeria* türlerini (2 *L. innocua*, 1 *L. ivanovi* ve 1 *L. monocytogenes* dışında hemolitik *Listeria*) saptamışlardır. Aynı çalışmada incelenen 40 pastörize krema örneğinden ise *Listeria* saptanmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, kremalı pasta yapımında pastörize krema kullanılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Bu ve diğer çalışma bulgularından farklı olarak, Caserio et al.(2) tarafından incelenen 10 pasta örneğinde *Listeria* türlerinin izole edilememiş olması, bu çalışmada kullanılan örneklerin mikrobiyolojik kalitesi ve özellikle örnek sayısının az olması ile açıklanabilir.

Diğer taraftan, Gunasena et al. (12) Sri Lanka'daki marketlerden aldıkları ve içlerinde taze kremanın da bulunduğu süt ürünlerinin *L. monocytogenes* ile kontamine olduğunu saptarken, El-Marrakchi et al. (5) Rabat'ta (Fas) üretilen veya ithal edilen süt ürünleri içerisinde test ettikleri taze krema örneklerinden *L. monocytogenes* izole edilemediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada incelenen kremalı pastaların % 2.2'sinin relatif düşük düzeyde *L. monocytogenes* ile kontamine bulunmasına karşın, *Listeria*'ların psikrofilik özelliği nedeniyle buzdolabı sıcaklığında üreyebilmesi, uygun olmayan muhafaza koşullarında (ortam sıcaklığında uzun süre) üreme hızının artması, özellikle 1/2a ve 4b gibi yüksek virülense sahip serotiplerin immun sistemi baskılanmış insanlarda ölümle sonuçlanan infeksiyonlara neden olması dikkate alındığında, tüketime hazır gıda olan kremalı pastaların yapımında *L. monocytogenes* içermeyecek hijyenik koşulların sağlanmasına önerilir.

Kaynaklar

1. Bergdoll MS (1989) *Staphylococcus aureus*. In: M.P. Doyle (ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*. pp. 463-523. Marcel Dekker, Inc. NY.
2. Caserio G, Garzaroli C, Gronchi C (1991) *Spread of Listeria monocytogenes in foods and working environment*. *Induts Alimentari*, **30**, 129-132, 138.
3. Catsaras M, Seynave R, Sery C (1970) *Pastry creams and public health. I. Outbreak of foodborne type A staphylococcal enterotoxin poisoning caused by pastry cream*. *Ann Inst Pasteur Lille*, **21**, 177-192.

4. **De Man JC** (1983) *MPN-tables, corrected*. J Appl Microbiol Biotechnol, **17**, 301-305.
5. **El-Marrackchi A, Hamama A, El-Othmani F** (1993) *Occurrence of Listeria monocytogenes in milk and dairy products produced or imported into Morocco*. J Food Prot, **56**, 256-259.
6. **Erol İ, Sirtken B, Şireli UT, Kısa Ö, Albay A, Gün H, Kaymaz Ş** (1996) *Kremalı pastaların mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg, **43**, 413-420.
7. **Ferron P, Michard J** (1993) *Distribution of Listeria spp confectioners' pastries from western France: comparison of enrichment methods*. Int J Food Microbiol, **18**, 289-303.
8. **Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes BS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier A, Broome CV, Reingold AL** (1985) *Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis*. N Engl J Med, **312**, 404-407.
9. **Genigeorgis CA** (1989) *Present state of knowledge on staphylococcal intoxication*. Int J Food Microbiol, **9**, 327-360.
10. **Gilbert RJ** (1992) *Public health aspects and policies towards L. monocytogenes in foods*. 11th International Symposium on Problems of Listeriosis. Isopol XI, Eigtved's Pakhus - Copenhagen, 11-14 May.
11. **Greenwood MH, Roberts D, Burden P** (1991) *The occurrence of Listeria species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales*. Int J Food Microbiol, **12**, 197-206.
12. **Gunasena DK, Kodikara CP, Kumuda-Ganepola Widannapathirana S** (1995) *Occurrence of Listeria monocytogenes in food in Sri-Lanka*. J N Sci Coun Sri-Lanka, **23**, 107-114.
13. **Harvey J, Gilmour A** (1992) *Occurrence of Listeria species in raw milk and dairy products produced in Northern Ireland*. J Appl Bacteriol, **72**, 119-125.
14. **Hitchins AD** (1992) *Listeria monocytogenes*. Chapter 10. In: *FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th ed*. AOAC Int, Arlington VA, p. 148.
15. **Loncarevic S, Tham MLD, Tham W** (1995) *Occurrence of L. monocytogenes in soft and semi-soft cheese in retail outlets in Sweden*. Int J Food Microbiol, **26**, 245-250.
16. **Marth E** (1988) *Disease characteristics of L. monocytogenes*. Food Technol., **42**, 165-168.
17. **Notermans S, Tips P, Heuvelman KJ** (1984) *Einfluss der Milieu-Bedingungen auf das Wachstum von S. aureus und die Enterotoxin-Bildung*. Fleischwirtsch, **64**, 1490-1496.
18. **Sankaran R, Leela RK** (1983) *Prevalence of enterotoxigenic staphylococci in bakery products*. J Food Prot, **46**, 95-97.
19. **Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, Plikaytis BD, Mascola L, Pinner RW, Reingold AL, Broome CV** (1992) *Role of foods in sporadic listeriosis*. JAMA, **267**, 2041 - 2045.
20. **WHO** (1988) *Foodborne listeriosis*. Report of a WHO Informal Working Group. Geneva, 15-19 February.

Yazışma Adresi:

Dr. U.Tansel ŞİRELİ

A.Ü.VeterinerFakültesi

Besin Hijyeni ve Teknolojisi A.B.D.

Dışkapı/ANKARA

Tel : 317 03 15 / 356

e-mail : tsireli@veterinary.ankara.edu.tr.