

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MARMARA BÖLGESİNDEKİ SAĞLIKLI KOYUNLARIN KAN
SERUMLARINDA ELISA YÖNTEMİ İLE *Listeria monocytogenes* 'e
KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARIN SAPTANMASI ve LİSTERİOZİS
ÜZERİNDE ETİYOLOJİK-EPİZOOTİOLOJİK ÇALIŞMALAR

DOKTORA TEZİ

Araştırma Görevlisi
MUSTAFA HASÖKSÜZ

Tez Danışmanı
Prof.Dr.ATILLA ILGAZ

İSTANBUL - 1996

TEŞEKKÜR

Çalışmanın tüm aşamalarında her türlü olanağı sağlayan, büyük ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Hocam Prof.Dr.Atilla ILGAZ'a,

Araştırmam sırasında bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan Prof.Dr. Ahmet MİNBAY ve Doç.Dr.Hüseyin YILMAZ'a,

Örnek toplamak için yardımlarını esirgemeyen Araş.Gör.Tunay PALA ve Lab. Necdet ÇETİN'e,

Çalışmalarında yardımcı olan Yard.Doç.Dr.Seyyal AK, Yard.Doç.Dr. Yakut ÖZGÜR ve Araş.Gör.Dr.Nuri TURAN'a

Çalışmanın her döneminde yardımcı olan anlayışlı eşime,

İngiltere'den kontrol serumlarını gönderen Dr.J.C.LOW ve Dr.W. DONACHIE'ye sonsuz teşekkürler ederim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 609/210494

İÇİNDEKİLER

SAYFA

GİRİŞ	1
LİTERATÜR BİLGİSİ	3
GEREÇ VE YÖNTEM	27
BULGULAR	46
TARTIŞMA VE SONUÇ	58
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	82

GİRİŞ

Listeriozis, dünyanın birçok ülkesinde evcil hayvanlarda ve zaman zaman insanlarda sporadik ve endemik infeksiyonlar oluşturan bir hastalıktır. Zoonotik karakterdeki listeriozisin, insan ve hayvanlarda septisemi, meningoensefalitis ve abortusa neden olması, ayrıca hayvanlarda ekonomik kayıplara yol açması hastalığın önemini daha da artırmaktadır.

Dünyadaki listeriozis salgınlarının kontamine gıdalardan kaynaklandığının saptanması ve gıdalardan patogenik listeria türlerinin izole edilmesi birçok bilim adamının bu konuda araştırmalar yapmalarına neden olmuştur.

Bazı araştırmacılar tarafından listeriozis etkenlerinin ortaya konulması için kısa sürede sonuç verebilecek bakteriyolojik ve serolojik kitler kullanılmış ancak bunların klasik bakteriyolojik yöntemler kadar duyarlı olmadıkları bildirilmiştir. Ayrıca birçok araştırmacı tarafından uygulanan immunohistolojik ve genetik yöntemlerin listerial etkenlerin tanısında daha duyarlı oldukları saptanmış ve ekonomik olmamaları nedeniyle pratiğe indirgenememiştir.

Moleküler ve genetik çalışmalardaki ilerlemeler, listeria türlerinin yapılarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamış ve yıllardır süren taksonomik sorunlarına ışık tutmuştur.

Listeriozis etkenlerinin bakteriyolojik yöntemlerle izolasyonu için aylarca süren soğuk zenginleştirme yöntemlerinden sonra geliştirilen sıcak zenginleştirme yöntemi, Uluslararası Gıda ve Sağlık Örgütleri (FDA, IDF, USDA-FSIS) tarafından önerilmiş ve bir hafta zenginleştirme süresi olan bu yöntemi birçok araştırmacı, özellikle gıdalardan listeria türlerinin izolasyonu için rapor etmişlerdir.

Listeria türlerinin bazı serotiplerinin ortak antijenik özelliklere sahip olması nedeniyle, cins içindeki türler arasında ve farklı bazı bakteriler arasındaki serolojik testlerde kros-reaksiyon verebilmektedirler. Bu nedenle

infeksiyonun serolojik olarak tanısının sağlıklı konulabilmesi için spesifik antijen kullanılması gereği doğmuştur. Yapılan araştırmalarda patojen *L.monocytogenes* suşları tarafından sentezlenen Listeriolysin O toksininin infeksiyonun en önemli virülens faktörü olduğu saptanmış ve birçok araştırmacı tarafından Listeriolysin O, aday antijen olarak nitelendirilmiştir.

Dünyadaki listeriozis etkenlerinin insanlarda, hayvanlarda ve çeşitli gıdalardaki varlığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuş olup, Türkiye'de de listeriozis olguları bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Bu araştırmada Marmara Bölgesi'ndeki koyunların kan serumlarında *L.monocytogenes*'e karşı oluşmuş antikorların ELISA testi ile saptanması ve koyunların dışkı ve sütlerinde etkenlerin bakteriyolojik yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmıştır.



LİTERATÜR BİLGİSİ

İngiltere’de laboratuvar tavşanlarında monositozla seyreden bir infeksiyonda Murray ve ark., ilk kez 1926 yılında Gram pozitif bir çomak izole etmişler ve bu bakteriyi *Bacterium monocytogenes* olarak adlandırmışlardır (112). 1927 yılında Pirie, Güney Afrika’nın Tiger River bölgesinde yaşayan ve bir çeşit rodent olan 2 adet "Toteria lobengulae"de aynı mikroorganizmanın neden olduğu bir infeksiyonu saptamış ve Lord Lister’e duyulan saygı nedeni ile bu mikroorganizmayı *Listerella hepatolytica* olarak adlandırmıştır (124). Gill (55), 1937 yılında bu mikroorganizmanın koyunlarda ensefalitis oluşturduğunu ve enfeksiyonu "circling disease" olarak belirtmiş, bakteri ismini ise *Listerella ovis* olarak adlandırmıştır. Prevot (126), 1940 yılında taksonomik gerekçelerle bakterinin isminin Pirie tarafından *Listeria monocytogenes* olarak değiştirildiğini belirtmiştir.

Listeria cinsi önceleri, hücre morfolojisi ve katalazın pozitif olması nedeniyle Corynebacteriaceae ailesine yerleştirilmiştir. Numerik taksonomi çalışmalarındaki ilerlemelerle birlikte *Listeria* cinsi içindeki bakterilerin *Corynebacterium* cinsi ile çok az özelliği paylaştığı, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* ve özellikle *Brochothrix* cinsine daha yakın olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle "Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology"nin 1957 baskısında Corynebacteriaceae ailesinde yer verilen *Listeria* cinsi, Manual’in 1974 baskısında "Gram-pozitif, sporsuz, çomak şeklinde bakteriler" bölümünde, *Lactobacillaceae* ailesinden sonraki *Erysipelothrix*, *Caryophanon* cinsleri ile birlikte "yakınlığı kesin olmayan cinsler" olarak yerleştirilmiştir. Hücre duvarı analizleri ve DNA analizleri çalışmalarından sonra araştırmacılar, *Listeria* cinsinin *Lactobacillus* ve *Erysipelothrix* cinslerinden de çok farklı olduğunu, *Listeria* cinsine en yakın bakteri cinsinin et ürünlerinde rastlanılabilen ve patojenitesi olmayan *Brochothrix* cinsi olduğunu belirtmişler ve bu taksonomik yetersizlik giderilene kadar "Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology"nin 1986 baskısında "Düzgün, Sporsuz, Gram-pozitif Çomaklar" başlığı altında cins olarak gösterilmiştir (74,144).

Listeria cinsine 1961 yılında *Listeria denitrificans*, 1966 yılında *Listeria grayi*, 1971 yılında *Listeria murrayi*, 1979 yılında *Listeria innocua*, 1983 yılında *Listeia welshimeri* ve *Listeria seeligeri*, 1984 yılında *Listeria ivanovii* dahil edilmişlerdir (89,126,132,147,144).

L.monocytogenes' ten sonra izole edilen ilk tür olan *Listeria denitrificans*, bazı yapısal benzerliklerinden dolayı önceleri *Listeria* cinsi içerisinde yer almıştır. Hücre yapısı ve özellikle DNA analizlerindeki incelemelerde *Listeria* cinsindeki diğer türlerde Guanin-Sitozin % mol oranının ortalama 36.8-39.9 iken, *L.denitrificans*'ın Guanin-Sitozin % mol oranının 58-59 olduğunu belirten araştırmacılar, *L.denitrificans*'ın *Listeria* cinsi yerine *Jonesia* cinsi içerisinde *Jonesia denitrificans* olarak değiştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (133,141).

Stuart ve Welshimer (1974), *L.grayi* ve *L.murrayi* türlerini yeni spesifik bir cins olarak "Murraya" cinsi içerisinde *Murraya grayi subspecies grayi* ve *Murraya grayi subspecies murrayi* olarak göstermişlerdir. Fakat DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarındaki ilerlemelerden sonra bu iki türün *Listeria* cinsi içerisinde bulunmasının daha uygun olduğu belirtilmiştir (144).

Araştırmacılar son yıllara kadar *Listeria* serotip tablosundaki (tablo: 2) serotip 5'in yeni bir tür olduğunu belirtmişler ve bunun isimlendirilmesinde Bulgar Mikrobiolog Ivan Ivanov'un anısına önceleri bazı araştırmacılar tarafından *Listeria bulgarica* olarak adlandırıldığını, ancak daha sonraları *Listeria ivanovii* olarak değiştirildiğini bildirmişlerdir (144,147).

"International Systematic Bacteriology" komitesi tarafından belirlenen son raporda *Listeria* cinsi içerisindeki türler, *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L.ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* ve *L.grayi* olarak belirtilmiştir (145).

Listeria cinsi içerisindeki türlerden *L.monocytogenes*'in insan ve hayvanlarda, *L.ivanovii*'nin farelerde ve koyunlarda patojen olduğu, diğer türlerin ise patojen olmadığı bildirilmiştir (141,144). Ancak Walker ve ark. (162), *L.innocua*'nın meningoensefalitis oluşturduğunu klinik, bakteriyolojik, histopatolojik ve PCR analizleri ile saptamışlar ve *L.innocua*'nın potansiyel

patogen olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Hof ve ark. (68), *L.seeligeri*'nin farelerde patojen olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar *Listeria*'ların aerobik, fakültatif anaerobik, küçük, düz ya da bükülmüş çomakçık ya da kokoid tarzında Gram pozitif mikroorganizmalar olduklarını ve boyutlarının $0.4-0.5 \mu\text{m} \times 0.5-2 \mu\text{m}$ arasında değişebildiğini, kültürlerde tek tek, çift, V, Y şeklinde ya da kısa zincirler halinde göründüklerini bildirmişlerdir. Bu mikroorganizmaların genç kültürlerde kokoid formlarına, eski kültürlerde ise zaman zaman çok uzun filament şekillerine rastlanılabildiğini belirtmişlerdir (143,144). Yapılan çalışmalarda bir mukopolisakkarit kapsül varlığı saptansa da normal boyamalarda kapsülsüz görünen bakterilerin spor oluşturmamaları ve asido-rezistans özellik taşımadıkları saptanmıştır. *Listeria* cinsindeki bakterilerin, düşük oksijen konsantrasyonunda daha iyi ürediklerini ve optimum üreme ısılarının $30-37^\circ\text{C}$ olmasına karşın $1-45^\circ\text{C}$ 'ler arasında da üreyebildiklerini bildiren araştırmacılar, *Listeria*'ların pH 6-9 arasında üreyebildiklerini ve 60°C 'de 30 dakikada öldüklerini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar triptic soy agarda 37°C 'de 24 saatte üreyen *Listeria* kolonilerinin $0.2-0.8 \text{ mm}$ çapında, yuvarlak, şeffaf ve hafif kabarık olduklarını, tavşan, koyun, at, sığır ve insan kanı ilave edilen kanlı jelöz besiyerlerinde *L.monocytogenes*, *L.ivanovii* ve *L.seeligeri* türlerinin β -hemoliz zonu oluştuklarını rapor etmişlerdir (4,46,54,144). McKellar (104), *Listeria* cinsindeki bazı türlerin, *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* ile kanlı jelöz besiyerlerinde bu bakterilerin beta-toksini ile sinerjistik etki göstererek tam bir hemoliz alanı oluştuklarını bildirmiştir.

Birçok araştırmacı *Listeria* cinsindeki bakterilerde hareketin üreme ısı ile büyük ilişkisi olduğunu vurgulamışlar, $20-25^\circ\text{C}$ 'deki kültürlerde 2-4 adet flagella bulunduğu için daha aktif hareket eden suşların birçoğunda 37°C 'de hareket saptanamadığını, ancak 4°C 'de ya da 37°C 'de %10-20 CO_2 bulunan ortamlarda hareketin arttığını, ancak CO_2 'nin bu etkisinin oda ısısında görülmediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar *Listeria* cinsindeki türlerin asılı damla yöntemi ile hareket muayenesi yapıldığında bakterilerin kendi etrafında dönmeye başladığını, bu dönmenin gittikçe hızlanması ve genişlemesi sonunda bakterinin bir yöne fırladığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu hareket

şeklinin listeria için oldukça karakteristik olduğunu ve bakterilerin mikroaerofilik özellik taşıdıklarından, yarı katı agarda (SIM) yüzeyin 3-5 mm altında tam şemsiye tarzında koyu bir üreme bölgesi oluşturduklarını rapor etmişlerdir (4,78,143,144). Aşağıdaki tabloda “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”nin 1986 baskısında belirtilen Listeria cinsi içerisindeki bakterilerin biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 1: Listeria cinsindeki bakterilerin biyokimyasal özellikleri (144).

	1	2	3	4	5	6	7	8
β-hemoliz	+	+	-	+	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket (22°C)	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat	-	-	-	-	-	-	+	+
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil red	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+
TSIA	A / A	A / A	A / A	A / A	A / A	A / A	A / A	A / A
Hidrojen sülfid	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMP - test (Staphy. aureus)	+	-	-	+	-	-	-	-
CAMP - test (Rhodoc. equi)	-	+	-	-	-	-	-	-
Eskülin Hidrolizasyonu	+	+	+	+	+	+	+	+
Asit oluşumu								
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisin	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	-	+	+	-	-	+
Galaktoz	d	d	-	?	?	+	+	+
Arabinoz	-	-	-	?	?	-	-	+
Rhamnoz	+	-	d	-	d	-	d	-
Laktoz	d	+	+	?	?	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Sorbitol	d	-	-	?	?	-	-	-

- 1- Listeria monocytogenes
2- Listeria ivanovii
3- Listeria innocua
4- Listeria seeligeri

- 5- Listeria welshimeri
6- Listeria grayi
7- Listeria murrayi
8- Listeria denitrificans

L. monocytogenes'in penisilin ya da glisin içeren besiyerlerindeki kültürlerinde L formlarının oluştuğu, penisilinli besiyerindeki bakterinin küçük koklardan oluşan minik koloniler şekillendirdiği, glisinli besiyerinde ise uzun filamentöz ya da büyük küresel şekilde ürediği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (78,131,143,144). Lachica (87), triptic soy agarda üreyen listeria kolonilerinin, alttan 45 derecelik açı ile yansıtılan ışıkta karakteristik mavi-yeşil refle verdiklerini belirtmiştir.

Araştırmacılar *Listeria* cinsindeki türlerin antijenik yapılarının incelenmesinin 1930'larda başladığını ancak pratikte kullanılan ilk gruplamanın Paterson tarafından 1940'da oluşturulduğunu bildirmişler, buna göre önceliği H antijenlerine vererek ve somatik antijenleri de dikkate alarak 4 antijenik tipe ayırdığını rapor etmişlerdir (144). Seeliger ve ark. (143) somatik antijenlerine göre 4. serotipi 4a ve 4b olarak ikiye ayırmışlar Donker-Voet (30) bunlara, 4c, 4d, 4e serotiplerini eklemiş, 1. ve 3. serotipleri de H antijen farklılığına göre ikiye ayırmıştır. Araştırmacılar daha sonraki çalışmalar sonucunda antijen şemasının son şeklini tablo 2'de olduğu gibi belirtmişlerdir. Birçok bilim adamı listeria suşlarında bugüne kadar toplam 15 somatik antijen saptandığını ve bunlardan faktör III'ün bütün suşların antijenik formülünde yer aldığını, faktör XIV'ün ise sadece *L. murrayi* ve *L. grayi* suşlarında bulunduğunu, diğer somatik antijenlerin çeşitli serotiplerine benzer ya da farklı ilişkiler halinde bulduklarını rapor etmişlerdir. *Listeria* türlerinin H antijenleri arasında da farklılıklar olduğu, ancak listeria suşlarının hepsinde B flagella antijeni bulunduğu, A, C ve D antijenlerinin ise B antijeni ile birlikte ya da ayrı sıralandığı ve 15 listeria serotipinin 12'sinde flagella antijen formülünün ABC şeklinde olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (31,131,141,143,144).

Araştırmacılar *Listeria* türlerinin tablo 2'de belirtilen serotiplerinin dağılımında türler arasında farklılıklar bulunduğunu ve *L. monocytogenes*'in 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7 serotiplerinin olduğunu, *L. ivanovii*'nin 5 serotipinin, *L. innocua*'nın 6a, 6b ve 4ab serotiplerinin, *L. welshimeri*'nin 6a ve 6b serotiplerinin, *L. seeligeri*'nin 1/2b, 4c, 4d ve 6b serotiplerinin olduklarını ortaya koymuşlardır (131,141,143,144).

Tablo 2: *Listeria* cinsindeki bakterilerin antijenik yapıları (144)

Paterson	Seeliger, Donker-Voet	O antijenleri										H antijenleri	
1	1/2a	I	II	(III)*									AB
	1/2b	I	II	(III)									ABC
2	1/2c	I	II	(III)									B D
3	3a	II	(III)	IV									AB
	3b	II	(III)						(XII)	(XIII)			ABC
	3c	II	(III)	IV					(XII)	(XIII)			B D
4	4a		(III)	(V)	VII	IX							ABC
	4ab		(III)	V VI	VII	IX	X						ABC
	4b		(III)	V VI									ABC
	4c		(III)	V	VII								ABC
	4d		(III)	(V) VI	VIII								ABC
	4e		(III)	V VI	(VIII) (IX)								ABC
	5		(III)	(V) VI	(VIII)		X						ABC
	7		(III)						(XII)	(XIII)			ABC
	6a (4f)		(III)	V (VI) (VII)	(IX)						XV		ABC
	6b (4g)		(III)	(V) (VI) (VII)	(IX)		X XI						ABC
L. grayi			(III)						XII		XIV		E
L. murrayi			(III)						XII		XIV		E

() * parentez içinde olanlar bazen bulunmayabilir.

Araştırmacılar *Listeria* cinsindeki bakterilerin birbirleri ile ilişkili ancak çok kompleks bir antijenik yapıları olduğunu, bir suşun antijen yapısının ve serotipinin belirlenmesi için hem somatik O antijenlerinin hem de flagella H antijenlerinin incelenmesi gerektiğini vurgulamışlardır (25,144). Araştırmacılar ayrıca *Listeria* türlerinin diğer bazı bakterilerle de ortak antijenik komponentleri olduğunu ve bunların *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* cinsindeki bazı bakteriler ve *E. coli* ile serolojik olarak kros-reaksiyon oluşturabildiklerini rapor etmişlerdir (131,143).

İnsan ve hayvan infeksiyonlarından izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının ortalama % 95'inin 1/2 ve 4b serotipleri olduklarını bildiren araştırmacılar, ayrıca Amerika kıtasında izole edilen serotiplerin % 33'ünün 4b, % 62'sinin 1/2 serotipi olduğunu, buna karşın Avrupa ülkelerinde izole edilen

serotiplerin % 64'ünün 4b, % 29'unun 1/2 serotipleri olduğunu vurgulamışlardır (51,106).

Low ve ark. (99), 1989-1992 yılları arasında İskoçya'da 76 koyun listeriosis olgusundan izole edilen *L.monocytogenes* suşlarının 49'unun (% 64.5) serotip 1/2a, 14'ünün (% 18.4) serotip 4b, 10'unun (% 13.2) serotip 1/2b olduğunu bildirmişlerdir. Jones (75), yapılan epidemiyolojik çalışmalarda izole edilen suşlarda serotip 1/2a, 1/2b ve 4b'nin diğer serotiplere göre daha fazla olduğunu belirtmiştir. McLauchlin (105), İngiltere'de 1967-1985 yılları arasında insanlarda *L.monocytogenes*'ten kaynaklanan 722 enfeksiyon görüldüğünü ve bu olgulardan izole edilen suşların 423'ünün (% 59) serotip 4b, 130'unun (% 18) serotip 1/2a, 99'unun (% 14) serotip 1/2b olduğunu bildirmiştir.

Araştırmacılar yaptıkları moleküler genetik çalışmalarında hly, hly A, mpl, iap, act A, plc A, plc B genlerinin *L.monocytogenes*'in saptanmasında hedef genler olduğunu bildirmektedirler (84,166). Özellikle hly A geni tarafından kodlanan ve 58 kDa ağırlığında, protein yapısında listeriolysin O (LLO) toksininin en önemli virülens faktörü olduğunu bildiren araştırmacılar, bu toksine karşı oluşan spesifik antikorların saptanmasının etkenin tanısında önemli bir role sahip olduğunu ileri sürmektedirler (53,57,86,115,121). Portnoy ve ark. (125), hücre içi yaşam için gerekli listerial virülens faktör ve hemolitik sitolizin olan listeriolysin O (LLO) toksinin salgılanmasından önce, *L.monocytogenes*'in aktive olmuş makrofajlar tarafından öldürüldüğünü bildirmişlerdir. Vazquaz-Boland ve ark. (160), koyunlarda patojen olan *L.ivanovii*'nin toksininin 61 kDa moleküler kütleyle sahip Ivanolysin O (ILO) olduğunu ve patojenite konusunda Sphingomyelinase C ile birlikte kesin bir role sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Kathariou ve ark (79), LLO'nun streptolysin O ile kross reaksiyon verebileceğini ileri sürmektedirler. Mengaud (109), LLO'nun Streptococcus, Bacillus, Clostridium ve Listeria türleri tarafından üretilen diğer toksinlere antijenik olarak benzediğini, ancak antijenik varyasyonların ve gen sırasındaki değişikliklerin LLO ile Streptolysin O (SLO) ve Pneumolysin arasında kesin farklılıklar olduğunu saptamıştır.

Birçok araştırıcı son yıllarda *L.monocytogenes*'in tüm patojen suşları tarafından oluşturulan ve en önemli virülens faktörü olan LLO'nun serolojik deneyler için aday antijen olarak identifiye edildiğini bildirmişlerdir (50,86,96). Low ve ark. (96), LLO'ya karşı oluşan antikorların, yapılan immunoblotting çalışmalarında deneysel infeksiyonların en güvenilir belirtisi olduğunu bildirmişlerdir.

Wachter (161), *L. monocytogenes*'in patojenik faktörünün ortaya çıkmasının üreme ısısı ile ilişkili olduğunu ve prf A geni tarafından regüle edildiği bilinen tüm virülens faktörlerin salgılanmasının düşük ısıda üreme ile bastırıldığını bildirmiştir. Sokolovic ve ark. (152), *L.monocytogenes*'in LLO'dan başka ayrıca ısı şoku proteini sentezlediğini, bu proteinin ise LLO sentezini artırdığını ileri sürmektedir.

Geoffroy ve ark. (53), LLO'nun farelerde lethal dozunun 0.8 μ g olduğunu ve deri içi enjeksiyondan sonra hızlı bir yangisel reaksiyon oluşturduğunu saptamıştır. Araştırıcı bu çalışmada *L.monocytogenes*'in hücre içinde yaşamasında, LLO'nun önemli rolü olduğunu ve LLO'nun infekte makrofajları öldürdüğünü bildirmiştir. Araştırıcı ayrıca LLO'nun litik aktivitesinin pH 5.5'te en yüksek düzeyde olduğunu ve pH 7.0'de ise litik aktivitenin saptanamadığını, bu sonucun da konakçı dokularında toksinin litik aktivitesinin asidik mikroçevrede daha iyi ortaya çıkabileceğini belirtmiştir.

Araştırıcılar *listeria* etkenlerinin doğada yaygın olduğunu ve bugüne değin insanların yanısıra birçok hayvan türlerinden izole edildiğini rapor etmişlerdir. Bu hayvan türleri arasında memeli hayvanların (sığır, koyun, keçi, domuz, at, köpek, kedi, geyik, lama, rakun, tavşan, tarla faresi, kobay, lemming, kokarca ve inilla), kanatlı türlerinin (kanarya, ispinoz, tavuk, turna, kumru, ördek, kartal, kaz, şahin, papağan, sülün, güvercin, martı, serçe, hindi, ağaçkakan), kurbağa, bazı balık ve kabuklu hayvanların olduğunu belirtmişlerdir (15,18,50,81,113).

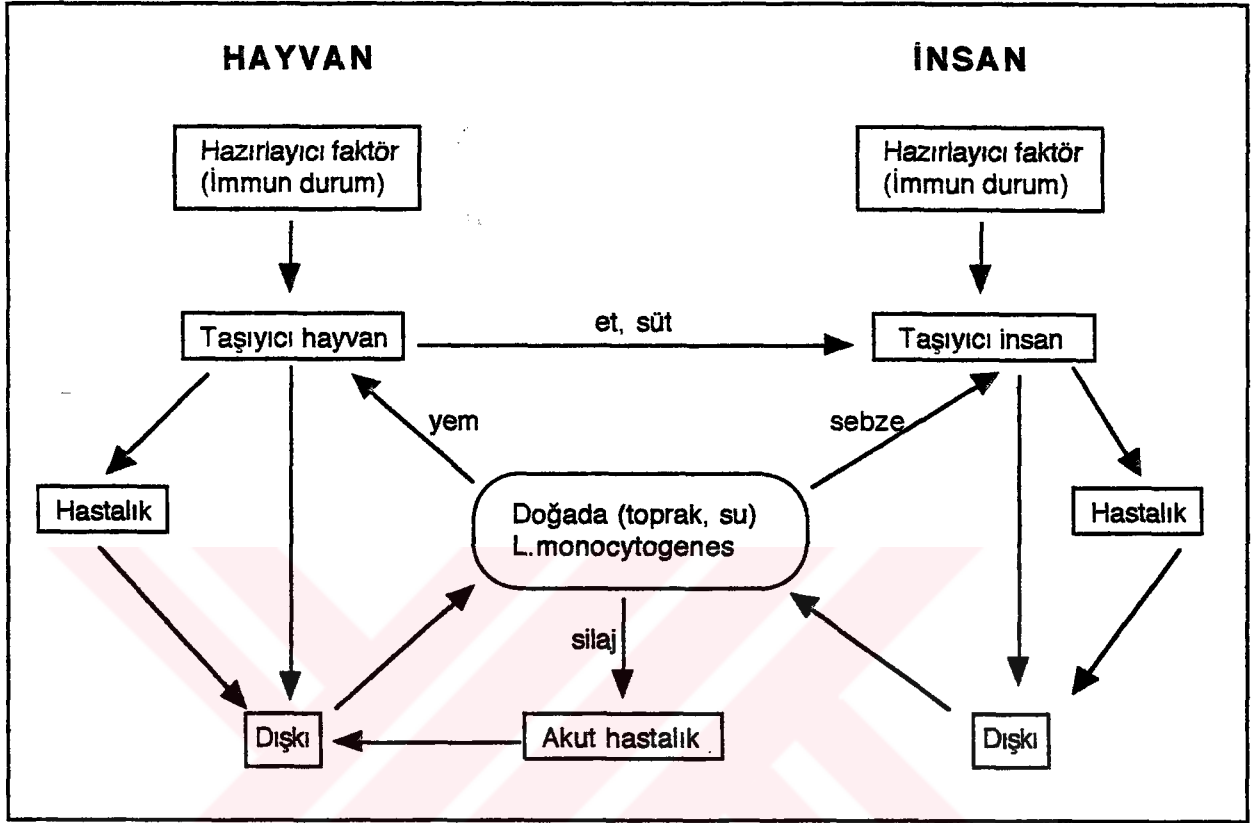
Listeriozis'te bulaşmanın, genellikle kontamine ya da infekte gıdalarla olduğunu ancak orofarinks, deri, konjunktiva ve ürogenital yolla da bulaşmanın olabileceğini araştırıcılar bildirmektedirler (13,32,108). Birçok araştırıcı ruminantlarda görülen listeriozis olgularında silajla beslenmenin

önemini rapor etmişlerdir (59,62,159). Fenlon (44), silajın pH'sı ile listeriaların üremesinin direk ilişkili olduğunu vurgulamış ve silajın fermentasyon süresince özellikle 60. günden sonra pH'nın artması ile listeriaların da sayı olarak arttığını saptamıştır. Gronstol (60), toplam 291 silaj örneğinde yaptığı çalışmada pH'sı 4'den az olan 101 silaj örneğinden % 22, pH'sı 4 ile 5 arasında olan 110 silaj örneğinden % 37, pH'sı 5'den fazla olan 80 silaj örneğinden de % 56 oranında *L.monocytogenes* izole etmiştir. Fenlon (45), silaj yapımında kullanılan yöntemlerin listerialar açısından önemli olduğunu vurgulamış ve özellikle silajın toprakla ilişkisinin kesildiği, her tarafının plastik torbalarla kapatıldığı silaj yapım yönteminde listeriaların daha kolay ürediğini belirtmiştir. Gitter ve ark. (56), silaj ile beslenen hayvanlarda kuru yem ile beslenen hayvanlara göre daha fazla listeriozis olgusu görüldüğünü bildirmiştir.

Birçok araştırmacı infekte hayvanların dışkı, süt, idrar, burun ve göz akıntıları, atık fetus ve uterus akıntıları ile çevreyi kontamine ettiklerini, insanların ise hastalık etkenini, infekte hayvanların et, süt ve ürünleri ile ya da bu ürünlerin paketlenmesi ve işlenmesi sırasında çevre kontaminasyonu sonucunda aldıklarını bildirmektedirler (8,13,33,61,62,142). Doyle ve ark. (34), *L.monocytogenes* ile infekte edilmiş sütlerde Uluslararası Gıda ve Sağlık Örgütü (FDA) tarafından bildirilen yöntemde 71.7°C ve 15 saniye pastörizasyonda etkenin canlı kalabileceğini, ancak 77.8°C'de 15.4 saniye ya da 73.9°C'de 16.4 saniye pastörizasyonda canlılıklarını yitirdiğini saptamışlardır. Bunning ve ark. (17), *L.monocytogenes*'in süt nötrofilleri içinde canlılığını sürdürdüğünü bildirmişlerdir.

Anderson ve ark. (3), epidemik ve sporadik listeriozis olgularında en önemli etkenin kontaminasyon olduğunu vurgulamaktadırlar. McLauchlin ve ark. (108), Veteriner Hekimler ve çiftçilerin, infekte hayvanlarla direkt temasları sonucu kutanöz listeriozis yönünden risk grubunu oluşturduğunu belirtmişlerdir. Chakraborty ve ark. (19), listeria infeksiyonlarına karşı insanlarda bulunan yaygın direnç mekanizmasının, doğal olarak virülensi azalmış suşlarla oluşan asemptomatik infeksiyonlara bağlı olabileceğini ileri sürmektedirler. Gronstol (62), insan ve hayvanlarda listeriozis etkenlerinin bulaşma, yayılma ve dağılımını şematize etmiştir (şekil 1).

Şekil 1: *L.monocytogenes* infeksiyonunda kontaminasyonun rolü (62)



Araştırmacılar tüketime sunulan gıda örneklerinden yüksek oranda *L.monocytogenes* izole etmişlerdir. Farber ve ark. (41), gıda örneklerinde yaptıkları çalışmada, 44 dana eti örneğinden 38 (% 86.4), 16 tavuk eti örneğinden 9 (% 56.3) ve 530 dondurma örneğinden 2 (% 0.4) *L.monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sharif ve ark. (149), 200 hayvansal gıda örneğinde yaptıkları bakteriyolojik çalışmada 101 *L.monocytogenes* (% 23.49) izole ettiklerini bildirmektedirler. Genigeorgis ve ark. (52), marketlerde satılan toplam 160 çiğ tavuk örneğinde yaptıkları çalışmada % 13.1 oranında *L.monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Schmidt ve ark. (137), domuz kıymasında % 24, sosiste % 17 oranında *L.monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Lovett ve ark. (95), California'da çiğ sütlerden *L.monocytogenes* izole edilemediğini, ancak Massachusetts'de % 7 oranında etkeni saptadıklarını

bildirmişlerdir. Loncarevic ve ark. (92), broiler tavuk kesimhanelerinde dondurulmadan önce ve dondurulduktan sonra tavukların boyun derilerinden alınan örneklerde yaptıkları bakteriyolojik çalışmalarda, dondurulduktan sonra alınan örneklerden daha fazla oranda *L.monocytogenes* izole edildiğini bildirmişler ve bunun da kullanılan sulardan kaynaklandığını saptamışlardır.

Yurdumuzda da gıda örneklerinde *L.monocytogenes* izolasyonu yönünden birçok çalışma yapılmıştır. Ünlü (155), 100 çiğ süt örneğinde yaptığı bakteriyolojik çalışmada 6 *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmiştir. Parlakgöl (120), 90 peynir örneğinde yaptığı çalışmada 7 *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmiştir. Çiftçioğlu (22), 100 kıyma örneğinde % 11, 100 sucuk örneğinde % 2 ve 100 tavuk etinde % 3 oranında *L.monocytogenes* izole etmiştir. Gün (64), toplama tanklarından alınan 100 süt örneğinin 4'ünden *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmiştir. Kaya ve ark. (80), sucuklarda yaptıkları çalışmada % 18 oranında *L.monocytogenes* saptamışlardır. Tümbay ve ark. (154), 323 peynir örneğinden 7 *L.monocytogenes* izole etmişlerdir.

Samuelsson ve ark. (135), 1981-87 yılları arasında Danimarka'da 138 listeriozis olgusu rapor edildiğini, 1985-87 yılları arasında görülen olguların ise salgın özellik taşıdığını bildirmişlerdir. Müller (114), Almanya'da 1988-89 yılları arasında yaptığı çalışmada, 1000 hasta insanın dışkısının 6'sından ve 2000 sağlam insanın dışkısının 16'sından *L.monocytogenes* izole ettiğini rapor etmiştir. Fenlon (43), yaptığı bir araştırmada kanalizasyon sularının denize boşaltılan bölgelerindeki lağım sularından ve bu bölgede yaşayan martıların dışkılarından aldığı örneklerde *Listeria* türlerini araştırmıştır. Araştırmacı bu çalışmada 99 martı dışkısının 15'inden ve lağım sularından *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmiştir.

Araştırmacılar *L.monocytogenes*'in doğada çok yaygın olduğunu belirtmişler ve insanlarda bildirilen 8 listeriozis salgınının 7'sine gıda kontaminasyonunun neden olduğunu, diğerinin ise saptanamadığını rapor etmişlerdir (8,48,77,136,138,165) (tablo 3).

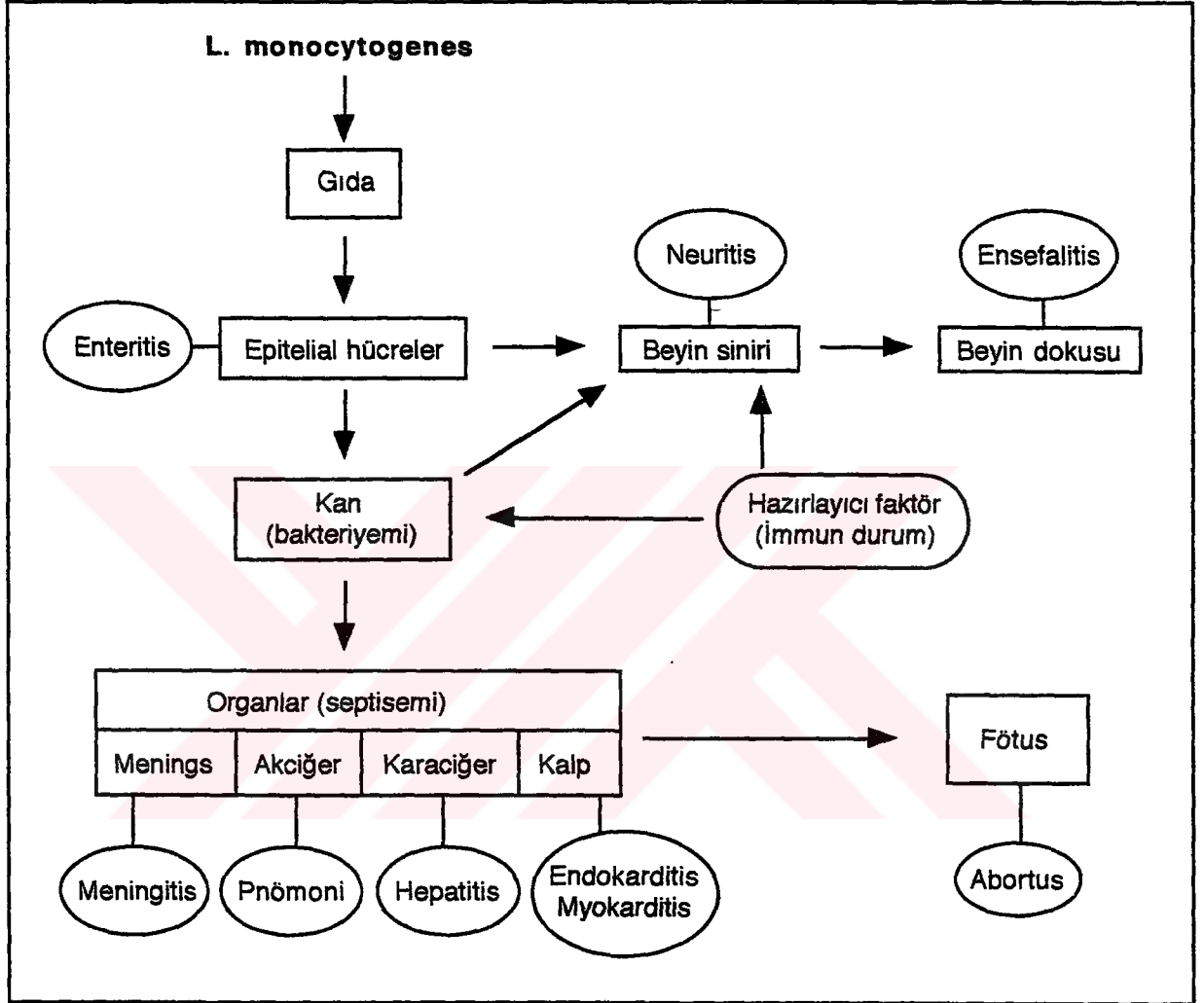
Tablo 3:1975 - 1993 yılları arasında insan listeriozis salgınları (8,48,77,136,138,165).

Yer	Tarih	Hasta	Ölüm	Kaynak
Boston, USA	1979	20	5	sebze
Yeni Zelanda	1980	29	9	balık
Nova Scotia, Canada	1981	41	17	kırmızı lahana
Massachusetts, USA	1983	49	14	süt
Los Angeles, USA	1985	142	48	"Mexican-Style" peynir
İsveç	1983-87	122	30	peynir
Philadelphia, USA	1987	36	16	bilinmiyor
Fransa	1992	279	63	domuz eti

Araştırmacılar hücre içi bakterisi olan *L.monocytogenes*'in infekte gıdalarla vücuda alındığında hücreyel immün yanıt oluşturduğunu ve polimorfnükleer lökositler ve makrofajlar tarafından fagosite edildiğini bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar immün sistemin baskılanması ya da immün sistem hücrelerinin oluşumunda aksaklığın olduğu durumlarda fagositozdan kurtulan *L.monocytogenes*'in, kanda bakteriyemi yaparak organlara yerleştiğini ya da nervus trigeminius ile beyin dokularına giderek ensefalitis oluşturduğunu rapor etmişlerdir (1,32,51,61,62). Mascola ve ark. (102), AIDS tanısı konulan 5 insanın kan kültürlerinden *L.monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişler ve fırsatçı patojen olan bu etkenin AIDS gibi immün sistemde özellikle T-hücre yapımında bozukluk oluşturan durumlarda büyük bir risk oluşturduğunu belirtmişlerdir. Gronstol (62), listeriozis oluşumunu şekil 2'de belirtilen şekilde şematize etmiştir.

Listeriozis, hayvanlar arasında birçok klinik tablo ile ortaya çıkmaktadır. Araştırmacılar koyun, sığır ve keçilerde ensefalomiyelitis, depresyon, septisemi, ishal, solunum güçlüğü, ateş, arka ayaklarda felçler, koyunlarda dairesel dönme hareketleri, durgunluk, boyun kaslarında sertlik, abortus ve mastitis gibi semptomların görüldüğünü, buna karşın at, domuz, köpek gibi monogastrik hayvanlarda septisemi, ateş, depresyon, ensefalitis ve ataksi gibi klinik belirtilerin saptandığını, kanatlılarda ise septisemi ve depresyonun yanısıra nekrotik kardiopatinin görüldüğünü bildirmektedirler (13,32,61,62, 113,158).

Şekil 2: L.monocytogenes'in neden olduğu infeksiyonun oluşumu (62)



Scott (139), listerial ensefalitis görünen 21 koyunda derin depresyonlar, lateral uzanış, öne doğru eğilerek yürüme, kol ve bacak hareketlerinde düzensizlikler oluştuğunu belirtmiştir. Seimiya ve ark. (148), 9 günlük buzağıda görülen ve meningitis, septisemi gibi bulgularla seyreden olguda beyinden L.monocytogenes izole edildiğini bildirmişlerdir. Reuter ve ark (129), Avustralya'da iki çiftlikte saptanan koyun listeriozis olgularında meningoensefalitis görüldüğünü, ancak listerial abortus görülmediğini rapor etmişlerdir.

Barlow ve ark. (9), koyunlarda görülen listerial ensefalitis olgularının genellikle 2 aylık kuzularda ve 2 yaşından büyük koyunlarda görüldüğünü bildirmişlerdir. Ladds ve ark (88), *L.monocytogenes* ile deneysel olarak infekte gebe koyunların atık fötuslarının karaciğer, dalak ve beyinlerinden etkeni saptamışlardır. Cooper (20), broiler tavuk çiftliğinde 4 haftalık yaşta olan tavuklarda tortikollis, inkoordinasyon ve depresyonla karakterize listerial ensefalitis görüldüğünü ve infekte tavukların beyinlerinden *L.monocytogenes* izole edildiğini bildirmiştir.

Araştırmacılar insanlarda klinik belirti gösteren listeriozis olgularının yaklaşık % 70'inde kişileri enfeksiyona duyarlı kılan bir durumun olduğunu belirtmişler, gebelik, yaşlılık, bebeklik, alkolizm, kanser, organ transplantasyonu, şeker hastalığı, kronik karaciğer ya da böbrek hastalıkları, immunsupressif sağaltım, AIDS gibi immün sistemin baskılanması ya da immün sistem hücrelerinin oluşumunda aksaklığın olması gibi durumlarda enfeksiyonun ortaya çıktığını bildirmektedirler. Aynı araştırmacılar insanlardaki semptomları; gebelik listeriozisi, yeni doğanların listeriozisi ve farklı listeriozis olguları olmak üzere üç bölümde incelemişlerdir. Gebelik listeriozisinde, enfeksiyonun hiçbir klinik belirti göstermeden seyredebileceğini ya da ateş, ishal, karın kaslarında kramplar görülebileceğini ve etkenin plasentaya geçerek 3-7 gün sonra düşüğe ya da ölü doğuma neden olabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar yeni doğanların listeriozisinde, etkenin anneden uterus içine alındığı durumlarda plasentada, yavrunun bütün iç organlarında ve derisinde küçük granulomların görüldüğü "granuloma infantisepticum" sendromu şekillenebileceğini belirtmişler ve diğer listeriozis olgularında ise meningoensefalitis, septisemi ve genellikle bağışıklığı yetersiz kişilerde osteomyelit, septik artrit, kolesistit, karaciğer apsesi, peritonit, akciğer enfeksiyonu, deri enfeksiyonları ve konjunktivit görülebileceğini bildirmişlerdir (8,13,32,40,51,71,101,107,157). Albritton ve ark (2), insan listeriozis olgularının genellikle 1 yaşına kadar bebeklerde ve 65 yaşından büyük yaşlılarda görüldüğünü vurgulamışlardır.

Birçok araştırmacı *Listeria* cinsi bakterilerin, gıdalardan, kontamine materyallerden ve klinik örneklerinden izolasyonlarında güçlüklerle karşılaşıldığını belirtmişlerdir. Listeriaların izolasyonunda soğuk

zenginleştirme yönteminin uzun yıllardır kullanıldığını bildiren araştırmacılar, bu yönteme göre 1 gr ya da ml örneğin 9 ml Triptose besiyerlerinde 4°C'de 2-3 ay inkübasyona bırakılmasını ve 15 günde ya da ayda bir selektif agarlara ekimlerinin yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu yöntemde inkübasyon süresinin uzun olması araştırmacıları inkübasyon süresi kısa olan yöntemlerin geliştirilmesine yöneltmiş ve bunun sonucunda sıcak zenginleştirme yöntemi ilk kez 1984 yılında Joseph Lovett tarafından geliştirilmiştir (93). FDA (Food and Drug Administration) yöntemi olarak da bilinen bu yönteme göre 25 gr ya da ml gıda örneği, içerisinde nalidixic asit, acriflavin, cycloheximide ve yeast extract bulunan 225 ml trypticase soy broth besiyerinde (zenginleştirme besiyeri) 30°C'de 1 hafta inkübe edilmektedir. İnkübasyondan sonra %0.5 KOH ile sulandırılarak ve sulandırılmadan direk olarak selektif agarlara ekimleri yapılmaktadır (94). Birçok araştırmacı FDA (Food and Drug Administration) yöntemini, özellikle süt ve süt ürünlerinden listeria izolasyonu için önermektedirler (67,127,140,151).

Lee ve ark. (90), geliştirdikleri yöntemde 25 gr ya da ml örneğin 225 ml ön zenginleştirme besiyerinde 30°C'de 24 saat inkübe edildiğini, bundan 0.1 ml alınıp içerisinde acriflavin oranı artırılmış olan 9 ml ikinci zenginleştirme besiyerine geçildiğini ve 30°C'de 24 saat inkübe edilerek selektif agarlara ekimleri yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. USDA-FSIS (U.S. Department of Agriculture Food Safety Inspection Service) yöntemi olarak da bilinen bu yöntemi McClain ve ark. (103), genellikle et ve et ürünlerinden *L.monocytogenes* izolasyonu için kullanılması gerektiğini rapor etmişlerdir.

Hitchins (66), deneysel olarak *L.monocytogenes* ile kontamine ettiği dondurmalarda FDA ve USDA yöntemlerini karşılaştırmış, ancak iki yöntem arasında önemli bir farkın olmadığını bildirmiştir. Van Netten ve ark. (156), *L.monocytogenes*, *Enterococcus* ve *S.aureus* ile kontamine gıda maddelerinden *Listeria* izolasyonunu kolaylaştırmak için L-PALCAMY zenginleştirme besiyerini kullanılmışlar ve özellikle 24. saatten sonra *Enterococ* ve *S. aureus*'un üremelerinin daha çok inhibe edildiğini saptamışlardır. Jensen (73), dışkıdan listeria izolasyonu için 4°C'de bulunan kültürden selektif besiyerine geçilmeden önce içerisinde 50 mg/l ceftazidime ve 0.05 g/l eskülin bulunan sıvı L-PALCAMY besiyerinde 35 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra

PALCAM agar besiyerine geçilmesinin izolasyon şansını artırdığını belirtmektedir. Fraser ve ark. (49), içerisinde lithium chloride, acriflavin, ferric ammonium citrate bulunan besiyerinin, özellikle gıdalardan listeria türlerini kısa sürede izole etmek için kullanılabileceğini bildirmektedirler.

Art ve ark (5), peynir, balık, et, ve dondurmada oluşan toplam 391 adet gıda örneğinde bakteriyolojik yönden yaptıkları çalışmada, Oxford agar, PALCAM agar ve nalidixik asit katkılı kanlı agarı karşılaştırmalı olarak kullanmışlar ve gıda örneklerinden listeria izolasyonu için Oxford agar ve PALCAM agarın daha selektif olduğunu saptamışlardır. Gunasinghe ve ark. (63), sosis, salam ve tavuk etinden listeria izolasyonu için Oxford agar ve PALCAM agar kullanıldığını ve 52'şer adet gıda örneklerinde yaptıkları çalışmada, Oxford agardan 4, PALCAM agardan 7 *L.monocytogenes* izole edildiğini bildirmişlerdir. Lee ve ark. (90), et ve et ürünlerinden listeria izolasyonu için kullanılan, içerisinde moxalactam ve LiCl katılmış phenylethanol agarın (LPM) McBride agardan daha selektif olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Hayes ve ark. (65), 402 gıda örneğinde soğuk zenginleştirme yöntemi ile sıcak zenginleştirme yöntemi olan USDA yöntemini kullanarak toplam 51 örnekte (% 13) *L.monocytogenes* saptamışlardır. Araştırmacılar bu izolasyonların 28'inin her iki yöntem ile, 21'inin USDA yöntemi ile, 2'sinin soğuk zenginleştirme yöntemi ile elde edildiğini ve bu çalışmada USDA yönteminin soğuk zenginleştirme yöntemine göre daha hassas olduğunu ($p<0.001$) vurgulamışlardır.

Seeliger ve ark. (146), dışkı, doku örnekleri, mekonium, kan ve medulla spinalis sıvılarında listeria izolasyonu için soğuk zenginleştirme yöntemini önermektedirler. Husu (70), 2 yıl süresince toplam 3878 sığır dışkı örneğinden listeria izolasyonu amacıyla soğuk zenginleştirme yöntemini kullandığını ve 86 adet *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmiştir. Vandegraaff ve ark (158), meningoensefalitis görülen koyunların beyinlerinden soğuk zenginleştirme yöntemi ile *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmişlerdir. Doyle ve ark. (35), dışkı ve biyolojik materyallerden listeria izolasyonu için nalidixic asit,

acriflavine, dipotasyum fosfat, glucose ve polimixin B katkılı zenginleştirme besiyerinin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Eld ve ark. (37), hayvanların otopsi materyallerinden sıcak zenginleştirme yöntemi olarak IDF (International Dairy Federation) yöntemi ile soğuk zenginleştirme yöntemini karşılaştırmışlardır. İki yıl süresince listeriazisten şüpheli ölen 68 hayvanın otopsi materyallerinin sıcak zenginleştirme yöntemi ile % 27.5'inden, soğuk zenginleştirme yöntemi ile % 4.3'ünden *L.monocytogenes* izole ederek sıcak zenginleştirmenin daha hassas olduğunu saptamışlardır. Curtis ve ark. (21), klinik örneklerinden listeria izolasyonu için Oxford agar ve McBride agarı kullanmışlar ve özellikle dışkıdan izole edilen 93 *L.monocytogenes*'in 87'sinin (% 94) Oxford agardan, 66'sının (% 82) McBride agardan izole edildiğini bildirmişlerdir.

Fedio ve ark. (42), 4 ayrı çiftlikte yaptıkları çalışmada 20 süt toplama tankının 12'sinden ve aseptik koşullarda alınan 262 ineğin süt örneğinin 1'inden *L.monocytogenes* izole edildiğini ayrıca bu çiftliklerdeki 69 ineğin dışkısının 10'undan ve 51 silaj örneğinin 4'ünden *L.monocytogenes* izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Gronstol (59), 3 yıl içinde listeriazis olgusu görülmeyen koyun sürüsünde *L.monocytogenes*'e karşı humoral ve hücrel bağışıklık ile bu koyunların dışkı ve sütlerinde bakteriyolojik olarak *L.monocytogenes* araştırmıştır. Araştırmacı bu çalışmada 106 gebe koyunun 68'inin dışkısından, bu koyunların kuzulamalarından sonra 43 koyunun süt örneklerinden *L.monocytogenes* izole ettiğini bildirmiş ve indirekt hemagglütinasyon testi ile bu koyunların kan serumlarında antikor titrelerinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

Vazquez-Boland ve ark. (159), 450 koyun bulunan bir çiftlikte *L.monocytogenes* ile infekte silajın yedirilmesiyle ortaya çıkan listeriazis infeksiyonu sonucunda 53 koyunun öldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar koyunların genellikle klinik bulgu göstermeden 36-48 saatte öldüklerini, bazı koyunların ise ishal, torticollis, salivasyon, ataksi, opistotonus gibi belirtiler gösterdiklerini ve 4-7 gün sonra öldüklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar silajın bakteriyolojik yoklamalarında 6.10^5 cfu/gr listeria izole ettiklerini ve silajın pH'sının 7.8 olduğunu rapor etmişlerdir.

Rodriguez ve ark. (134), 1 yıl süresince koyunların rektumlarından alınan dışkılarda yaptıkları listeria izolasyon çalışmalarında, klasik izolasyon yönteminde kullanılan zenginleştirme besiyeri ile bu zenginleştirme besiyerinden farklı olarak içerisinde tryptone, eskülin, ammonia ferric citrate ve koyun kanı bulunan besiyerlerini karşılaştırmışlar, sonuçta modifiye ettikleri besiyerinin daha spesifik olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca bu çalışmada izole ettikleri toplam 275 listeria suşunun 68'inin *L.monocytogenes*, 188'inin *L.grayi*, 16'sının *L.murrayi* ve 3'ünün *L.denitrificans* olduğunu bildirmişlerdir.

Doğuer (28), yurdumuzdaki ilk listeriozis olgusunun 1945 yılında koyunlarda saptandığını bildirmiştir. Sonraki yıllarda araştırmacılar sporadik listeriozis olgularını rapor etmişlerdir. İzgür ve ark. (72), iki koyun atık fötusunun mide içeriğinden *L.monocytogenes* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Wilesmith ve ark. (167), 1975-84 yılları arasında İngiltere'de toplam 1880 listeriozis olgusu görüldüğünü ve bu olguların 1179'unun koyunlarda, 601'inin sığırlarda, diğerlerinin de keçi, domuz, tavşan, tavuk, at, köpek ve kuşlarda görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca listeriozis görülen 75 farklı sürünün 53'ünde sadece ensefalitis, 13'ünde sadece abortus, 2'sinde sadece septisemi, 4'ünde abortus ve ensefalitis, 2'sinde septisemi ve ensefalitis, 1'inde abortus, septisemi ve ensefalitis bulguları ile infeksiyonun seyrettiğini belirtmişlerdir.

Nichterlein ve ark. (116), yaptıkları deneysel çalışmada her grupta 10 fare bulunan iki grup fareye intravenöz yolla 2.10^4 *L.monocytogenes* enjekte etmişler ve 14 gün süreyle dışkı ve idrarla bu bakterinin saçılmasını araştırmışlardır. İnokulasyondan sonra birinci gruptaki 10 farenin sadece 6'sının dışkısından etkeni izole etmişler ve farelerin bu etkenleri inokulasyonun 2 ile 9. günler arasında dışkı ile saçtığını saptamışlardır. Bu gruptaki 10 farenin idrarından etken izole edilemediğini, ikinci gruptaki 10 farenin karaciğer ve dalaklarında inokulasyondan sonra 3. güne kadar bakteri sayısının arttığını, sonra 14. güne kadar giderek azaldığını saptamışlardır. Briones ve ark. (16), *L.monocytogenes* ile infekte edilen farelerde yaptıkları deneysel çalışmada 10^9 bakteri verdikleri birinci grup farelerin karaciğer ve

dışkılarında inokulasyondan sonra 2. ve 8. günler arasında etkeni izole ettiklerini, 10^5 bakteri verdikleri ikinci grup farelerin ise sadece dışkılarında bakteriyi izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Low ve ark. (98), iki gün süresince düşük kaliteli silaj yedirilen 196 adet gebe koyunun bulunduğu çiftlikteki listeriozis olgularını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, silajın yedirilmesinden 48 saat sonra koyunlarda ishal ve topallık başladığını, antibiyotik uygulamasına karşın 19 koyunun öldüğünü, 60 koyunda vaginal akıntı, 6 koyunda sinirsel belirtiler, 5 koyunda abortus ve 1 koyunda da ensefalitis tablosu görüldüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada, ölen 10 koyunun otopsilerinde karaciğer, dalak, böbrek ve kan pıhtılarından *L.monocytogenes* izole ve tanımlanmış olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca abort yapan hayvanların 2'sinin placentasından ve 1 fötusun karaciğerinden *L.monocytogenes* izole edildiğini belirtmişlerdir.

Macleod ve ark. (100), 1974 yılında yaptıkları çalışmada, 97 ve 104 günlük iki gebe koyun ile 123-140 günlük 10 gebe koyunun atık yaptıklarını, fötuslarının karaciğer ve dalaklarından daha sonra *L.ivanovii* olarak isimlendirilen *L.monocytogenes* serotip 5'in izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bocklisch ve ark. (14), Almanya'nın Erfurt ve Cottbus bölgelerinde 1984-89 yılları arasında sığırlarda görülen listerial abortların bakteriyolojisini, serolojisini ve epizootiolojini araştırmışlardır. Araştırmacılar bölgede görülen toplam abort olayları içerisinde listerial abortus olaylarının oranının, Erfurt bölgesinde 9931 abort olgusunun %1.2'si, Cottbus bölgesinde 5643 abort olgusunun %1.8'si olduğunu ve bu abortların gebeliğin 4. ve 9. ayları arasında görünmesine karşın genellikle 6. ve 7. aylarda daha fazla görüldüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar Cottbus bölgesinde atık fötuslarından *L.monocytogenes* izole edilen 67 inekten 30'unu (%44.8) antikor taşıyıcılığı yönünden şüpheli ve pozitif olarak saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca abortus görülen olgularda ensefalitisin aynı zamanda görülmediğini ve bunun nedeninin ensefalitiste inkübasyonun abortusa göre daha uzun olabileceğini ileri sürmektedirler.

Miettinen ve ark. (111), yaptıkları deneysel çalışmada 5 keçiye oral yolla *L.monocytogenes* inokule etmişler ve 180 gün süresince kan serumlarında ELISA testi ile antikor düzeylerini incelemişler, ayrıca süt ve dışkılarında bakteriyolojik olarak etkeni araştırmışlardır. Araştırmacılar keçilerin inokulasyondan sonra 3 ile 15 gün arasında dışkılarıyla, ilk 2 gün içinde de sütleriyle etkeni saçtıklarını bildirmişlerdir. ELISA testi ile keçilerin kan serumlarında çalışma süresince (180 gün) antikor düzeyleri arasında bir benzerlik olmadığını belirten araştırmacılar, dışkılarından en az sürede (3 gün) etken izole edilen keçinin serumunda en yüksek titrede IgG saptandığını ve bu titrenin hiç azalmadığını, dışkılarından en uzun sürede (14 ve 15 gün) etken izole edilen 2 keçinin serumunda 20. güne kadar yükselen IgG düzeyinin 180 günün sonuna kadar yavaş yavaş azaldığını saptamışlardır. Araştırmacılar dışkılarından 7 ve 10 gün süre ile etken izole edilen 2 keçinin serumunda IgG düzeyinin hiç yükselmediğini ve seronegatif olarak değerlendirildiğini bildirmişlerdir.

Low ve ark. (97), 6 aylık 6'şarlı iki grup kuzularda yaptıkları deneysel araştırmada oral ve derialtı yolla *L.monocytogenes* verilen kuzuların klinik semptomları ve antikor düzeylerini araştırmışlar, ayrıca kandan etken izolasyon çalışmaları yapmışlardır. Birinci grup kuzulara hazırlanan inokulumları önce oral yolla, sonra 28. gün derialtı olarak inokule etmişlerdir. İkinci grup kuzulara ilk 27 gün bakteri verilmemiş, 28. gün diğer grupla birlikte derialtı olarak etkeni inokule etmişlerdir. Oral inokulasyondan sonra 6 gün süresince birinci gruptaki kuzuların kan kültürlerinde etkeni izole etmemişler, ancak derialtı uygulamadan sonra 2. 3. ve 4. günlerde kan kültürlerinden *L.monocytogenes* izole etmişlerdir. Oral inokulasyondan sonra klinik olarak bir bozukluğun olmadığını, sadece rektal ısılarının 24. saatten sonra yükseldiğini ve 72 saat yüksek kaldığını, sonra azaldığını saptamışlardır. Derialtı inokulasyondan 24 saat sonra kuzularda ateşin yükseldiğini, fakat ateşin 48 saat sonra normale döndüğünü ve ikinci gruptaki kuzuların birinde inkoordinasyon gözlendiğini bildiren araştırmacılar, ayrıca derialtı uygulamadan 10 gün sonra ikinci gruptaki bir kuzunun da sinirsel belirtiler gösterdiğini bildirmişlerdir. Derialtı uygulamadan 25 gün sonra inkoordinasyon gözlenen kuzunun öldürülerek, beyin ve iç organlarından bakteriyolojik olarak etkenin izole edilemediğini, ancak sinirsel belirtiler gösteren kuzunun beyninden

ise etkeni izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca bu çalışmada inokulasyondan deney sonuna kadar kan serumlarındaki antikörlerin düzeylerinin ELISA testinde Eşik değerini (Optical Densite=%OD) hesaplamışlar ve 0. gün %OD 5 iken 14. gün 35'e, 21. gün 70'e yükseldiğini, ikinci inokulasyondan sonra (35. gün) 95'e yükselen %OD'nin, 49. gün 85 düzeyinde olduğunu saptamışlardır.

Low ve ark. (96), yaptıkları deneysel çalışmada oral yolla infekte edilen koyunların kan serumlarında indirekt ELISA yöntemi ile anti-LLO antikörlerini saptamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada Streptolysin O ile absorpsiyon yaptıktan sonra anti-LLO antikörlerinin saptandığını, bunun da LLO'nun spesifik antijenik özelliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Hopital ve ark. (86), *L.monocytogenes* ile deneysel olarak infekte edilen koyunların kan serumlarında spesifik anti-listeriolysin O antikörlerini saptamışlardır. İnokulasyondan 10 gün sonra antikor titresinin en yüksek düzeye ($1/10^4$) ulaştığını ve 4 ay süren çalışma süresi sonunda da antikor titresinin yüksek düzeyde ($1/10^3$) kaldığını bildirmişlerdir.

Miettinen ve ark. (110), *L.monocytogenes* ile keçileri oral yolla infekte ettikleri çalışmada, birinci inokulasyondan 7 ay sonra ikinci inokulasyonu yapmışlar ve toplam 9.5 ay süren deneme süresince keçilerin kan serumlarında antikor düzeylerini araştırmışlardır. Araştırmacılar ayrıca bu çalışmada keçilerin klinik semptomlarını incelemişler, süt ve dışkılarında bakteriyolojik olarak *L.monocytogenes*'in varlığını araştırmışlardır. Çalışmada, birinci inokulasyondan 10 gün sonra LLO antikörlerinin oluştuğunu ve bu antikor düzeylerinin ikinci inokulasyondan sonra önemli bir oranda artış gösterdiğini, toplam 9.5 ay süren çalışma döneminde LLO antikörlerinin kaybolmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar LLO antijeni ile human anti-streptolysin O serumu arasında ve LLO antikörleri pozitif olan keçi serumları ile streptolysin O antijeni arasında bir reaksiyonun olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, birinci inokulasyondan sonra sadece genç keçilerde ilk 15 gün ateş yükselmesi olduğunu ve başka hiçbir klinik semptom oluşmadığını vurgulamışlardır. Keçilerin sütlerinden yapılan bakteriyolojik çalışmalarda etkenin sütle saçılmadığını, dışkılarından yapılan bakteriyolojik çalışmalarda

da birinci inokulasyondan sonra ortalama ilk 15 gün ve ikinci inokulasyondan sonra ortalama ilk 3 gün etkenin dışkı ile saçıldığını saptamışlardır.

Wardrope ve ark. (164), hiçbir klinik semptom göstermeyen 200 koyunun bulunduğu bir çiftlikte 10 gün içerisinde 5 haftalık 9 kuzuda ortaya çıkan listeriozis infeksiyonu sonucu üç kuzunun öldüğünü ve bu kuzuların beyinlerinden *L.monocytogenes* izole edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca koyunlara yedirilen silajın pH'sının 4.6 olduğunu vurgulamışlardır.

Berche ve ark. (11), *L.monocytogenes* ile infekte 28 hastanın, bakteriyel, viral ve mantar infeksiyonuna sahip 50 hastanın ve 51 sağlam kişinin kan serumlarında Dot-blot yöntemi ile LLO antikörlerini araştırmışlardır. Çalışmada 28 hastanın 27'sinde (%96.4), 50 hastanın 6'sında (%12) ve 51 kişinin 8'inde (%15.6) anti-LLO antikörleri saptanmıştır. Ayrıca çalışmada aynı serumlar kullanılarak somatik O ve flagellar H antijenleri ile aglutinasyon testi yapılmıştır. Aglutinasyon testinde listeriozisli 28 hastanın H antijenine karşı 3'ünde, O antijenine karşı 10'nunda; 50 hastanın H antijenine karşı 3'ünde, O antijenine karşı 9'unda; 51 kişinin serumunda H antijenine karşı hiç antikor saptamazken O antijenine karşı 6 kişinin serumunda listeria antikörlerinin varlığını ortaya koymuşlardır.

Hudak ve ark. (69), bakteriyolojik olarak listeriozis tanısı konan 29 kadın ve çocuk serumlarında serum aglutinasyon testi, komplement fikzasyon testi (CF) ve ELISA testleri ile antikor düzeylerini incelemişlerdir. Somatik O antijeni kullanarak yaptıkları bu testlerde ELISA testi ile CF testinin, serum aglutinasyon testine göre daha duyarlı olduğunu saptayan araştırmacılar, kross reaksiyonların da unutulmaması gerektiğini belirtmişlerdir.

Turilli ve ark. (153), 946 sığır kan serumunda ELISA ve Komplement fikzasyon testlerini karşılaştırarak seropozitiflik oranını belirten araştırmacılar, ELISA testi ile 80 (%8.5), Komplement fikzasyon testi ile 64 (%6.8) seropozitiflik saptamışlardır.

Yurdumuzda da insanların listeria taşıyıcılığı üzerine araştırmalar yapılmıştır. Özbal ve ark. (119), *L.monocytogenes*'in 1, 4a ve 4b serotipleri ile yaptıkları tüp aglutinasyon testinde 981 kadın kan serumunun 76'sında

(% 7.74) antikor titresinin 1/200 - 1/800 arasında olduğunu bildirmişler ve ayrıca bu serumların 69 'unun serotip 1, 3'ünün serotip 4a ve 4'ünün serotip 4b ile reaksiyon verdiğini ortaya koymuşlardır. Göz (58), düşük, ölü ve erken doğum yapan 240 kadının 35'nin (% 4.6) kan serumunda aglütinasyon titresi 1/320 ve üzeri olduğunu bildirmektedir. Otağ (118), 129 kadın kan serumunun 8'inin antikor titresinin 1/320 olduğunu bildirmiştir. Dalkılıç (23), insanların klinik materyallerinden yaptığı bakteriyolojik çalışmada 153 plasentadan 7, 130 vaginal akıntıdan 1, 100 serobrospinal sıvıdan 1, 98 mekonyumdan 1 ve 100 dışkıdan 6 *L.monocytogenes* izole ettiğini belirtmiştir.

Kerr ve ark. (82), gıdalarda *L.monocytogenes*'in saptanması için birçok test kit sistemlerinin geliştirildiğini rapor etmişlerdir. Bille ve ark. (12), API listeria test kiti sisteminin bir günde ve % 97.7 oranında sonuç verdiğini bildirmektedirler. Walker ve ark. (163), *L.monocytogenes* ile enfekte edilmiş peynir ve tavuk etlerinde Listeria-tek ELISA test kitinin % 97.5 oranında başarılı sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Kevin ve ark. (83), 102 tavuk eti örneğinin 29'unda bakteriyolojik yöntemle, 24'ünde ELISA test kiti ile listeria türlerinin saptandığını ve bu nedenle klasik izolasyon ve identifikasyon yönteminin daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır.

Domingo ve ark. (29), farelerin deneysel infeksiyonunda karaciğer ve dalakta peroxidase antiperoxidase (PAP) yöntemi ile *L.monocytogenes*'in saptandığını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu yöntemde tavşan anti-*L.monocytogenes* serumu ile nekroz odaklarındaki bakterilerin tepkime gösterdiğini ve farklı bakterilerle bir reaksiyonun olmadığını bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (128), kanatlıların listeria infeksiyonlarının tanısı için PAP tekniğinin kullanılmasının oldukça pratik olduğunu vurgulamışlardır. Peters ve ark. (123), immunohistolojik yöntem olarak peroxidase antiperoxidase (PAP) tekniği ile avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) tekniğini karşılaştırmalı olarak denemişler ve ABC tekniğinin daha iyi sonuç verdiğini saptamışlardır.

Aslan (6), listeriozis gibi merkezi sinir sisteminin etkilendiği infeksiyonların tanısı için medulla spinalis sıvısının kimyasal yapısındaki değişikliklerden yararlanılabileceğini ileri sürmüştür. Scott (139), ensefalitis

görülen koyunların medulla spinalis sıvısındaki protein konsantrasyonu ile lökosit ve lenfosit oranlarının infeksiyonun prognozu için geçerli bir parametre olmadığını belirtmiştir.

Rocourt (130), listeria türlerinin bakteriofajla tiplendirilme çalışmalarının ilk kez 1945 yılında başladığını ve ortalama 220 faj izole edildiğini bildirmiştir. Estela ve ark. (39), gıdalardan izole edilen toplam 225 *L.monocytogenes* suşunun 199'u aynı, 5'i farklı olmak üzere 204'ünün bakteriofajla tiplendirildiğini, 20'sinin ise tiplendirilemediğini belirtmişlerdir. Loessner ve ark. (91), gıdalardan izole edilen 454 listeria izolatları ile yaptıkları bakteriofaj tiplendirme çalışmalarında % 84.5 oranında sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Audurier ve ark. (7), 823 listeria suşu ile yaptıkları faj tiplendirme çalışmalarında % 78.4 oranında sonuç aldıklarını belirtmişlerdir.

Gellin ve ark. (51), listeria türlerinin kemoterapotiklere karşı değişen derecelerde duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Dillon ve ark. (27), *L.monocytogenes*'in 34 farklı suşunun antibiyotik duyarlılığı için yaptıkları çalışmada ampicillin ve penicillin-G'ye, cephalothin, chloramphenicol, erythromycin ve tetracycline göre daha duyarlı olduklarını saptamışlardır. Benner ve ark. (10), bütün listeria türlerine karşı teicoplanin'in (MIC 0.25 mg/l) etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ehlers ve ark. (36), *L.monocytogenes* ile infekte edilen farelere tedavi için uygulanan antibiyotiklerin miktarlarının önemli olduğunu bildirmişler, ayrıca 2 mg ciprofloxacin ya da 3 mg ampicillinin damar içi uygulamasının olumlu sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Kaeffer ve ark. (76), salmonellozise karşı antibiyotik kullanılmış farelerde *L.monocytogenes* ile yeniden infeksiyon oluşturulduğunda virülensin azaldığını vurgulamışlardır. Wardrope ve ark. (164), bir çiftlikte listeriozis infeksiyonu sonucu ölen kuzuların beyinlerinden *L.monocytogenes* izole edildiğini ve izole edilen suşun yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucu chloramphenicol, streptomycin, tetracycline, neomycin, furazolidone, trimethoprim ve penicilline duyarlı bulunduğunu bildirmişlerdir.

Nowacki ve ark. (117), çiftleşmeden önce canlı listeria aşısı ile aşılamanan koyunların gebelik süresince korunduğunu, kuzulamadan sonra da kolostrum ve sütteki aglutinin konsantrasyonunu arttırdığını saptamışlardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Marmara Bölgesinde, 19 değişik yörenin 23 farklı çiftliğinden, klinik yönden hiçbir semptom göstermeyen, 100 adet koyundan süt, dışkı ve kan; 80 adet koyundan dışkı ve kan; 820 adet koyundan ise sadece kan örnekleri toplandı (tablo 4).

Süt örnekleri, 150 ml'lik steril erlen-mayerlere yaklaşık 50 ml miktarında hijyen kurallarına uyularak memelerden direkt sağım yolu ile alındı.

Dışkı örnekleri, 20 ml'lik steril tüplere, her bir örnek için ayrı eldiven kullanılarak 2-3 gram miktarında rektumdan alındı.

Kan örnekleri, koyunların vena jugularis'lerinden steril, antikuagulansız 10 ml'lik vakumlu tüpler kullanılarak alındı.

Süt, dışkı ve kan örnekleri, içerisinde buz kalıpları bulunan kaplarla laboratuvara getirildi. Süt ve dışkı örneklerinden izolasyon çalışmalarına geçildi, kan örnekleri ise santrifüj edildi ve serumları -20°C'de saklandı.

I- BAKTERİYOLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN GEREÇ VE YÖNTEM

A- BAKTERİYOLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN GEREÇLER

1- Referens suşlar

İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezinden (KÜKENS) sağlanan *Staphylococcus aureus* KUEN 699 ve *Rhodococcus equi* KUEN 1490 suşları CAMP testi için kullanıldı.

Tablo 4: Toplanan örneklerin bölge, tarih, miktar ve numaraları.

BÖLGE	Tarih	Ö R N E K L E R			
		Süt	Dışkı	Kan	No
Kamiloba köyü (Silivri)	16.11.94	-	80 adet	80 adet	1-80
Karaağaç köyü (Hadımköy)	23.12.94	15 adet	15 adet	18 adet	81-98
İkitelli (İstanbul)	26.1.95	31 adet	31 adet	315 adet	99-413
Kayabaşı köyü (İstanbul)	30.5.95	15 adet	15 adet	17 adet	414-430
Sayalar köyü (İstanbul) (1. çiftlik)	16.6.95	13 adet	13 adet	25 adet	431-455
(2. çiftlik)	16.6.95	10 adet	10 adet	20 adet	456-475
(3. çiftlik)	16.6.95	6 adet	6 adet	17 adet	476-492
(4. çiftlik)	16.6.95	7 adet	7 adet	7 adet	493-499
(5. çiftlik)	16.6.95	3 adet	3 adet	4 adet	500-503
Çukurpınar (Kırklareli)	10.7.95	-	-	47 adet	504-550
Yeniköy (Balıkesir)	10.7.95	-	-	36 adet	551-586
Malkara (Tekirdağ)	10.7.95	-	-	29 adet	587-615
Uzunköprü (Edirne)	10.7.95	-	-	22 adet	616-637
Pınarhisar (Kırklareli)	10.7.95	-	-	14 adet	638-651
Kirazlı (Çanakkale)	10.7.95	-	-	16 adet	652-667
Hayrabolu (Kırklareli)	17.7.95	-	-	59 adet	668-726
Babaeski (Kırklareli)	17.7.95	-	-	26 adet	727-752
Lüleburgaz (Kırklareli)	17.7.95	-	-	16 adet	753-768
Keşan (Edirne)	17.7.95	-	-	25 adet	769-793
Gelibolu (Çanakkale)	17.7.95	-	-	21 adet	794-814
Vize (Kırklareli)	17.7.95	-	-	27 adet	815-841
İnanlı Tarım İşletmesi (Tekirdağ)	2.8.95	-	-	152 adet	842-993
Silivri (İstanbul)	2.8.95	-	-	7 adet	994-1000
GENEL TOPLAM		100 adet	180 adet	1000 adet	

2- Deney Hayvanları

Türkiye Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden (DETAM) sağlanan beyaz fareler patojenite testi için kullanıldı.

3- Besiyerleri

Çalışmada izolasyon amacıyla süt örnekleri için "sıcak zenginleştirme yöntemi", dışkı örnekleri için "soğuk zenginleştirme yöntemi" uygulandı. Sıcak zenginleştirme yönteminde; zenginleştirme besiyeri olarak Listeria Enrichment Broth (Difco), selektif besiyeri olarak PALCAM Agar (Oxoid) ve Listeria Selektif Agar (Oxford Formülasyonu-Oxoid) kullanıldı. Soğuk zenginleştirme yönteminde; 1. zenginleştirme besiyeri olarak Tryptose Broth (Difco), 2. zenginleştirme besiyeri olarak Listeria Selektif Broth (Merck), selektif besiyeri olarak Listeria Selektif Agar (Oxford Formülasyonu - Oxoid) ve Listeria Selektif Agar (Merck) besiyerleri kullanıldı.

İzole edilen suşların biyokimyasal özelliklerini saptamak için TSIA, MR-VP Medium, Urea Agar, Nitrat Agar, Simons Citrate Agar ve SIM Medium besiyerlerinin yanısıra Oksidaz, Katalaz, Indol, Eskülin Hidrolizasyonu ve Karbonhidrat Fermentasyon testleri için çeşitli besiyeri, ayıraç ve solusyonlar ile CAMP testi için %7 at kanlı agar kullanıldı.

Listeria Enrichment Broth (Difco 0222-17-3)

Bacto Tryptone.....	17.0 g
Bacto Soytone.....	3.0 g
Dextrose.....	2.5 g
Sodium chloride.....	5.0 g
Dibasic potassium phosphate.....	2.5 g
Cycloheximide.....	0.05 g
Acriflavin hydrochloride.....	0.015 g
Nalidixic acid.....	0.04 g

Hazırlanışı: 36 g besiyeri 1 litre distile suda kaynatılarak çözündürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

PALCAM Agar Base (Oxoid CM 877)

Columbia blood agar base.....	39.0 g
Yeast extract.....	3.0 g
Glucose.....	0.5 g
Aesculin.....	0.8 g
Ferric ammonium citrate.....	0.5 g
Mannitol.....	10.0 g
Phenol red.....	0.08 g
Lithium chloride.....	15.0 g
pH 7.2 ± 0.2	

PALCAM Selective Supplement (Oxoid SR 150E)

Polymixin B.....	5.0 mg
Acriflavine hydrochloride....	2.5 mg
Ceftazidime.....	10.0 mg

Hazırlanışı: PALCAM Agar'ın 34.5 gramı 500 ml distile suda kaynatılarak çözüldürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye soğutularak üzerine 2 ml steril distile su ile çözüldürülmüş PALCAM Selective Supplement karıştırıldı.

Listeria Selective Agar (Oxford Formulation) (Oxoid CM 856)

Columbia blood agar base.....	39.0 g
Aesculin.....	1.0 g
Ferric ammonium citrate.....	0.5 g
Lithium chloride.....	15.0 g
pH 7.0 ± 0.2	

Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation) (Oxoid SR 140)

Cycloheximide.....	200.0 mg
Colistin sulphate.....	10.0 mg
Acriflavine.....	2.5 mg
Cefotetan.....	1.0 mg
Fosfomicin.....	5.0 mg

Hazırlanışı: Listeria Selective Agar 'ın 27.75 gramı 500 ml distile suda kaynatılarak çözüldürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye soğutulurken üzerine 2.5 ml steril etil alkol ve 2.5 ml steril distile su ile çözüldürülmüş Listeria Selective Supplement karıştırıldı.

Tryptose Broth (Difco)

Bacto Tryptose.....	20 g
NaCl.....	5 g
Bacto Dextrose.....	1.0 g

Hazırlanışı: 26 g besiyeri 1 litre distile suda çözüldürüldü, 9'ar ml tüplere dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Listeria Enrichment Broth Base (Merck 10985)

Tryptose.....	20.0 g
D(+)glucose.....	1.0 g
Sodium chloride.....	5.0 g
Thiaminium dichloride.....	0.005 g
Trypoflavin.....	0.01 g
pH 7.4 ± 0.1	

Hazırlanışı: 26 g besiyeri ve 37.5 g Potassium thiocyanate (Merck 5124)1 litre distile suda kaynatılarak çözüldürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Listeria Selective Agar (Merck 10986)

Tryptose.....	10.0 g
D(+)glucose.....	1.0 g
Sodium chloride.....	5.0 g
Thiaminium dichloride.....	0.005 g
Trypoflavin.....	0.01 g
Nalidixic acid.....	0.04 g
Agar-agar.....	13.0 g

pH 7.4 ± 0.1

Hazırlanışı: 39 g besiyeri 1 litre distile suda kaynatılarak çözündürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Kanlı Agar

Nutrient Agar (Difco).....	23 g
Defibrine at kanı.....	70 ml

Hazırlanışı: 23 g besiyeri 1 litre distile suda kaynatılarak çözündürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. 50°C'ye soğutulduktan sonra 70 ml defibrine at kanı eklendi.

Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (Difco 0265-01-9)

Bacto Beef extract.....	3.0 g
Bacto Yeast extract.....	3.0 g
Bacto pepton.....	15.0 g
Proteose peptone.....	5.0 g
Bacto dextrose.....	1.0 g
Bacto lactose.....	10.0 g
Bacto sacchorose.....	10.0 g
Ferrous sulphate.....	0.2 g
NaCl.....	5.0 g
Sodiumthiosulphate.....	0.3 g
Bacto agar.....	12.0 g
Bacto phenol red.....	0.024 g

Hazırlanışı: 65 g besiyeri 1 litre distile suda kaynatılarak çözündürüldü, 10'ar ml tüplere dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Urea Agar Base (Difco 0283-01-7)

Bacto pepton.....	1.0 g
Bacto dextrose.....	1.0 g
NaCl.....	5.0 g
Potassium phosphate, monobasic.....	2.0 g
Urea Difco.....	20.0 g
Bacto phenol red.....	0.012 g

Hazırlanışı: 29 g besiyeri 100 ml distile suda çözündürüldü ve Seitz filtresi ile sterilize edildi. 15 g Bacto agar 900 ml distile suda çözündürüldü. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve 50°C'ye soğutulduktan sonra üzerine filtre ile sterilize edilen urea agar ilave edildi. 10'ar ml tüplere dağıtıldı ve yatık şekilde katılaşması sağlandı.

MR-VP Medium (Difco)

Buffered peptone.....	7.0 g
Dextrose.....	5.0 g
Dipotassium phosphate.....	5.0 g
pH 6.9	

Hazırlanışı: 17 g besiyeri 1 litre distile suda çözündürüldü, 10'ar ml tüplere dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

MR-VP Ayırıcıları:**Metil Red test ayırıcı:**

Metil red	0.1 g
%95 lik etil alkol.....	300 ml
Distile su.....	200 ml

Voges-Proskauer test ayırıcı:

Alphanaphtol.....	5 g
Absolut etil alkol.....	100 ml

KOH solusyonu:

KOH.....	40 g
Distile su.....	100 ml

Nitrate Agar (Difco 0106-01)

Nutrient broth.....	8.0 g
Potassium nitrate.....	1.0 g

Hazırlanışı: 9 g besiyeri 1 litre distile suda çözündürüldü, 10'ar ml tüplere dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Nitrat besiyeri ayıraçları**Griess-Ilosvay Solusyonu (A)**

Sulphanylik acid.....	0.8 g
Acetic acid.....	100 ml

Griess-Ilosvay Solusyonu (B)

α -naphtylamin 5 N.....	0.5 g
Acetic acid.....	100 ml

İndol Testi**Kovacs Ayıracı**

Para-dimetyl-amino-benzaldehide.....	5 g
İsoamyl alkol.....	70 ml
HCl.....	25 ml

Hazırlanışı: Aldehid, alkolde eritildi ve üzerine yavaş yavaş asit eklendi. Buyyon kültürü üzerine ayıraç damlatılarak test değerlendirildi.

Simmons Citrate Agar (Difco 0091-01)

Magnesium sulphate.....	0.2 g
Ammonium dihydrogen phosphate....	1.0 g
Dipotassium phosphate.....	2.0 g
NaCl.....	5.0 g
Bacto agar.....	15.0 g
Bacto brom thymol blue.....	0.08 g

Hazırlanışı: 24.2 g besiyeri 1 litre distile suda çözündürüldü, 10'ar ml tüplere dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Tryptic Soy Agar-Yeast Extract (TSA-YE)

Tryptic Soy Agar (Difco 0369-01)..... 40.0 g

Yeast Extract 6.0 g

pH 7.3±0.2

Hazırlanışı: Besiyeri 1 litre distile suda çözündürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Semisolid Indol Motility Medium (SIM) (Difco 0271-01)

Bacto beef extract..... 3.0 g

Bacto peptone..... 30.0 g

Peptonized iron..... 0.2 g

Sodium thiosulphate..... 0.025 g

Bacto agar..... 3.0 g

pH 7.3 ± 0.2

Hazırlanışı: 36 g besiyeri 1 litre distile suda çözündürüldü, 10'ar ml tüplere dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Eskülin Agar

Eskülin..... 1 g

Ferric citrate..... 0.5 g

Bacto-Agar..... 20 g

pH 7.4 ± 0.2

Hazırlanışı: 21.5 g besiyeri 1 litre peptonlu suda çözündürüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Oksidaz testi

Dry Slide Oxidase kit (Difco 3530-31)

Katalaz testi

Hidrojen peroksit (%30)..... 3 ml

Distile su..... 93 ml

Karbonhidrat Fermentasyon Besiyerleri

Pepton.....	10.0 g
NaCl.....	5.0 g
Andrade ayıracı.....	10 ml
Distile su.....	1000 ml

Andrade ayıracının hazırlanışı: 0.5 g acid fuksin. 100 ml distile suda eritildi ve üzerine 1 N NaOH eriyiği sarı renk oluncaya kadar eklendi.

Karbonhidrat Solusyonları

Arabinose (Sigma A-3256).....	5 g
Galactose (Difco 0163-15).....	5 g
Glucose (Merck 8346).....	5 g
Laktose (Merck 7657).....	5 g
Mannitol (Merck 5983).....	5 g
Rhamnose (Sigma R-3875).....	5 g
Salicin (Sigma S-0625).....	5 g
Sorbitol (Difco 0179-15).....	5 g
Trehalose (Sigma T-9531).....	5 g
Xylose (Sigma X-1500).....	5 g

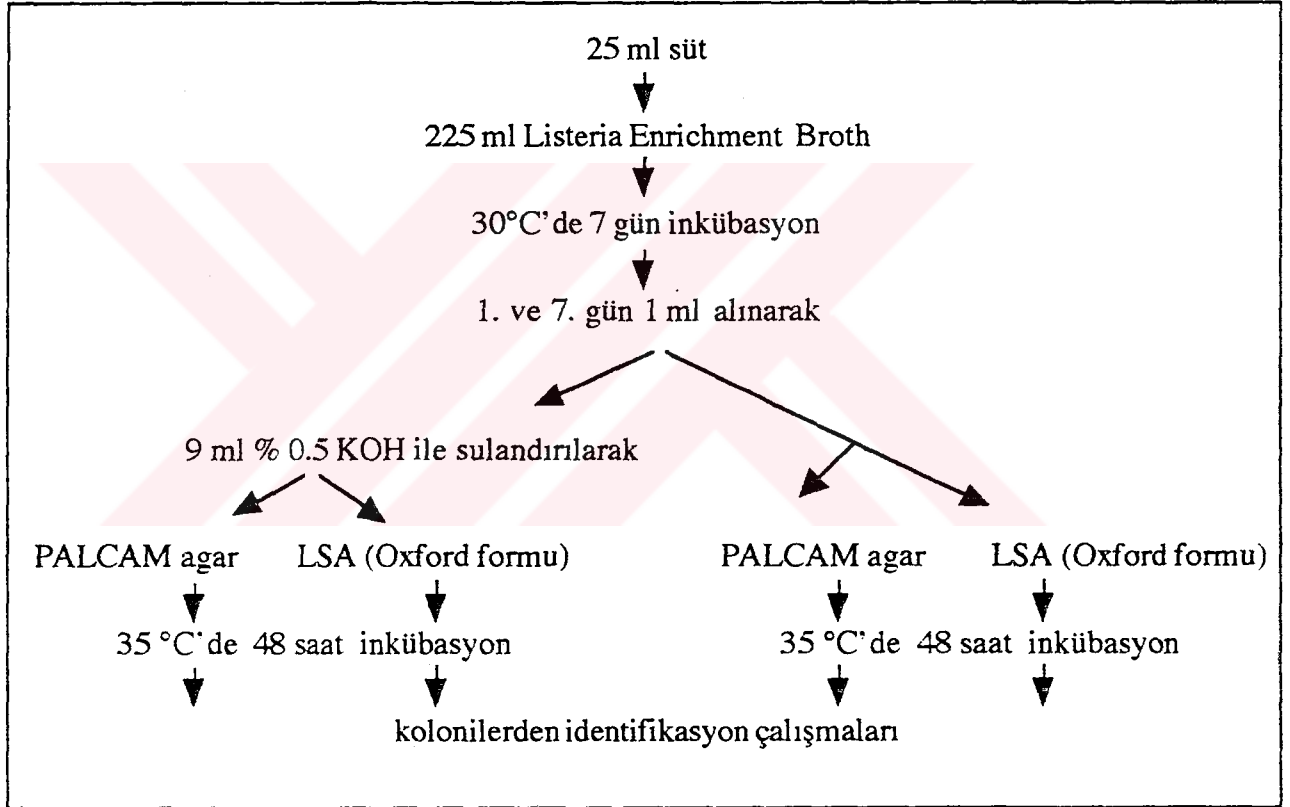
Hazırlanışı: Her bir karbonhidratın 5 gramı 100 ml distile suda çözüldürüldükten sonra 0.22 µm'lik milipor filtreler kullanılarak sterilize edildi.

B- BAKTERİYOLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN YÖNTEMLER**İZOLASYON ÇALIŞMALARI****A- Süt örneklerinden:**

Süt örneklerinden izolasyon çalışmaları, Lovett (94). tarafından geliştirilen sıcak zenginleştirme yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde göre 25 ml süt alınarak 225 ml Listeria Enrichment Broth'a ekildi ve 30°C'de 7 gün

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 1. ve 7. günü bu kültürden 1 ml alınarak 9 ml %0.5'lik KOH ile sulandırıldı, ayrıca bu kültürden 10 μ l alınarak sulandırılmadan PALCAM Agar ve Listeria Selektif Agarlara (Oxford formulasyonu) ayrı ayrı ekimleri yapıldı. Agarlar 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve üreyen kolonilerden Gram boyama, katalaz testi ve oksidaz testi yapılarak Listeria şüpheli kolonilerden saf kültür elde etmek için %7 at kanlı agarlara pasajlar yapıldı (şekil 3).

Şekil 3: Sıcak zenginleştirme yöntemi ile süt örneklerinden izolasyon yöntemi.

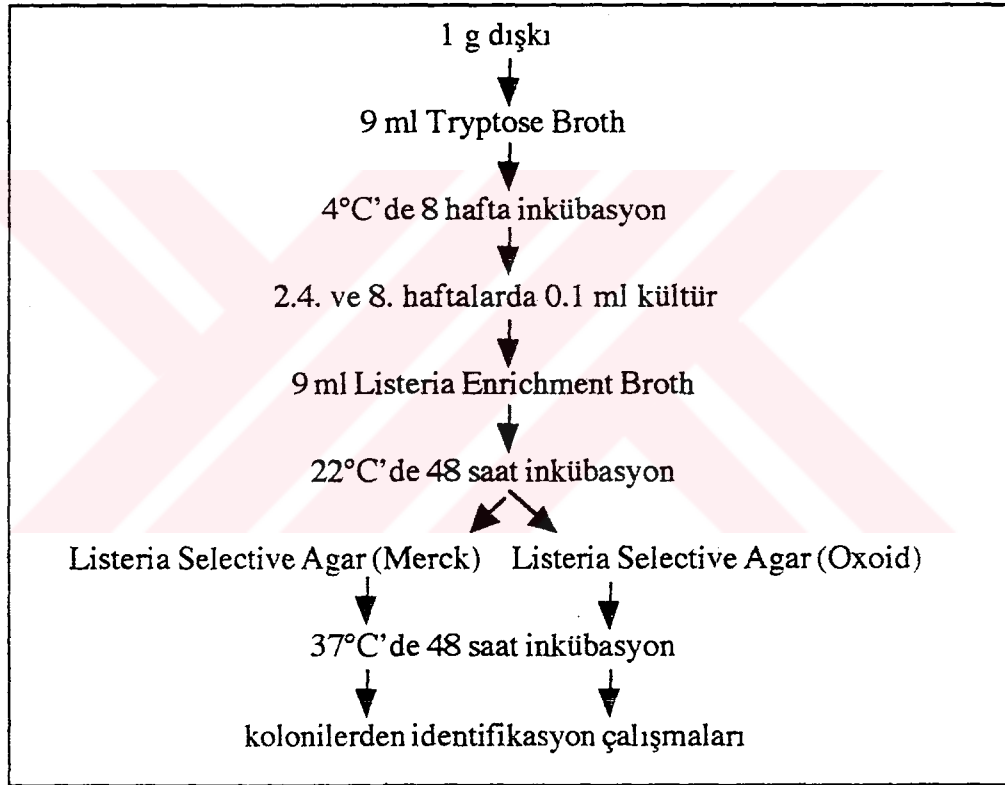


B- Dışkı örneklerinden:

Dışkı örneklerinden izolasyon çalışmaları, Husu (70)'nun bildirdiği soğuk zenginleştirme yöntemine göre yapıldı. Bu yönteme göre 1 gram dışkı alınarak 9 ml'lik Tryptose Broth (Difco 0062-01) besiyerlerine ekildi ve 4°C'de 8 hafta inkübasyona bırakıldı. Kültürden, inkübasyonun 15., 30. ve 60. günlerinde

0.1 ml alınak 9 ml'lik Listeria Enrichment Broth Base (Merck) besiyerlerine geçildi. Besiyerlerinin 22°C'de 48 saat inkübasyonundan sonra 10 µl miktarında alınarak Listeria Selektif Agar (Oxford formulasyonu) ve Listeria Selektif Agarlara (Merck) geçildi. Agarlar 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı ve üreyen kolonilerden Gram boyama, katalaz testi ve oksidaz testi yapılarak Listeria şüpheli kolonilerden saf kültür elde etmek için %7 at kanlı agarlara pasajlar yapıldı (şekil 4).

Şekil 4: Soğuk zenginleştirme yöntemi ile dışkı örneklerinden izolasyon yöntemi.



İDENTİFİKASYON ÇALIŞMALARI

Biyokimyasal Özelliklerin saptanması

Hareket muayenesi:

Listeria şüpheli bakterilerin 22°C'deki 24 saatlik nutrient broth besiyerlerindeki kültürlerinden lam-lamel arası yöntem ile hareketleri incelendi.

SIM Medium'da üreme:

Hareket muayenesi için ayrıca kanlı agardaki saf kültürden iğne öze ile bir tek koloniden alınan bakteriler SIM Medium'a dik olarak edildi. 22°C'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinin yüzeyinde şemsiye tarzında üremeler pozitif kabul edildi.

Triple Sugar Iron Agar (TSIA) Testi

Şüpheli kolonilerden iğne öze ile alınarak yatık olarak hazırlanan besiyerlerinin dip kısmına ve yatık yüzeyine ekimleri yapıldı. 37°C'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra asitlik, alkalilik, gaz oluşumu ve H₂S oluşumu incelendi.

Nitrat Testi

Şüpheli kolonilerden iğne öze ile alınarak besiyerlerinin dip kısmına ekimleri yapıldı ve 37°C'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinin üzerine 1 ml Nitrat A solusyonu ve 1 ml Nitrat B solusyonu ilave edilerek besiyerinin üst kısmında kırmızı rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

Üre testi

Şüpheli kolonilerden iğne öze ile alınarak yatık olarak hazırlanan besiyerlerinin dip kısmına ve yatık yüzeyine ekimleri yapıldı. 37°C'deki 24-48 saatlik inkübasyondan sonra pembe rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

Sitrat kullanım testi

Şüpheli kolonilerden iğne öze ile alınarak yatık olarak hazırlanan besiyerlerinin dip kısmına ve yatık yüzeyine ekimleri yapıldı. 37°C'deki 24-48 saatlik inkübasyondan sonra mavi rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

İndol testi

Şüpheli kolonilerin Nutrient broth besiyerlerindeki 37°C'deki 24 saatlik kültürleri üzerine 0.5 ml Kovacs ayırıcı eklendi. Tüp çalkalanarak besiyerinin üst kısmında kırmızı rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

MR-VP testi

Şüpheli kolonilerden MR-VP besiyerlerine ekimleri yapıldı ve 37°C'deki 24-48 saatlik inkübasyondan sonra temiz iki ayrı test tüpüne 1'er ml kültür alındı. Test tüplerinden birine 1 ml Metil red solusyonu, diğerine 0.6 ml VP test ayırıcı ve 0.2 ml KOH solusyonu eklenerek tüpler çalkalandı. Sabit kırmızı rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

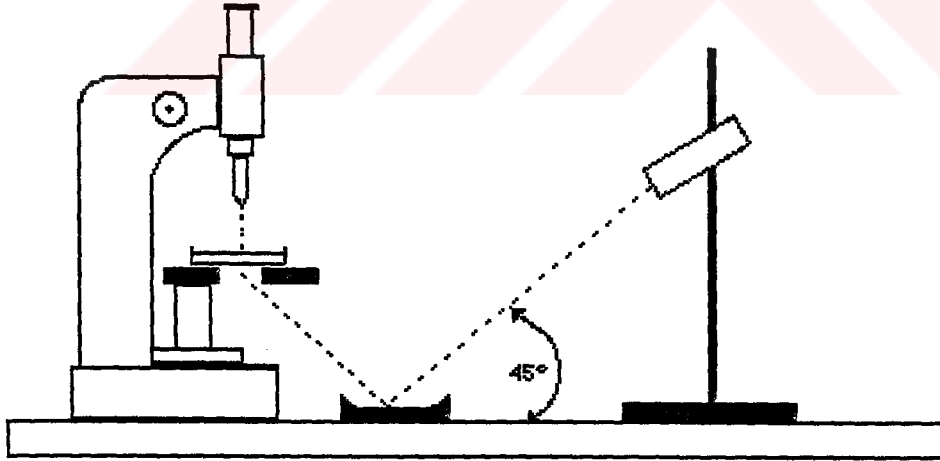
Eskülin hidrolizasyon testi

Şüpheli kolonilerden Eskülin Agar besiyerilerine ekimleri yapıldı ve 37°C'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinin siyah renk alması pozitif olarak değerlendirildi.

Henry iluminasyon tekniği

Yeast Extract eklenmiş Tryptic Soy Agar (TSA-YE) besiyerlerindeki listeria şüpheli koloniler, alttan 45° açı ile gelen bir ışık yardımıyla stereomikroskopta incelendi (şekil 5).

Şekil 5: Henry iluminasyon tekniği



Hemoliz testleri

a- Nokta hemolizi

Şüpheli kolonilerden petri kutularında hazırlanan %7 at kanlı agarlara iğne öze ile dik olarak ekimleri yapıldı ve 37°C'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinde hemolizler değerlendirildi.

b- CAMP testi

Staphylococcus aureus ve *Rhodococcus equi* suşlarının petri kutularında hazırlanan %7 at kanlı agar besiyerlerine vertikal olarak çizilerek ekimleri yapıldı. Şüpheli kolonilerden bu iki referens suşların ekim çizgilerine dik şekilde horizontal olarak çizilerek ekim yapıldı. 37°C'deki 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinde listeria şüpheli bakterilerin ekim çizgisi ile referens suşların ekim çizgilerinin kesiştiği noktalardaki hemolizler değerlendirildi.

Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Biyokimyasal testlerin sonucunda *Listeria* şüpheli suşların, ayrı ayrı şekerleri içeren indikatörlü besiyerlerine ekimleri yapıldı. 37°C'deki 24-48 saatlik inkübasyondan sonra besiyerlerindeki pembe rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

Patojenite testi

İzole ve identifiye edilen listeria suşlarının patojenitesini saptamak için Donnelly ve ark.'nın (32) bildirdikleri gibi 1×10^9 bakteri içeren inokulumlar 2'şer adet beyaz farelere 0.1 ml miktarında periton içine verildi. Üç fare kontrol amacıyla kullanıldı ve bu farelere sadece 0.1 ml FTS periton içine verildi. Fareler, inokulasyondan sonra 5 gün gözlem altında tutuldu.

II- SEROLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN GEREÇ VE YÖNTEM

A- SEROLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN GEREÇLER

Referens suşlar

Almanya Münih Veteriner Fakültesi'nden sağlanan *Listeria monocytogenes* 1/2 a (SLCC 5581) ve *Listeria monocytogenes* 4b (NCTC 10527) suşları antijen hazırlanmasında kullanıldı.

Kontrol serumları

İngiltere Edinburg Veteriner Araştırma Merkezinden sağlanan listeria pozitif ve negatif (SPF) serumlar, ELISA testinde kontrol serumları olarak kullanıldı.

Dializ membran filtreleri

İngiltere Bristol Veteriner Fakültesi'nden sağlanan Dializ membran filtreleri Listeriolysin O'nun elde edilmesinde kullanıldı.

Konjugat

Sigma firmasından sağlanan Donkey anti-sheep IgG horseradish peroxidase conjugates (Sigma A-3415), %0.05 Tween 80 içeren Phosphate Buffer Saline (PBS-T) içinde 1/750 oranında sulandırılarak ELISA testinde kullanıldı.

Substrate

Sigma firmasından sağlanan ortho-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma P-8287), Phosphate-Citrate Buffer içinde 0.4 mg/ml oranında sulandırılarak ELISA testinde kullanıldı.

Mikroplate

96 çukurlu ve "U" tabanlı Titertek ELISA plakaları kullanıldı.

Reaksiyonu durdurma solusyonu

3 N HCl solusyonu kullanıldı.

Okuyucu

ELISA test sonuçları Pasteur M 530 Titertek mikroplate reader 'da 450 nm dalga boyunda okundu.

Yıkama Çözeltisi (Phosphate Buffer Saline, PBS-T)

Konjugat sulandırılması ve ELISA plakalarının yıkanması için kullanıldı.

Çözeltinin hazırlanması:

NaH ₂ PO ₄	0.227 g
Na ₂ HPO ₄	1.444 g
NaCl.....	9 g
Tween 80.....	0.5 ml

1 litre distile suda karıştırılarak eritildi.

Sulandırma Çözeltisi

Serumlar, içerisinde %0.05 Tween 80 bulunan PBS 'ye (PBS-T) %1 oranında süt tozu eklenmiş solusyonun 1/100 oranında sulandırılması ile kullanıldı.

Substrate sulandırılması için Phosphate-Citrate Buffer sistemi kullanıldı.

Cözeltinin hazırlanması:

Solusyon A	Citric acid.....	19.21 g
	Distile su.....	1000 ml
Solusyon B	NaH ₂ PO ₄ .7 H ₂ O....	53.65 g
	Distile su.....	1000 ml

24.3 ml solusyon A ve 25.7 ml solusyon B karıştırılarak pH 5.0 olan sulandırma çözeltisi hazırlandı.

Yapıştırma Çözeltisi (Coating Buffer)

Antijenlerin ELISA plakalarına yapıştırılması için kullanıldı.

Cözeltinin hazırlanması:

Solusyon A	Na ₂ CO ₃	21.2 g
	Distile su.....	1000 ml
Solusyon B	NaHCO ₃	16.8 g
	Distile su.....	1000 ml

16 ml solusyon A ve 34 ml solusyon B karıştırılarak pH 9.6 olan sulandırma çözeltisi hazırlandı.

B- SEROLOJİK ÇALIŞMALAR İÇİN YÖNTEMLER

1- Antijen hazırlanması

a- Somatik O (hücreye bağlı - Whole cell) antijenlerin hazırlanması:

Listeria monocytogenes serotip 1/2 a ve serotip 4b referens suşlarının herbiri 3'er litre Tryptic Soy Broth (Merck 5459) besiyerlerine ekildi. 20°C'de

24 saat inkubasyona bırakıldı ve üreyen kültürden Peel ve ark.'nın (122) bildirdiği yöntemle göre antijen hazırlandı. Kültürler önce 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. PBS ile yıkandı ve yeniden santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Elde edilen çökelti az miktarda PBS ile sulandırıldı ve 5 dakika sonikatörde tutularak bakteriler parçalandı. Canlılık muayenesi için %7 at kanlı agarlara ekim yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkubasyondan sonra bakterilerin ürediği görüldü. Bu kez bakteriler 100°C'de 1 saat Benmari'de tutuldu. Yeniden canlılık muayenesi yapıldı ve hiçbir bakterinin üremediği görüldü. Çökelti PBS ile sulandırıldıktan sonra 5000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Çökelti az miktarda PBS ile sulandırıldı ve Bio-Clinica Total protein test kiti kullanılarak 546 nm dalga boyunda spektrofotometrede ml'deki protein miktarı saptandı.

b- Listeriolysin O antijeninin hazırlanması:

Listeriolysin O toksininin kolesterol presipitasyonu Vazquez-Boland ve ark.'nın (160) bildirdikleri yöntemle göre hazırlandı.

İçerisinde dializ membran filtreleri bulunan 1 litre Tryptic Soy Broth (Merck 5459) 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. *L. monocytogenes* 1/2a ve 4b referans suşları %7 at kanlı agarda 37°C'de 1 gece inkübe edildi ve üreyen bakteriler PBS ile toplandı. 20 dakika 2000 g'de santrifüj edildi ve çökelti PBS içinde tekrar sulandırıldı. İkinci kez 2000 g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra çökelti 50 ml PBS ile sulandırıldı. Aseptik teknik kullanılarak 50 ml olan süspansiyon Tryptic Soy Broth içerisindeki dializ membran filtrelerinin içine inoküle edildi. Shaker kullanılarak 37°C'de 1 gece inkubasyondan sonra filtreler içerisindeki süspansiyon 20 dakika 2000 g'de santrifüj edildi. Üst sıvı alındı ve 0.22 µm'lik milipor filtreler ile süzüldü. Süzüntü ölçüldü ve üzerine eşit miktarda 20 µmol L-cysteine (Merck 2838) ilave edildi. Her 40 ml için 2 ml kolesterol eklenerek 37°C'de 30 dakika karıştırılarak inkübe edildi. Elde edilen karışım 25.000 g'de 30 dakika süre ile 4°C'de santrifüj edildi. Çökelti, PBS ile sulandırıldı ve 25.000 g'de ikinci kez santrifüj edildi. Kolesterol ile bağlanmış listeriolysin O antijeni Ciba-Corning express plus otoanalizator ile proteini hesaplandı ve yapıştırma çözeltisi ile sulandırılarak -20°C'de saklandı.

2- ELISA testi uygulaması

1000 adet koyun kan serumlarının her biri, hazırlanan somatik 1/2 a, somatik 4b ve Listeriolysin O antijenleri kullanılarak test edildi. ELISA testi Low ve ark. (97)'nin yöntemine göre yapıldı.

Somatik antijenler 80 $\mu\text{g/ml}$ oranında, Listeriolysin O antijenleri 1/20 oranında yapıştırma çözeltileri ile (coating buffer) sulandırıldı.

Antijenler 100 μl miktarında ELISA plakalarının her çukuruna konuldu, LLO antijeni konulan plakalar 4°C'de, somatik antijenler konulan plakalar 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra %0.05 Tween 80 içeren PBS (PBS-T) ile 5 kez yıkandı.

Her çukura içerisinde %4 süt tozu içeren 100 μl PBS-T ilave edilerek 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra PBS-T ile 5 kez yıkandı.

Plakaların her çukuruna %1 süt tozu içeren PBS-T de 1/100 oranında dilüe edilmiş 100 μl serum örnekleri konuldu ve 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra PBS-T ile 5 kez yıkandı.

Her çukura PBS-T 'de 1/750 oranında sulandırılmış 100 μl donkey anti-sheep horseradish peroxidase conjugate (Sigma A-3415) konuldu ve 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra PBS-T ile 5 kez yıkandı.

Her çukura 0.4 mg/ml oranında Phosphate-Citrate Buffer'da sulandırılmış 100 μl ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma P-8287) konularak 15 dakika beklenildi ve reaksiyonu durdurmak için 50 μl 3N HCl ilave edildi. 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda okundu ve % OD değerleri saptandı.

Sonuçların istatistik analizleri Kutsal ve ark.'nın (85) bildirdiği X^2 testi ile yapıldı.

BULGULAR

A- BAKTERİYOLOJİK ÇALIŞMA BULGULARI

Süt örneklerinden

100 koyun süt örneğinin *Listeria* Enrichment Broth besiyerlerindeki 1 ve 7 gün inkübasyonundan sonra PALCAM agar ve LSA (oxford formu) selektif besiyerlerindeki 48 saatlik kültürlerinde, besiyerlerini siyahlaştıran, gri-beyaz, katalaz olumlu, oksidaz olumsuz ve Gram pozitif çomak bulunan kolonilerden saf kültür elde edildi. Saf kolonilerden biyokimyasal testler yapıldı ve bu testlerin sonucunda *Listeria* cinsi bakteri izole edilmedi.

Dışkı örneklerinden

Soğuk zenginleştirme yöntemi ile 60 gün 4°C'de inkübe edilen 180 koyun dışkı örneği, inkübasyonun 15., 30. ve 60. günlerinde LSA (Merck) ve LSA (Oxford formu) agarlarına ekildi ve 48 saatlik inkübasyondan sonra üreyen katalaz olumlu, oksidaz olumsuz ve Gram pozitif çomak bulunan kolonilerden saf kültürler elde edildi. Saf kültürlerden yapılan biyokimyasal ve karbonhidrat fermentasyon testleri sonunda 79 ve 80 nolu örneklerden *Listeria monocytogenes*, 82 ve 457 nolu örneklerden *Listeria innocua*, 436 ve 496 nolu örneklerden *Listeria welshimeri*, 97 nolu örnekten *Listeria murrayi* ve 119 nolu örnekten *Listeria grayi* tanımlendi.

İdentifiye edilen *Listeria* türlerinin yapılan biyokimyasal ve karbonhidrat fermentasyon testlerinin sonuçları tablo 5'te gösterilmiştir.

Saf kültürlerden yapılan Gram boyamalarında; Gram pozitif, yeni kültürlerinde kısa çomak ya da kokoid tarzda, eski kültürlerinde daha uzun çomak şekilli bakteriler görüldü (resim 1).

İdentifiye edilen *L.monocytogenes* 60 gün inkübasyondan sonra her iki agardan da izole edildi. İdentifiye edilen diğer *Listeria* türlerinin izole edildikleri inkübasyon süreleri ve izole edildikleri selektif agarlar tablo 6'da gösterilmiştir.

Resim 1: 79 nolu örnekten izole edilen *L.monocytogenes*'in Gram boyamadaki görünümü.



Tablo 6: Dışkıdan izole edilen listeria türlerinin izole edildikleri besiyerleri ve zenginleştirme süreleri.

Örnek no	LSA (Merck)			LSA (oxford formu)			izole edilen türler
	15.gün	30.gün	60.gün	15.gün	30.gün	60.gün	
79			+			+	<i>L. monocytogenes</i>
80			+			+	<i>L. monocytogenes</i>
82		+			+		<i>L. innocua</i>
97					+		<i>L. murrayi</i>
119	+			+			<i>L. grayi</i>
436				+			<i>L. welshimeri</i>
457	+			+			<i>L. innocua</i>
496	+			+			<i>L. welshimeri</i>

Biyokimyasal Özelliklerin Saptanması

Hareket muayenesi

Listeria şüpheli bakterilerin 22°C'deki 24 saatlik nutrient broth besiyerlerindeki kültürlerinden lam-lamel arası yöntem ile hareket özellikleri incelendiğinde, objektif alanının bir bölgesinden diğer bölgesine aktif hareket ettikleri gözlemlendi.

SIM Medium'da üreme

SIM Medium'a ekilen listeria şüpheli bakterilerin 22°C'deki 24 saatlik inkübasyonundan sonra, besiyerinin yüzeyinde şemsiye tarzında üremelerin olduğu gözlemlendi.

Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Şüpheli kolonilerin TSIA'da 37°C'deki 24 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerinin yüzeyi ve dip kısmının sarı renkte olduğu (asit / asit) , gaz ve H₂S'in oluşmadığı saptandı.

Nitrat testi

Şüpheli kolonilerin Nitrat besiyerinde 37°C'deki 24 saatlik inkübasyonundan sonra besiyeri ayıraçları eklendi. Besiyerinin üst kısmında kırmızı rengin oluşmadığı gözlemlendi ve nitratın nitrite indirgenmediği saptandı.

Üre testi

Şüpheli kolonilerin üre besiyerinde 37°C'deki 48 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerinin pembe renge dönüşmediği gözlemlendi ve üreaz aktivitesi yönünden negatif olarak saptandı.

Sitrat kullanımı

Şüpheli kolonilerin sitrat besiyerinde 37°C'deki 48 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerinin mavi renge dönüşmediği gözlemlendi ve karbon kaynağı olarak sitratın kullanılmadığı saptandı.

İndol testi

Şüpheli kolonilerin nutrient broth besiyerindeki 37°C'deki 24 saatlik kültürleri üzerine kovacs ayırıcı eklenmesiyle oluşan kırmızı rengin tüpün çalkalanılmasıyla kaybolduğu gözlemlendi ve test negatif olarak değerlendirildi.

MR-VP testi

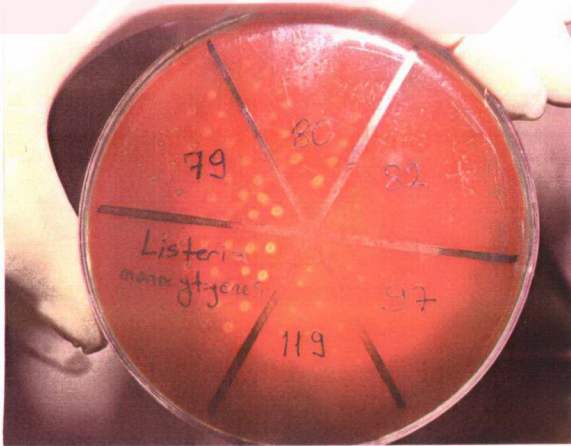
Şüpheli kolonilerin MR-VP besiyerindeki 37°C'deki 24 saatlik kültürleri üzerine test ayırıcılarının eklenmesiyle kırmızı rengin oluştuğu gözlemlendi ve test pozitif olarak değerlendirildi.

Hemoliz testleri

a- Nokta hemolizi

İzolatların kanlı agara iğne öze ile nokta inokulasyonu sonucu hemoliz özelliği gösteren suşların diğer suşlardan hemoliz özelliğine göre ayrımı gözlemlendi. Referans suş ile izole edilen 79 ve 80 nolu izolatların hemolizleri arasında benzerlikleri saptandı. Diğer izolatların hemoliz özelliği göstermediği gözlemlendi (resim 2).

Resim 2: İzole edilen *Listeria* suşları ile yapılan nokta hemoliz deneyi.

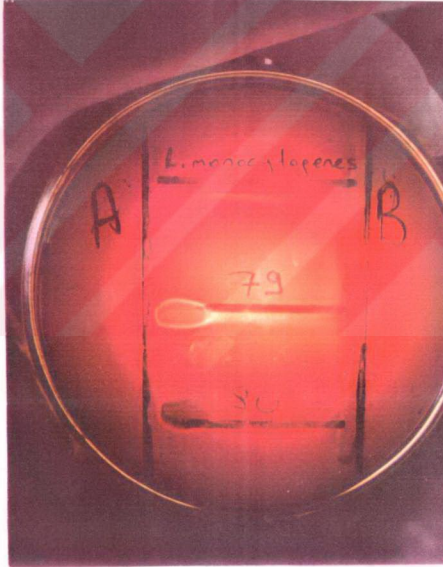


b- CAMP testi

Staphylococcus aureus ve *Rhodococcus equi* suşları ile *L.monocytogenes* referens suşu ve izolatların kanlı agar besiyerlerine vertikal ve horizontal ekimlerinden sonra ekim çizgilerinin kesiştiği bölgelerdeki hemoliz alanları gözlemlendi. İzole edilen 79 ve 80 nolu izolatların *S. aureus* ekim çizgisi ile kesiştiği bölgede hemoliz alanları saptandı. Diğer izolatların ekim çizgileri ile *S. aureus* ve *R. equi* ekim çizgilerinin arasında hiçbir hemoliz alanı saptanmadı (resim 3).

Resim 3: İzole edilen *Listeria* suşları ile yapılan CAMP testi.

A- *S. aureus*



B- *R. equi*

Eskülin hidrolizasyon testi bulguları

Şüpheli kolonilerin Eskülin agarda 37°C'deki 24 saatlik inkübasyonundan sonra besiyerinin siyaha dönüştüğü gözlemlendi ve eskülinin hidrolize olduğu saptandı.

Henry iluminasyon tekniği

TSA-YE besiyerlerindeki listeria şüpheli koloniler, alttan 45 derece açı ile gelen bir ışık yardımıyla mikroskopta incelendiğinde kolonilerin mavi-yeşil renk oluşturduğu saptandı.

Karbonhidrat fermentasyon testleri

Biyokimyasal testlerin sonunda listeria suşlarının identifikasyonu amacıyla gerekli şekerleri içeren indikatörlü besiyerlerine ekimleri yapıldı. Şekerleri fermente ederek asit oluşturanlar besiyerini pembe renge dönüştürdü, asit oluşturmayanlarda ise renk değişimi gözlenmedi.

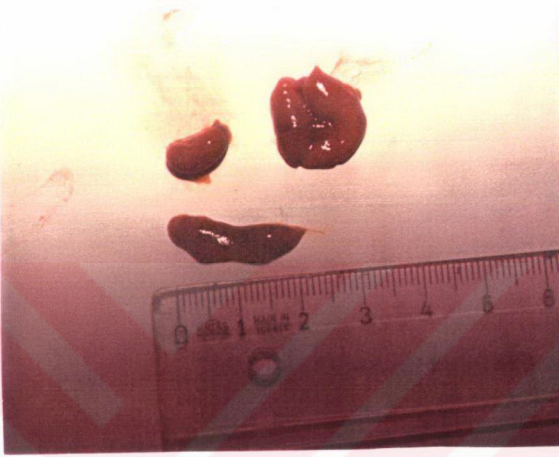
Patojenite testi

İzole ve identifiye edilen listeria suşlarının patojenitesini saptamak için 1.10^9 bakteri içeren inokulumlar 2'şer adet beyaz farelere 0.1 ml miktarda periton içine verildi. 79 nolu örnekten izole edilen *L.monocytogenes* suşları ile infekte edilen fareler 3. gün, 80 nolu örnekten izole edilen *L.monocytogenes* suşları ile infekte edilen fareler 5. günde öldü. Diğer listeria türlerinin inokule edildiği fareler ile kontrol fareleri 5 gün sonunda ölmedi. Ölen farelerin yapılan otopsilerinde dalağının büyüdüğü, karaciğerinin koyu renk aldığı ve üzerinde küçük nekrotik odakların bulunduğu saptandı (resim 4 ve 5).

Resim 4: 79 nolu örnekten izole edilen *L.monocytogenes* ile infekte edilen farenin iç organları.



Resim 5: 79 nolu örnekten izole edilen *L.monocytogenes* ile infekte edilen farenin dalağında büyüme.



B- SEROLOJİK ÇALIŞMA BULGULARI

1- Antijen hazırlama bulguları

a) Somatik O antijenleri

Listeria monocytogenes serotip 1/2 a ve serotip 4b referens suşlarından hazırlanan antijenlerin spektrofotometrede mililitredeki protein miktarı saptandı. Serotip 1/2 a suşundan elde edilen antijen 101.142 $\mu\text{g/ml}$, serotip 4b suşundan elde edilen antijen ise 19.428 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptandı.

b- Listeriolysin O antijeni

Listeriolysin O antijeni spektrofotometrede 0.1 mg/dl olarak saptandı ve yapıştırma çözeltisi ile 1/20 oranında sulandırılarak kullanıldı.

2- ELISA testi bulguları

1000 adet koyun kan serumunun herbiri, hazırlanan somatik 1/2 a, somatik 4b ve listeriolysin O antijenleri kullanılarak test edildi. Test sonucunda

eşik değerleri (%OD) hesaplanarak, Low ve Donachie'nin (97) deneysel çalışmalarında bildirilen %OD değerlerine göre negatif, şüpheli ve pozitif olarak değerlendirildi. Eşik değerleri (%OD) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\%OD = [(\text{örnek değeri} - \text{blank}) / (\text{standart değeri} - \text{blank})] \times 100$$

Bu formüle; standart değer pozitif kontrol serumun değeri, blank değeri ise serum eklenmemiş boşluğun değeridir.

Bu hesaplamaların sonunda %OD değeri 0-40 arasında olan örnek serumlar negatif, 40-70 arasında olanlar şüpheli, 70-100 arasında olanlar seropozitif olarak değerlendirildi. Yapılan hesaplamaların sonunda toplanan 1000 adet koyun kan serumu; Listeriolysin O antijenine göre 819 negatif, 145 şüpheli ve 36 pozitif; somatik 1/2 a antijenine göre 393 negatif, 492 şüpheli ve 115 pozitif; somatik 4b antijenine göre 442 negatif, 454 şüpheli ve 104 pozitif olarak değerlendirildi. Koyun kan serumlarındaki antikor düzeylerinin yapılan ELISA testi sonunda %OD değerleri hesaplandı ve seropozitiflik miktarları tablo 8'de belirtildi.

Çalışmada, somatik 1/2 a, somatik 4b ve listeriolyisin O antijenleri ile yapılan ELISA test sonuçlarının negatif, şüpheli ve pozitif değerleri arasındaki istatistik analizleri X² testi kullanılarak hesaplandı. Yapılan istatistik analizinde bütün değerlerde P<0.001 olarak saptandı (tablo 7).

Tablo 7: X² testi ile yapılan istatistik analiz sonuçları

	Listeriolyisin O	Somatik 1/2 a	Somatik 4b	X
Negatif	%81.9	%39.3	%44.2	196.2***
Şüpheli	%14.5	%49.2	%45.4	198.2***
Pozitif	%3.6	%11.5	%10.4	43.9***
X	130.9***	45.0***	22.3***	437.3***

***P<0.001

Tablo 8: Toplanan koyun kan serumlarında yapılan ELISA testindeki %OD değerleri.

örnek no	kan serumu	Listeriolysin O			Somatik 1/2 a			Somatik 4b		
		Negatif	Şüpheli	Pozitif	Negatif	Şüpheli	Pozitif	Negatif	Şüpheli	Pozitif
1-80	80 adet	54	23	3	15	50	15	17	45	18
81-98	18 adet	10	7	1	8	10	-	10	3	5
99-413	315 adet	248	56	11	41	244	30	125	171	19
414-430	17 adet	11	5	1	1	4	12	2	11	4
431-455	25 adet	19	5	1	-	10	15	3	20	2
456-475	20 adet	11	9	-	1	8	11	1	10	9
476-492	17 adet	2	7	8	-	7	10	-	-	17
493-499	7 adet	3	3	1	-	5	2	-	5	2
500-503	4 adet	-	2	2	-	2	2	-	-	4
504-550	47 adet	47	-	-	24	23	-	23	24	-
551-586	36 adet	34	2	-	28	6	2	26	9	1
587-615	29 adet	29	-	-	27	2	-	27	2	-
616-637	22 adet	22	-	-	20	2	-	20	2	-
638-651	14 adet	14	-	-	12	2	-	10	4	-
652-667	16 adet	16	-	-	12	3	1	12	3	1
668-726	59 adet	55	2	2	39	19	1	38	17	4
727-752	26 adet	26	-	-	20	5	1	19	7	-
753-768	16 adet	16	-	-	11	5	-	13	3	-
769-793	25 adet	25	-	-	19	6	-	20	5	-
794-814	21 adet	20	1	-	17	4	-	19	2	-
815-841	27 adet	27	-	-	22	5	-	20	7	-
842-993	152 adet	128	21	3	76	65	11	37	98	17
994 - 1000	7 adet	2	2	3	-	5	2	-	6	1
	1000 adet	819	145	36	393	492	115	442	454	104
		% 81.9	% 14.5	% 3.6	% 39.3	% 49.2	% 11.5	% 44.2	% 45.4	% 10.4

Bakteriyolojik yöntemle dışkılarından listeria cinsi bakteri izole ve identifiye edilen koyunların kan serumlarındaki antikor düzeyleri değerlendirildi. *L.monocytogenes* izole edilen 79 nolu örnekte sadece somatik 4b antijenine göre pozitiflik saptanırken, 80 nolu örnekte hiçbir antijene göre pozitiflik saptanmadı. 436 ve 457 nolu örnekler listeriolyisin O antijenine göre şüpheli olarak değerlendirilirken, somatik 1/2a ve 4b antijenlerine göre pozitif olarak saptandı. 82 ve 97 nolu örnekler listeriolyisin O ve somatik 1/2a antijenlerine göre şüpheli, somatik 4b antijenine göre pozitif olarak değerlendirilirken, 119 nolu örnek bütün antijenlere göre negatif olarak değerlendirildi. 496 nolu örnek ise listeriolyisin O antijenine göre negatif, somatik 1/2a ve 4b antijenlerine göre şüpheli olarak saptandı (tablo 9).

Tablo 9: Dışkılarında listeria türleri izole edilen koyunların kan serumlarındaki %OD değerleri

Örnek no	Listeriolyisin O	Somatik 1/2a	Somatik 4b	İzole edilen türler
79	61	69	78	<i>L. monocytogenes</i>
80	40	52	64	<i>L. monocytogenes</i>
82	45	61	83	<i>L. innocua</i>
97	42	59	72	<i>L. murrayi</i>
119	12	24	26	<i>L. grayi</i>
436	63	92	73	<i>L. welshimeri</i>
457	57	100	84	<i>L. innocua</i>
496	25	62	58	<i>L. welshimeri</i>

(%OD değerleri; 0 - 40: negatif, 40 - 70: şüpheli, 70 - 100: pozitif)

Serolojik çalışmalar sonunda seropozitif olarak değerlendirilen örneklerin antijenler arasındaki dağılımları incelendiğinde, sadece listeriolyisin O antijeni ile 7 örnek pozitif olarak saptandı. Üç antijen ile ortak olarak pozitif saptanan örnek sayısı 9, listeriolyisin O ve somatik 1/2 a antijenleri ile 6 örnek pozitif olarak saptandı. Diğer pozitif değerlerin antijenler arasındaki dağılımı tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: Pozitif olarak saptanan kan serumlarının antijenlere göre dağılımı.

Antijen türü	Seropozitif	Antijen türü	Seropozitif
Listeriolsin O	7	Listeriolsin O	6
Somatik 1/2 a	49	Somatik 1/2 a	
Somatik 4b	31	Listeriolsin O	14
Listeriolsin O	9	Somatik 4b	
Somatik 1/2 a		Somatik 1/2 a	51
Somatik 4b		Somatik 4b	

TARTIŞMA VE SONUÇ

Listeriozisin insanlarda ve hayvanlarda sporadik ve endemik infeksiyonlara neden olmasının yanısıra, gıdalarda da önemli oranda patojenik listeria etkenlerinin saptanması bilim adamlarının bu konuda yoğun araştırma yapmalarına neden olmuştur.

Araştırmacılar insanlarda görülen listeriozisin son yıllara doğru giderek arttığını ve bu infeksiyonların kaynağının kontamine olmuş gıda maddeleri ya da infekte hayvanların ürünleri olduğunu bildirmişlerdir (38,51,105). Genigeorgis ve ark. (52), hijyenik olmayan kesimhane ve işletmelerin listeriozis yönünden önemini vurgulamışlardır. Araştırmacılar dünyanın birçok ülkesinde et, süt ve bunların ürünlerinde yaptıkları araştırmalarda yüksek oranlarda *L.monocytogenes* saptamışlardır (41,52,149). Ülkemizde de birçok araştırmacı gıda örneklerinde yüksek oranda *L.monocytogenes* bulunduğunu yaptıkları araştırmalarda rapor etmişlerdir (22,64,120,155).

Skovgaard ve ark. (150), doğada bulunan listeria'ların önemli kaynaklarından birisinin de dışkıları ile çevreyi kontamine eden portör hayvanlar olduğunu bildirmişlerdir. Birçok araştırmacı evcil hayvanlar arasında en fazla koyunlarda listeriozis görüldüğünü bildirmektedir (9,24,167). Wilesmith (167), 1975-84 yılları arasında İngiltere'de toplam 1880 listeriozis olgusu görüldüğünü ve bu olguların 1179'unun koyunlarda, 601'inin sığırlarda zaman zaman da keçi, domuz, tavşan, tavuk, at, köpek ve kuşlarda rastlanıldığını bildirmiştir. Davies ve ark.'da (24), Kanada'daki koyunlarda görülen listeriozis olgularının, sığır ve diğer hayvanlara göre daha fazla sayıda olduğunu doğrulamışlardır.

İnfeksiyonun zoonotik özelliğinin yanısıra, hayvanlarda ensefalitis, sepsisemi, abortus ve ölüme seyretmesinin önemli ekonomik kayıplara neden olduğu birçok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Vazquez-Boland ve ark. (159), 450 koyun bulunan bir çiftlikte *L.monocytogenes* ile infekte silajın yedirilmesiyle ortaya çıkan listeriozis infeksiyonu sonucu 53 koyunun öldüğünü bildirmişlerdir. Low ve ark. (98), 196 gebe koyunun bulunduğu çiftlikteki listeriozis olgusunda koyunlarda ishal ve topallık başladığını, antibiyotik uygulamasına karşın 19 koyunun öldüğünü ve 60 koyunda vaginal

akıntı, 6 koyunda sinirsel belirtiler, 5 koyunda abortus, 1 koyunda da ensefalitis tablosu görüldüğünü saptamışlardır. Bocklisch ve ark. (14), Almanya'nın iki bölgesindeki sığırlarda görülen listerial abortların Erfurt bölgesinde 9931 abort olgusunun % 1.2'sini, Cottbus bölgesinde 5643 abort olgusunun %1.8'sini oluşturduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın Türkiye'deki ilk listeriozis olgusunun 1945 yılında koyunlarda görüldüğü Doğuer (28) tarafından bildirilmiştir. Sonraki yıllarda araştırmacılar koyunlarda sporadik listeriozis olgularını rapor etmişlerdir (72). Ülkemizde koyunlardaki listeriozisin epidemiyolojisi üzerine tek araştırma 1968 yılında Finci (47) tarafından yapılmıştır. Çalışmada araştırmacılar tarafından son yıllarda arttığı bildirilen listeriozis olguları düşünülerek, ülkemizdeki klinik belirti göstermeyen koyunların taşıyıcılık durumu ve varsa etkenin süt ve dışkıları ile atılmasının saptanması amaçlanmıştır.

Listeriaların bakteriyolojik olarak gıdalardan ve klinik materyallerden izolasyonundaki güçlükler, araştırmacıları yeni izolasyon yöntemleri geliştirme çalışmalarına yöneltmiştir. 1987 yılında LOVETT tarafından geliştirilen, Uluslararası Gıda ve Sağlık Örgütleri (FDA, IDF, USDA/FSIS) tarafından da önerilen sıcak zenginleştirme yöntemi, inkübasyon süresinin kısalığı nedeniyle son yıllarda birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (67,93,127,140,151).

Bu araştırmada da dışkı örneklerinde soğuk zenginleştirme yöntemi ve süt örneklerinde sıcak zenginleştirme yöntemi kullanılmıştır. Sıcak zenginleştirme yönteminde incelenecek örneğin 25 gr ya da ml olması gerektiğinden ve koyunların rektumundan bu miktarda dışkı alınamadığından soğuk zenginleştirme yöntemi tercih edilmiştir. Gronstol (59) de yaptığı araştırmada, 3 yıl süresince klinik belirti göstermeyen koyunların dışkılarında soğuk zenginleştirme yöntemini kullanmış ve silajla beslenen koyunların % 64'ünün dışkısından *L.monocytogenes* izole ettiğini rapor etmiştir. Benzer bir araştırmayı Rodriguez ve ark. (134) yapmışlar ve 1 yıl süresince koyunların rektumlarından alınan dışkılarda izole ettikleri 275 listeria suşunun 68'inin *L.monocytogenes*, 188'inin *L.grayi*, 16'sının *L.murrayi* ve 3'ünün *L.denitrificans* olduğunu saptamışlardır. Yapılan literatür incelemelerinde Türkiye'de epidemiyolojik olarak koyunların dışkılarında listeria etkenlerinin izolasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada incelenen 180 koyunun dışkı örneklerinde 2 *L.monocytogenes*, 2 *L.innocua*, 2 *L.welshimeri*, 1 *L.grayi* ve 1 *L.murrayi* izole ve identifiye edilmiştir. Avrupa ülkelerindeki yapılan çalışmalarda, koyunların dışkılarından izole edilen *Listeria* izolat sayılarının bizim bulgularımızdaki izolat sayılarına göre fazla sayıda olduğu belirlenmiştir.

Araştırmacılar silajla beslenen koyunlardan daha çok *L.monocytogenes* izole edildiğini vurgulamışlar ve infeksiyonların özellikle Şubat ve Mart aylarında ortaya çıktığını, bunun nedeninin de silajın kış aylarında hayvanlara yedirilmesi olduğunu rapor etmişlerdir (56,59,167). Buna karşın ülkemizde koyun yetiştiriciliğinde silaj ile beslemenin henüz uygulanmadığı görülmektedir.

Miettinen ve ark. (111), keçilerde yaptıkları deneysel çalışmada, *L.monocytogenes* inokulasyonundan sonra 3 ile 15 gün arasında dışkılarıyla, ilk 2 gün içinde de sütleriyle etkeni saçtıklarını bildirmişlerdir. Miettinen ve ark. (110), yaptıkları başka bir deneysel çalışmada *L.monocytogenes*'in 7 ay ara ile iki kez oral yolla verildiğinde birinci inokulasyondan sonra ilk 15 gün, ikinci inokulasyondan sonra ilk 3 gün etkenin dışkılarıyla saçıldıklarını saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca bu çalışmada etkenin sütte izole edilemediğini bildirmişlerdir. Fedio ve ark.'da (42), aseptik koşullarda alınan 262 ineğin süt örneklerinden 1, 69 ineğin dışkısından da 10 *L.monocytogenes* izole etiklerini rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmada toplanan 100 koyunun sütünden, FDA yöntemi ile yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda listerial bir etken izole edilmemiştir.

Birçok araştırmacılar süt ve süt ürünlerinden *Listeria* izolasyonu için FDA yöntemini önermişler ve sıcak zenginleştirme yöntemiyle listeriaların izolasyonu için farklı besiyerlerini kullanmışlardır (67,127,140,151). Lee ve McClain (90), et ve ürünlerinden *Listeria* izolasyonu için LPM agarı önermişler, Van Netten ve ark. (156), gıdalardan *Listeria* izolasyonu için PALCAM agarın daha selektif olduğunu ileri sürmüşlerdir. Lovett (94), süt ve ürünlerinden *Listeria* izolasyonu için McBride agarı bildirmiş, ancak Art ve ark. (5), et, süt ve ürünlerinden *Listeria* izolasyonu için LSA (Oxford formu)

ve PALCAM agarın daha selektif olduğunu saptamışlardır. Curtis ve ark.'da (21). klinik örneklerinde listeria izolasyonu için LSA (Oxford formu) besiyerini McBride agardan daha seçici olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmada dışkı örneklerinden listeria türlerinin izolasyonu için farklı içeriklere sahip iki selektif besiyeri, LSA (Oxford formu) ve LSA (Merck) karşılaştırmalı olarak kullanılmış ve listeria suşlarının 8'i LSA (Oxford formu) besiyerinden, 6'sı LSA (Merck) besiyerinden izole edilmiştir. İzolasyon bulgularının, LSA (Oxford formu) besiyerinin daha selektif olduğunu bildiren araştırmacıların görüşleri ile uyum sağladığı görülmüştür.

Çalışmadaki izole edilen suşların biyokimyasal ve karbonhidrat fermentasyon test sonuçları, "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" nin 1986 baskısında bildirilen test sonuçlarına uymaktadır (tablo 1 ve 5). Listeria cinsindeki hemoliz yapan türlerin identifikasyonu için araştırmacılar tarafından bildirilen CAMP testi, izole edilen suşlara uygulanmış, 79 ve 80 nolu örneklerden izole edilen *L.monocytogenes* suşlarının ekim çizgisi ile *S. aureus*'un ekim çizgisinin kesiştiği bölgelerde hemoliz alanları oluştuğu saptanmıştır (resim 3).

Listeria cinsi içerisindeki türlerden *L.monocytogenes*'in insan ve hayvanlarda listeriozisin etkeni olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Önceleri *L.monocytogenes* serotip 5 olarak bilinen *L.ivanovii*'nin koyunlarda abortus oluşturduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (88,100,144). Walker ve ark. (162). apatojen olarak bilinen *L.innocua*'nın koyunlarda meningoensefalitis oluşturan suşlarının olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada izole edilen suşlar, patojenite testi için farelere verilmiş, *L.monocytogenes* suşlarının verildiği farelerin öldüğü, ancak *L.innocua*'nın ve diğer izole edilen suşların verildiği farelerin ölmedikleri saptanmıştır. Ölen farelerin karaciğer ve dalaklarından zenginleştirme besiyerleri kullanılmadan kanlı agarda *L.monocytogenes* yeniden izole edilmiştir.

Araştırmacılar listeria cinsindeki türlerin birbirleri ile ilişkili ancak çok kompleks bir antijenik yapılarının olduğunu ve somatik O antijenlerindeki faktör III ile flagella H antijenlerindeki faktör B'nin 15 serotipde de ortak olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmalar ayrıca listeriaların farklı

bazı bakterilerle ortak antijenik özelliklerinin bulunduğunu ve Staphylococcus, Enterococcus, Corynebacterium cinsindeki bazı bakteriler ve E. coli ile aralarında serolojik olarak kros-reaksiyonların olabileceğini bildirmişlerdir (121,143,144).

Birçok araştırmacı listeriozisin tanısı için serolojik testlerde somatik O ve flagella H antijenlerini kullanmışlardır (26,47,69,97,111,153). Bocklisch ve ark. (14), listeriozisin tanısında serolojik yöntemlerin kros-reaksiyonlar nedeniyle yeterli olmadığını vurgulamışlardır. Peel ve ark. (122), flagella H antijeninin listeriozisin serolojik ve epidemiyolojik çalışmaları için yeterli bir antijen olmadığını ve in vivo koşullarda kesin sonuç vermediğini rapor etmişlerdir. Low ve ark.'da (97), yaptıkları deneysel çalışmada flagella H antijenine karşı yeterli immun yanıt oluşmadığını, dolayısıyla serolojik tanı için flagellar antijenin uygun olmadığını vurgulamışlardır.

Yapılan çalışmada, araştırmacılar tarafından önerilmediğinden koyun kan serumlarında L.monocytogenes'e karşı oluşmuş antikorları saptamak için flagella H antijeni yerine somatik O antijenleri kullanılmıştır.

Araştırmacılar, bugüne kadar insan ve hayvanlardaki listeriozis olgularından izole edilen L.monocytogenes suşlarının % 95'inin 1/2 ve 4b serotipleri olduğunu bildirmişlerdir (51,75,99,105,106). Bu nedenle çalışmada kullanılan antijenler L.monocytogenes'in 1/2a ve 4b serotiplerinden hazırlanmıştır.

Listeria türlerinin antijenik yakınlıkları ve farklı bazı bakterilerle listerialar arasında serolojik testlerde kros-reaksiyon olması listeriozisin serolojik tanısını güçleştirmekte ve güvenilirliğini azaltmaktadır. Araştırmacılar patojen L.monocytogenes suşları tarafından oluşturulan Listeriolysin O (LLO) toksininin, serolojik testlerde aday antijen olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (50,53,57,86,115,121). Low ve ark. (96), LLO'ya karşı oluşan antikorların, yapılan serolojik testlerde deneysel infeksiyonların en güvenilir belirtisi olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca bu çalışmada immun deneylerde LLO'nun kullanılmasının farklı serotip antijenlerinin kullanılması gereğini ortadan kaldırdığını vurgulamışlardır. Berche ve ark.'da (11), epidemiyolojik araştırmalarda ve listeriozisin serolojik tanısında LLO'ya karşı

oluşmuş antikorların saptanmasının somatik O ve flagellar H antijenlerine karşı oluşmuş antikorlara göre daha spesifik olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmada dializ membran filtreleri kullanılarak elde edilen listeriolsin O ve iki serotipin somatik O antijenleri karşılaştırılmıştır. Yapılan literatür incelemelerinde, listeriozisin serolojik tanısı için serum aglütinasyon testi ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarda araştırmacıların pozitif ve negatif sınır değerlerini bildirmelerine karşın, ELISA testi ile epidemiyolojik yönden bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Çalışmadaki ELISA test sonuçları, pozitif ve negatif kontrol serumların sağlandığı Low ve ark. (97), yaptıkları deneysel çalışmalarının sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Buna göre toplanan 1000 koyun serumunun 36'sı listeriolsin O'ya göre pozitif iken, somatik 1/2 a'ya göre 115, somatik 4b'ye göre 104 serum pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca şüpheli serum oranlarının listeriolsin O'da %14.5, somatik 1/2a'da %49.5, somatik 4b'de %45.5 olması, listeriolsin O antijeninin somatik antijenlere göre daha spesifik olduğunu belirlemiş ve bu sonuçların da araştırmacıların bulgularına uyduğu saptanmıştır. Ayrıca ELISA test sonuçlarının X^2 ile istatistik analizinde $P<0.001$ olarak saptanmıştır.

Çalışmada dışkılardan listeria türleri izole edilen koyunların kan serumlarında yapılan ELISA testinde, *L.monocytogenes* izole edilen 79 nolu örnek, somatik 4b antijenine göre pozitif, somatik 1/2 a ve listeriolsin O antijenlerine göre şüpheli olarak saptanmıştır. Ayrıca dışkılardan *L.monocytogenes*, *L.innocua* ve *L.welshimeri* izole edilen 80, 82 ve 496 nolu koyunların serumlarının ELISA testi sonunda *L.monocytogenes*'in iki serotip antijenine karşı şüpheli olarak saptanmasının, listeria türlerinin farklı serotipleri arasında kros-reaksiyonlar olabileceğini vurgulayan araştırmacıların görüşlerini doğrulamaktadır.

Araştırmacılar, listeriozisin bakteriyolojik yöntemlerle uzun sürede tanısının konulması sonucunda sağaltıma geç başlanması ile özellikle insanlar yönünden önemli sorunların ortaya çıkabileceğini vurgulamaktadırlar. Marth (101), listeriozisin tanısının kısa sürede konulmasının hamile kadınlar ve fütuslar açısından önemini vurgulamıştır.

Sonuç olarak, geniş bir yaşam ısısına sahip patojen listeria türlerinin taşıyıcı konumdaki hayvanlarla doğaya yayılmaları, insan ve hayvanların sağlığı açısından oldukça önemlidir. Listeriozisin koyunlarda abortus ve ensefalitis oluşturarak büyük ekonomik kayıplara da neden olabileceği düşünülürse, infeksiyonun tanısının kısa sürede ve doğru olarak konulmasının önemi artmaktadır. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, listeriozisin serolojik tanısında Listeriolysin O antijenlerinin somatik antijenlere göre daha spesifik olduğunu belirten araştırmacıların görüşlerine uymaktadır. Marmara Bölgesinde yapılan bu çalışmada, koyunların listeriozis taşıyıcılığının oldukça yüksek düzeyde olmasının, infeksiyonun eradikasyonu yönünde ciddi önlemlerin alınması gereğini ortaya çıkartmaktadır. Bu konuda insanlarda da listeriozis taramalarının yapılması epidemiyolojik açıdan yararlı olacaktır.

ÖZET

Çalışmada Marmara Bölgesindeki sağlıklı koyunların kan serumlarında Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi ile *Listeria monocytogenes*' e karşı oluşmuş spesifik antikorlar araştırıldı. Antijen olarak dializ membran filtreleri ile elde edilen Listeriolysin O ve *L.monocytogenes* serotip 1/2 a ve serotip 4b'nin somatik O antijenleri kullanıldı.

Toplanan 1000 koyun kan serumu 3 farklı antijene göre test edildi ve sonuçlar karşılaştırıldı. ELISA test sonuçlarında, kan serumlarında Listeriolysin O antijenine göre %3.6, somatik 1/2 a antijenine göre %11.5 ve somatik 4b antijenine göre %10.4 oranında pozitiflik saptandı.

Ayrıca bu çalışmada laktasyon dönemindeki koyunların süt ve dışkılarından izolasyon ve identifikasyon çalışmaları yapıldı. FDA yöntemi ile süt örneklerinden yapılan izolasyon çalışmalarında PALCAM Agar ve *Listeria* Selektif Agar (Oxford formu) kullanıldı. Soğuk zenginleştirme yöntemi ile dışkılarından yapılan izolasyon çalışmalarında da *Listeria* Selektif Agar (Oxford formu) ve *Listeria* Selektif Agar (Merck) besiyerleri kullanıldı.

Sağım yolu ile koyunlardan steril koşullarda alınan 100 süt örneğinde *Listeria* etkenleri saptanmadı. 180 koyunun rektumundan alınan dışkı örneklerinin yapılan araştırmasında iki *L.monocytogenes*, iki *L.innocua*, iki *L.welshimeri*, bir *L.grayi* ve bir *L.murrayi* izole ve identifiye edildi.

SUMMARY

In this study, the presence of antibodies to *Listeria monocytogenes* were investigated in sheep sera by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the Marmara region. Listeriolysin O was isolated from the supernatant of cultured *L.monocytogenes* using dialysing membran and used in ELISA. Whole cell antigens of *L.monocytogenes* serotypes 1/2a and serotype 4b were also used as antigens.

The results of 1000 sheep sera obtained by ELISA using three different antigens were compared. Antibodies to listeriolysin O were detected in 3.6% sheep sera while antibodies to serotype 1/2a and serotype 4b have been detected 11.5% and 10.4% respectively.

In addition to serology, isolation and identification studies were also performed in milk and feaces of sheep. Heat enrichment method was used for milk samples using PALCAM and LSA (Oxford medium). Cold enrichment method was used for feaces using LSA (Oxford medium) and LSA (Merck).

No *Listeria* was isolated from 100 milk samples taken in sterile condition by hand milking. Whereas, two *L.monocytogenes*, two *L.innocua*, two *L.welshimeri*, one *L.grayi* and one *L.murrayi* were isolated from the feaces of 180 sheep taken from rectum.

KAYNAKLAR

- 1- AKAY,Ö. (1994): İnfeksiyöz hastalıklarda bağışıklık. (Arda.M., Minbay.A., Aydın.N., Akay.Ö., İzgür,M., Diker.S. "İmmunoloji" Medisan Yay. Ser. No:13 Ankara. 313-346.)
- 2- ALBRITTON,W.L., COCHI,S.L., FEELEY,J.C. (1984): Overview of neonatal Listeriosis. Clin. and Investigative Med.7 (4), 311-314.
- 3- ANDERSON,G., MASCOLA,L., RUTHERFORD,G.W., HUTCHESON,R., ARCHER,P., ZENKER,P., HARVEY,C., SMITH,J.D. (1992): Update: Foodborne Listeriosis - United States, 1988-1990. MMWR. 41 (15), 250-258.
- 4- ARDA,M., MİNBAY,A., LELOĞLU,N., AYDIN,N., AKAY,Ö. (1992): Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar. Atatürk Üniv. Yay. No:741, Atatürk Üniv. Bas. Erzurum.
- 5- ART,D., ANDRE,P. (1991): Comprasion of three selective isolation media for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Zbl. Bakt. 275, 79-84.
- 6- ASLAN,V. (1991): Hayvanların merkezi sinir sistemi hastalıklarının tanısında serebrospinal sıvı (CSF) değerlerinin önemi. Tr.J. of Vet. and Animal Sci. 15, 109-117.
- 7- AUDURIER,A., TAYLOR,A.G., CARBONNELLE,B., MCLAUHLIN,J. (1984): A phage typing sytem for *Listeria monocytogenes* and its use in epidemiological studies. Clin. and Investigative Med. 7 (4), 229-232.
- 8- BAHK,J., MARTH,E.H. (1990): Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Foodborne Diseases. Academic Press. Chap. 18, 248-257.
- 9- BARLOW,R.M., McGORUM,B. (1985): Ovine listerial encephalitis: Analysis, hypothesis and synthesis. Vet. Rec.116, 233-236.
- 10- BENNER,R., HOF,H. (1988): Therapeutic activity of teicoplanin on experimental listeriosis compared with that of vancomycin and ampicillin. Zbl. Bakt. Hyg. A. 268, 50-56.
- 11- BERCHE,P., REICH,K.A., BONNICHON,M., BERETTI,J-L., GEOFFROY,C., RAVENEAU,J., COSSART,P., GAILLARD,J-L., GESLIN,P., KREIS,H., VERON,M. (1990): Detection of anti-Listeriolyisin O for serodiagnosis of human listeriosis. Lancet. 335, 624-627.

- 12- BILLE,J., CATIMEL,B., BANNERMAN,E., JACQUET,C., YERSIN,M.N., CANIAUX,I., MONGET,D., ROCOURT,J. (1992): API listeria, a new and promising one-day system to identify listeria isolates. App. and Environ. Mic. 58 (6), 1857-1860.
- 13- BLENDEN,D.C., KAMPELMACHER,E.H., TORRES-ANJEL,M.J. (1987): Listeriosis. JAVMA. 191 (12), 1546-1551.
- 14- BOCKLISCH,V.H., WILHELMS,D., MIRLE,C., LANGE,S., KUCKEN,U. (1991): Listerienabort des Rindes - bakteriologie, serologie und epizootiologie. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr.104, 309-313.
- 15- BRACKETT,R.E. (1988): Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technology. April,162-164.
- 16- BRIONES,V., BLANCO,M.M., MARCO,A., PRATS,N., FERNANDEZ-GARAYZABAL,J.F., SUAREZ,G., DOMINGO,M., DOMINGUEZ,L. (1992): Biliary excretion as possible origin of *Listeria monocytogenes* in fecal carriers. Am. J. Vet. Res. 53 (2), 191-193.
- 17- BUNNING,V.K., DONELLY,C.W., PEELER,J.T., BRIGGS,E.H., BRADSHAW,J.G., CRAWFORD,R.G., BELIVEAU,C.M., TIERNEY,J.T. (1988): Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. App. and Environ. Mic. 54 (2), 364-370.
- 18- BUTT,M.T., WELDON,A., STAP,D., LAHUNTA,A., HUXTABLE,C.R. (1991): Encephalitic listeriosis in two adult Llamas: Clinical presentations, lesions and immunofluorescence of *L. monocytogenes* in brainstem lesions. Cornell Vet. 81, 251-258.
- 19- CHAKRABORTY,T., EBEL,F., WEHLAND,J., DUFRENNE,J., NOTERMANS,S. (1994): Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. FEMS Immun. and Med. Mic. 10, 1-10.
- 20- COOPER,G.L. (1989): An encephalitic form of listeriosis in broiler chickens. Avian Dis. 33:182-185.
- 21- CURTIS,G.D.W., MITCHELL,R.G., KING,A.F., GRIFFIN, E.J. (1989): A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. App. Mic. 8, 95-98.
- 22- ÇİFTÇİOĞLU, G. (1992): Kıyma, sucuk ve tavuk etlerinde *Listeria monocytogenes* 'in mevcudiyeti üzerine araştırmalar. İ.Ü.Sağ.Bil.Enst. Doktora tezi.

- 23- DALKILIÇ,E. (1988): Isolation of *Listeria monocytogenes* from clinical specimens. İnfek. Derg. 2 (4), 575-579.
- 24- DAVIES,J.W., EWAN,E.P., VARUGHESE,P., ACRES,S.E. (1984): *Listeria monocytogenes* infections in Canada. Clin. Investigative Med. 7 (4), 315-320.
- 25- DELVALLEZ,M., CARLIER,Y., BOUT,D., CAPRON,A., MARTIN,G.R. (1979): Purification of a surface-specific soluble antigen from *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 25 (3), 971-977.
- 26- DHANDA,M.R., LALL,J.M., SETH,R.N., CHANDRASEKARIAH,P. (1960): A case of listeric abortion in an ewe with a small scale survey of the incidence of agglutinings to listeria in the sera of sheep. Indian Vet. J. 36, 113-124.
- 27- DILLON,P.A., OVERMAN,S.B., OVERMAN,T.L. (1987): Rapid determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Listeria monocytogenes* isolates by the autobac AIS and MIC procedures. Current Mic. 15, 137-140.
- 28- DOĞUER,M. (1961): Türkiye'de Listeriosis. Etlik Vet. Bak. Enst. Derg. 1 (4), 345-346.
- 29- DOMINGO,M., RAMOS,J.A., DOMINGUEZ,L., FERRER,L., MARCO,A. (1986): Demonstration of *Listeria monocytogenes* with the PAP technique in formalin fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice. J. Vet. Med. B. 33, 537-542.
- 30- DONKER-VOET,J. (1959): A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. Am. J. Vet. Res. January, 176-179.
- 31- DONKER-VOET,J. (1972): *Listeria monocytogenes*: some biochemical and serological aspects. Acta. Mic. Acad. Sci. Hung. 19, 287-291.
- 32- DONNELLY,C.W., BRACKETT,R.E., DOORES,S., LEE,W.H., LOVETT,J. (1992): *Listeria*. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (Third edition, Edited by Carl Vonderzant, Don F. Splittestoesser. American Public Health Association.). Chap. 38, 637-663.
- 33- DOYLE,M.P. (1988): Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technology. April,169-171.
- 34- DOYLE,M.P., GLASS,K.A., BEERY,J., GARCIA,G.A., POLLARD,D.J., SCHULTZ,R.D. (1987): Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high temperature, short time pasteurization. App. and Environ. Mic. 53 (7), 1433-1438.

- 35- DOYLE, M.P., SCHOENI, J. (1986): Selective-Enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. App. Environ. Mic. 51 (5), 1127-1129.
- 36- EHLERS, S., HAHN, H. (1988): The influence of ciprofloxacin treatment in vivo on cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. Zbl. Bakt. Hyg. A. 268, 259-270.
- 37- ELD, K., DANIELSSON-THAM, M.-L., GUNNARSSON, A., THAM, W. (1993): Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. Vet. Mic. 36, 185-189.
- 38- EMBIL, J.A., EWAN, E.P., MACDONALD, S.W. (1984): Surveillance of *Listeria monocytogenes* in human and environmental specimens in Nova Scotia, 1974 to 1981. Clin. and Investigative Med. 7 (4), 325-327.
- 39- ESTELA, L.A., SOFOS, J.N. (1993): Comparison of conventional and reversed page typing procedures for identification of *Listeria* spp. App. Environ. Mic. 59 (2), 617-619.
- 40- EVANS, J.R., ALLEN, A.C., BORTOLUSSI, R., ISSEKUTZ, T.B., STINSON, D. (1984): Follow-up study of survivors of fetal and early onset neonatal Listeriosis. Clin. Investigative Med. 7 (4), 329-334.
- 41- FARBER, J.M., SANDERS, G.W., JOHNSTON, M.A. (1989): A survey of various foods for the presence of listeria species. J. Food Production. 52, 7, 456-458.
- 42- FEDIO, W.M., JACKSON, H. (1992): On the origin of *Listeria monocytogenes* in raw bulk-tank milk. Int. Dairy J. 2, 197-208.
- 43- FENLON, D.R. (1985): Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. App. Bac. 59, 537-543.
- 44- FENLON, D.R. (1989): The influence of gaseous environment and water availability on the growth of *Listeria*. Mic. Aliments Nutrition. 7, 165-169.
- 45- FENLON, D.R. (1990): Listeriosis. North of Scotland College of Agriculture, 581 King Street. Aberdeen AB9 1UD.
- 46- FIEDLER, F., RUHLAND, G.J. (1987): Structure of *Listeria monocytogenes* cell walls. Bull. Inst. Pasteur. 85, 287-300.
- 47- FİNCİ, E. (1968): Türkiye'de listeria durumu üzerinde araştırmalar. Ank. Üniv. Vet. Fak. Doktora tezi.

- 48- FLEMING, D.W., COCHI, S.L., MACDONALD, K.L., BRONDUM, J., HAYES, P.S., PLIKAYTIS, B.D., HOLMES, M.B., AUDURIER, A., BROOME, C.V., REINGOLD, A.L. (1985): Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Eng. J. Med.* 312 (7), 404-407.
- 49- FRASER, J.A., SPERBER, W.H. (1988): Rapid detection of listeria spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J. Food Protection.* 51 (10), 762-765.
- 50- FUCHS, R.S., SURENDRAN, P.K. (1989): Incidence of Listeria in tropical fish and fishery products. *Lett. App. Mic.* 9, 49-51.
- 51- GELLIN, B.G., BROOME, C.V. (1989): Listeriosis. *JAMA* 261 (9), 1313-1320.
- 52- GENIGEORGIS, C.A., DUTULISCU, D., GARAYZABAL, J.F., (1989): Prevalence of Listeria spp. in Poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Protection.* 52 (9), 618-624.
- 53- GEOFFROY, C., GAILLARD, J-L., ALOUF, J.E., BERCHE, P. (1987): Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 55(7), 1641-1646.
- 54- GEORGE, S.M., LUND, B.M., BROCKLEHURST, T.F. (1988): The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. App. Mic.* 6, 153-156.
- 55- GILL, D.A. (1937): Ovine Bacterial encephalitis (Circling Disease) and the Bacterial Genus Listerella. *Aust. Vet. J.* April, 46-56.
- 56- GITTER, M., STEBBINGS, R.STJ., MORRIS, J.A., HANNAM, D., HARRIS, C. (1986): Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. *Vet. Rec.* 22, 207-208.
- 57- GORMLEY, E., MENGAUD, J., COSSART, P. (1989): Sequences homologous to the listeriolysin O gene region of *Listeria monocytogenes* are present in virulent and avirulent haemolytic species of the genus listeria. *Res. Mic.* 140, 631-643.
- 58- GÖZ, M. (1988): Düşük, ölü doğum yapma ve prematürite gibi obstetrikle ilgili sorunu bulunan kadınların serumlarında *Listeria monocytogenes* "O" antikorlarının araştırılması ve *Listeria monocytogenes* tip antiserumlarının hazırlanması. *Ank. Üniv. Sağ. Bil. Enst. Y.Lisans Tezi.*

- 59- GRONSTOL,H. (1979): *Listeria monocytogenes* excretion and immunological state in healthy sheep. Acta Vet. Scand. 20, 168-179.
- 60- GRONSTOL,H. (1979): Isolation of *Listeria monocytogenes* from grass silage. Acta Vet. Scand. 20, 492-497.
- 61- GRONSTOL,H. (1987): Listeriosis - a review. The Norwegian College of Vet. Med. Pub. 5-14.
- 62- GRONSTOL,H. (1990): Listeria. Pathogeneses of Bacterial Infections in Animals. (Ed. by Carlton L. Gyles, Charles O. Thoen. Iowa State University Press / Ames). Chap. 6, 48-55.
- 63- GUNASINGHE, C.P.G.L., HENDERSON, C., RUTTER, M.A. (1994): Comparative study of two plating media (PALCAM and Oxford) for detection of listeria species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures. Lett. App. Mic. 18, 156-158.
- 64- GÜN,H. (1994): İstanbul ve yöresindeki sağlıklı ineklerin sütlerinde listeria türlerinin izolasyon, identifikasyon ve patojenitesi üzerine araştırmalar. İ.Ü. Sağ. Bil. Ens. Doktora tezi.
- 65- HAYES, P.S., GRAVES, L.M., AJELLO, G.W., SWAMINATHAN, B., WEAVER, R.E., WENGER, J.D., SCHUCHAT, A., BROOME, C.V. (1991): Comparison of cold enrichment and U.S. department of agriculture methods for isolating *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. App. Environ. Mic. 57 (8), 2109-2113.
- 66- HITCHINS,A.D. (1989): Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from inoculated ice cream. J. of Food Protec. 52 (12), 898-900.
- 67- HITCHINS,A.D. (1992): *Listeria monocytogenes*. FDA Bac. Anal. Man. 7th Ed. 10, 141-151.
- 68- HOF,H., CHATZIPANAGIOTOU,S. (1987): The role of surface structures of *Listeria* spp. for pathogenicity. Ann. Inst. Past. Microbiol. 138 (2), 268-273.
- 69- HUDAK,A.P., LEE,S.H., ISSEKUTZ,A.C., BORTOLUSSI,R. (1984): Comparison of three serological methods ELISA, Complement fixation, and Microagglutination in the diagnosis of human perinatal *Listeria monocytogenes* infection. Clin. and Investigative Med. 7 (4), 349-354.

- 70- HUSU,J.R. (1990): Epidemiological Studies on the Occurrence of *Listeria monocytogenes* in the Feces of Dairy Cattle. J. Vet. Med. B. 37, 276-282.
- 71- ISSEKUTZ,T.B., EVANS,J., BORTOLUSSI,R. (1984): The immune response of human neonates to *Listeria monocytogenes* infection. Clin. Investigative Med. 7 (4), 281-286.
- 72- İZGÜR,M., ESENDAL,Ö.M., AKAY,Ö., GÜLCÜ,B. (1990): Koyunların atık fötuslarından *Listeria monocytogenes* izolasyonu. KÜKEM Derg. 13 (2), 31-35.
- 73- JENSEN,A. (1993): *Listeria monocytogenes* isolation from human faecal specimens: experiments with the selective media, PALCAM and L-PALCAMY. Lett. App. Mic. 16, 32-35.
- 74- JONES,D. (1988): Taxonomy of Listeria. İnfek. Derg. 2 (4), 461-469.
- 75- JONES,D. (1990): Foodborne listeriosis. Lancet. 336 (10), 1171-1174.
- 76- KAEFFER,B., PARDON,P., MARLY,J. (1989): Infection with a reduced virulence *Listeria monocytogenes* strain increases resistance to Salmonellosis in mice. Ann. Rech. Vet. 20, 47-56.
- 77- KAMPELMACHER,E.H. (1988): Foodborne listeriosis - Facts and fictions. İnfek. Derg. 2 (4), 527-532.
- 78- KAMPFER,P., BOTTCHER,S., DOTT,W., RUDEN,H. (1991): Physiological characterization and identification of Listeria species. Zbl. Bakt. 275, 423-435.
- 79- KATHARIOU,S., ROCOURT,J., HOF,H., GOEBEL,W. (1988): Levels of *Listeria monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infections of mice. Infect. Immun. 56 (2), 534-536.
- 80- KAYA,M., GÖKALP,H.Y. (1991): Bazı et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* 'in aranması, karakterizasyonu ve kontrolü üzerine araştırmalar. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Gıda Tek. Araş. Enst. Bursa II. Ulusl. Gıda Semp.1-3 Ekim, Bursa.
- 81- KEMENES,F., GLEVITS,R., IVANICS,E., KOVACS,G.Y., VANYI,A. (1983): Listeriosis of Roe-Deer in Hungary. Zbl. Vet. Med. B. 30, 258-265.
- 82- KERR,K.G., LACEY,R.W. (1991): Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. J. Clin. Pat. 44, 624-627.

- 83- KEVIN,G.K., ROTOWA,N.A., HAWKEY,P.M., LACEY,R.W. (1990): Incidenci of *Listeria* spp. in Pre-cooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunassay (ELISA). *J. Food Protection*. 53 (7), 606-607.
- 84- KOHLER,S., WACHTER,M.L., CHAKRABORTY,T., LOTTSPEICH,F., GOEBEL,W. (1990): The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infec. Immun*. 58 (6), 1943-1950.
- 85- KUTSAL,A., ALPAN,O., ARPACIK,R. (1990): İstatistik uygulamaları. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- 86- L HOPITAL,S., MARLY,J., PARDON,P., BERCHE,P. (1993): Kinetics of antibody production against Listeriolysin O in sheep with listeriosis. *J. Clin. Mic*. 31 (6), 1537-1540.
- 87- LACHICA,R.V. (1990): Simplified Henry Technique for initial recognition of *Listeria* colonies. *App. Environ. Mic*. 56 (4), 1164-1165.
- 88- LADDS,P.W., DENNIS,S.M., COOPER,R.F. (1974): Sequential studies of experimentally induced ovine listerial abortion: Clinical changes and bacteriologic examinations. *Am. J. Vet. Res.* (2), 155-160.
- 89- LARSEN,H.E., SEELIGER,H.P.R. (1966): A mannitol fermenting listeria: *Listeria grayi* sp. nov. 3. *Inter. Sym. on Listeriosis*. July 13-16. Bilthoven.
- 90- LEE,W.J., McCLAIN,D. (1986): Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *App. Environ. Mic*. 52 (5), 1215-1217.
- 91- LOESSNER,M.J., BUSSE,M. (1990): Bacteriophage typing of *Listeria* species. *App. Environ. Mic*. 56 (6), 1912-1918.
- 92- LONCAREVIC,S., THAM,W., DANIELSSON-THAM,M.-L. (1994): Occurrence of *Listeria* species in broilers Pre- and Post- Chilling in chlorinated water at two slaughterhouses. *Acta Vet. Scand*. 35, 149-154.
- 93- LOVETT,J. (1984): *Listeria* isolation. *FDA Bac. Anal. Man*. 6th ed. Chap. 29,1-12.
- 94- LOVETT,J. (1988): Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. *Food Techn*. April,172-175.
- 95- LOVETT,J., FRANCIS,D.W., HUNT,J.M. (1987): *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Protection*. 50 (3), 188-192.

- 96- **LOW,J.C., DAVIES,R.C., DONACHIE,W. (1992):** Purification of Listeriolysin O and Development of an Immunoassay for diagnosis of listeric infections in sheep. *J. Clin. Mic.* 30,2705-2708.
- 97- **LOW,J.C., DONACHIE,W. (1991):** Clinical and serum antibody responses of lambs to infection by *Listeria monocytogenes*. *Res. Vet. Sci.* 51, 185-192.
- 98- **LOW,J.C., RENTON,C.P. (1985):** Septicaemia, encephalitis and abortions in a housed flock of sheep caused by *Listeria monocytogenes* type 1/2. *Vet. Rec.* 116, 147-150.
- 99- **LOW,J.C., WRIGHT,F., MCLAUCHLIN,J, DONACHIE,W. (1993):** Serotyping and distribution of *Listeria* isolates from cases of ovine listeriosis. *Vet. Rec.* 133, 165-166.
- 100- **MACLEOD,N.S.M., WATT,J.A., HARRIS,J.C. (1974):** *Listeria monocytogenes* type 5 as a cause of abortion in sheep. *Vet. Rec.* 95, 365-367.
- 101- **MARTH,E.H. (1988):** Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Tech.* April,165-168.
- 102- **MASCOLA,L., LIEB,L., CHIU,J., FANNIN,S.L., LINNAN,M.J. (1988):** Listeriosis: An uncommon opportunistic infection in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am. J. Med.* 84 (1), 162-164.
- 103- **McCLAIN,D., LEE,W.H. (1987):** Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. Symposium on *Listeria monocytogenes*. 101 st AOAC Annual International Meeting, Sept. 14-17, San Francisco, CA.
- 104- **McKELLAR,R.C. (1994):** Identification of the *Listeria monocytogenes* virulence factors involved in the CAMP reaction. *Lett. App. Mic.* 18, 79-81.
- 105- **McLAUCHLIN,J. (1987):** *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J. App. Bac.* 63, 1-11.
- 106- **McLAUCHLIN,J. (1990):** Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur. J. Clin. Mic. Infect Dis.* 9, 210-213
- 107- **McLAUCHLIN,J., AUDURIER,A., TAYLOR,A.G. (1986):** Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967-1984; the use of serotyping and phage typing. *J. Med. Mic.* 22, 367-377.

- 108- McLAUHLIN,J., LOW,J.C. (1994): Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet. Rec.* 24 (31), 615-617.
- 109- MENGAUD,J., CHENEVERT,J., GEOFFROY,C., GAILLARD,J.L., COSSART,P. (1987): Identification of the structural gene encoding the SH activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: Listeriolysin O is homologous to Streptolysin O and Pneumolysin. *Infect. Immun.* 55 (12), 3225-3227.
- 110- MIETTINEN,A., HUSU,J. (1991): Antibodies to listeriolysin O reflect the acquired resistance to *Listeria monocytogenes* in experimentally infected goats. *FEMS Mic. Lett.* 77, 181-186.
- 111- MIETTINEN,A., HUSU,J., TUOMI,J. (1990): Serum antibody response to *Listeria monocytogenes*, listerial excretion, and clinical characteristics in experimentally infected goats. *J. Clin. Mic.* (2), 340-343.
- 112- MURRAY,E.G.D., WEBB,R.A., SWANN,M.B.R. (1926): A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pat. Bac.* 29, 407-439.
- 113- MULLER,H.E. (1988): Listeriosis in animals. *İnfek. Derg.* 2 (4), 505-519.
- 114- MULLER,H.E. (1990): *Listeria* isolations from feces of patients with diarrhea and from healthy food handlers. *Infect.* 18 (2), 97-100.
- 115- NATO,F., REICH,K., LHOPITAL,S., ROUYRE,S., GEOFFROY,C., MAZIE, J.C., COSSART,P. (1991): Production and characterization of neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies against listeriolysin O. *Infect. Immun.* 59 (12), 4641-4646.
- 116- NICTERLEIN,T., KRETSCHMAR,M., HOF,H. (1994): Fecal shedding of *Listeria monocytogenes* during murine listeriosis after intravenous infection. *Zbl. Bakt.* 281, 192-195.
- 117- NOWACKI,J., KLIMENTOWSKI,S., LEWANDOWSKA,S. (1991): Działanie ochronne szczepionki przeciw listeriozie u owiec uodpornionych przed pokryciem. (A protective value of anti-listeria vaccine in sheep immunized before mating.) *Medyeyna Wet.* 47 (11), 511-513.
- 118- OTAĞ,F. (1990): Kadınlarda vaginal *Listeria* taşıyıcılığı ve *Listeria* antikor seviyelerinin araştırılması. *İst. Üniv. İst. Tıp Fak. Uzm. Tezi.*

- 119- ÖZBAL, Y., FAZLI, Ş.A., BÖLÜKBAŞI, S., KANADIKIRIK, F., KILIÇ, H., ARSLAN, N. (1987): Habitual abortus'un etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmaların insidensi. *İnfek. Derg.* 1 (2-3), 137-142.
- 120- PARLAKGÜL, D. (1991): *Brucella* bakterilerinin peynirden ayrılması için balıklı besiyeri geliştirilmesi ve İstanbul piyasasında satılan peynirlerde *Brucella* ve *Listeria* bakterilerinin araştırılması. İst. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Uzm. tezi.
- 121- PARRISIUS, J., BHAKDI, S., ROTH, M., TRANUM-JENSEN, J., GOEBEL, W., SEELIGER, H.P.R. (1986): Production of Listeriolysin by Beta-hemolytic strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 51 (1), 314-319.
- 122- PEEL, M., DONACHIE, W., SHAW, A. (1988): Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Mic.* 2171-2178.
- 123- PETERS, M., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., AMTSBERG, G. (1992): Untersuchungen zur diagnostik der Listerienenzephalitis bei Wiederkaeuern unter Anwendung kultureller und immunhistologischer Verfahren. (Studies on the diagnosis of encephalitis in ruminants using cultural and immunohistological techniques.) *J. Vet. Med. B.* 39, 473-484.
- 124- PIRIE, J.H.H. (1927): A new disease of veld rodents. "Tiger River Disease". *Pub. of South African Inst. Med. Res.* 3, 163-186.
- 125- PORTNOY, D.A., JACKS, P.S., HINDICHS, D.J. (1988): Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167, 1459-1471.
- 126- PREVOT, A.R. (1961): *Listeria*. *Traite de Sys. Bac.* Tome II. 511-512. Dunod, Paris.
- 127- RALOVICH, B. (1993): Detection and Epidemiological typing of *Listeria* strains. Diagnostic methods for *Listeria* infections. *Acta Mic. Hung.* 40 (1), 3-38.
- 128- RAMOS, J.A., DOMINGO, M., DOMINGUEZ, L., FERRER, L., MARCO, A. (1988): Immunohistologic diagnosis of avian listeriosis. *Avian Path.* 17, 227-233.
- 129- REUTER, R., BOWDEN, M., PALMER, M. (1989): Ovine listeriosis in south coastal western Australia. *Aust. Vet. J.* 66 (7), 223.

- 130- ROCOURT, J. (1986): Bacteriophages et bacteriocines du genre *Listeria*. Zbl. Bakt. Hyg. A, 261, 12-28.
- 131- ROCOURT, J. (1988): The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods. Infek. Derg. 2 (4), 471-485.
- 132- ROCOURT, J., GRIMONT, P.A.D. (1983): *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. Inter. J. Sys. Bac. 33 (4), 866-869.
- 133- ROCOURT, J., WEHMEYER, U., STACKEBRANDT, E. (1987): Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. Inter. J. Sys. Bac. 37 (3), 266-270.
- 134- RODRIGUEZ, L.D., FERNANDEZ, G.S., GARAYZABAL, J.F.F., FERRI, E.R. (1984): New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments. App. Environ. Mic. 47 (5), 1188-1190.
- 135- SAMUELSSON, S., ROTHGARDT, N.P., CARVAJAL, A., FREDERIKSEN, W. (1990): Human listeriosis in Denmark 1981-1987 including an outbreak November 1985 - March 1987. J. Infect. 20, 251-259.
- 136- SCHLECH III, W.F. (1988): Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Tech. April, 176-178.
- 137- SCHMIDT, U., SEELIGER, H.P.R., GLENN, E., LANGER, B., LEISTNER, L. (1988): Listerienfunde in rohen Fleischerzeugnissen. Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach. 101, 8080-8088.
- 138- SCHONBERG, A. (1988): Prevention and control of Listeriosis. Infek. Derg. 2 (4), 533-540.
- 139- SCOTT, P.R. (1993): A field study of ovine listerial meningo-encephalitis with particular reference to cerebrospinal fluid analysis as an aid to diagnosis and prognosis. Br. Vet. J. 149, 165.
- 140- SCOTTER, S.L., WOOD, R., WILLIAMS, A.P. (1993): Methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Results of an Inter-laboratory study. J. Assoc. Publ. Anal. 29, 221-251.
- 141- SEELIGER, H.P.R. (1984): Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. Clin. Investigative Med. 7 (4), 217-221.

- 142- SEELIGER,H.P.R. (1988): Why Listeriosis? *Infek. Derg.* 2 (4), 455-460.
- 143- SEELIGER,H.P.R., HÖHNE,K. (1979): Serotyping of *L. monocytogenes* and related species. (Ed.by Bergan,J., Norris,J.R. "Methods in Microbiology". Acad. Pres. London, New York, toronto, Sydney, San Francisco. Vol.13, 32-48.)
- 144- SEELIGER,H.P.R., JONES,D. (1986): *Listeria*. (Ed. by Sneath,P.H.A., Mair,N., Sharpe,M.E., Holt,J.G. "Bergey's manual of Systematic Bacteriology". Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. Vol. 2, 1235-1245.)
- 145- SEELIGER,H.P.R., JONES,D. (1993): The taxonomy of *Listeria* , *Brochothrix* and *Erysipelothrix*. *Inter. J. Sys. Bac.* 43 (1), 186.
- 146- SEELIGER,H.P.R., LANGER,B. (1988): Methods of detection, isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and related species from clinical samples, food and environmental sources. *Infek. Derg.* 2 (4), 607-616.
- 147- SEELIGER, H.P.R., ROCOURT, J., SCHRETTENBRUNNER, A., GRIMONT, P.A.D., JONES, D. (1984): *Listeria ivanovii* sp. nov. *Inter. J. Sys. Bac.* 34(3), 336-337.
- 148- SEIMIYA, Y., OHSHIMA, K., ITOH, H., MURAKAMI, R. (1992): Listeric septicemia with meningitis in a neonatal calf. *J. Vet. Med. Sci.* 54 (6), 1205-1207.
- 149- SHARIF,A., TUNAIL,N. (1995): Detection of *Listeria monocytogenes* in foods of animal origin. *Tr. J. Vet. Ani. Sci.* 19, 329-334.
- 150- SKOVGAARD,N., NORRUNG,B. (1989): The incidence of *Listeria* spp. in faeces of danish pigs and in minced pork meat. *Inter. J. Food Mic.* 8, 59-63.
- 151- SLADE,P.J., COLLINS-THOMPSON,D.L. (1988): Comparison of two-stage and direct selective enrichment techniques for isolating *Listeria* spp. from raw milk. *J. Food Sci.* 53 (6), 1694-1702.
- 152- SOKOLOVIC,Z., FUCHS,A., GOEBEL,W. (1990): Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58 (11), 3582-3587.
- 153- TURILLI,C., MARCOLIN,G., PROSPERI,S. (1988): Evaluation of ELISA versus CF for the diagnosis of bovine listeriosis. *La Clin.Vet.* 111 (3), 154-157.

- 154- TÜMBAY,E., SEELIGER,H.P.R., İNCİ,R., COŞAR,G., LANGER,B. (1988): Isolation of *Listeria* from cheese in Turkey. *İnfek. Derg.* 2 (4), 593-598.
- 155- ÜNLÜ,G. (1990): Sivas yöresindeki çiğ sütlerde *Listeria monocytogenes* ve diğer türlerin aranması. Cum. Üniv. Tıp Fak. Uzm. tezi
- 156- VAN NETTEN,P., PERALES,I., VAN DE MOOSDIJK,A., CURTIS,G.D.W., MOSSEL,D.A.A. (1988): Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in more or less severely contaminated food: An attempt to reach consensus at the international level. Proceedings 10. Inter.Congress on Listeriosis, Pesc, Hungary.1-15.
- 157- VANDEPITTE,J., RUELENS,R. (1988): Clinical aspects of Human Listeriosis. *İnfek. Derg.* 2 (4), 487-496.
- 158- VANDERGRAAFF,R., BORLAND,A.N., BROWNING,J.W. (1981): An outbreak of listerial meningo-encephalitis in sheep. *Aust. Vet. J.* 57, 94-96.
- 159- VAZQUEZ-BOLAND, J.A., DOMINGUEZ, L., BLANCO, M., ROCOURT, J., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F., GUTIERREZ, C.B., TASCÓN, R.I., RODRIGUEZ-FERRI, E.F. (1992): Epidemiologic investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria* selective enumeration medium and phage typing. *Am. J. Vet. Res.* 53 (3), 368-371.
- 160- VAZQUEZ-BOLAND,J.A., DOMINGUEZ,L., RODRIGUEZ-FERRI,E.F., SUAREZ,G. (1989): Purification and characterization of two *Listeria ivanovii* cytolysins, a sphingomyelinase C and a thiol-activated toxin (Ivanolysin O). *Infect. Immun.* 57 (12), 3928-3935.
- 161- WACHTER,M.L., DOMANN,E., CHAKRABORTY,T. (1992): The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bac.* 174 (3), 947-952.
- 162- WALKER, J.K., MORGAN, J.H., McLAUCHLIN, J., GRANT, K.A., SHALCROSS, J.A. (1994): *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Vet. Mic.* 42, 245-253.
- 163- WALKER,S.J., ARCHER,P., APPLEYARD,J. (1990): Comparison of the listeria-Tek ELISA kit with cultural procedures for the detection of *Listeria* species in foods. *Food Mic.* 7, 335-342.

- 164- WARDROPE,D.D.,MACLEOD,N.S.M. (1983):** Outbreak of listeria meningo-encephalitis in young lambs. Vet. Rec. 113, 213-214.
- 165- WEHR,H.M. (1987):** *Listeria monocytogenes* -Special reports. J. Assoc. Anal. Chem. 70 (5),769-772.
- 166- WIEDMANN,M. (1994):** Modellversuche zur Entwicklung einer "an PCR gekoppelten LCR" zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* im Lebensmittelbereich. Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Doktorwürde.
- 167- WILESMITH,J.W.,GITTER,M. (1986):** Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. Vet. Rec. 119, 467-470.



ÖZGEÇMİŞ

Kayseri'de 1965 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kayseri'de, lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 1984 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim ve 1989 yılında mezun oldum. 1990 yılının Şubat döneminde Doktora sınavını kazanarak İ.Ü.Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalışmalarına başladım ve aynı yıl Ekim ayında Araştırma Görevlisi olarak göreve atandım.

Halen İ.Ü.Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görevimi sürdürmekteyim.