

**FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HAYVAN, GIDA VE ÇEVRE
ÖRNEKLERİNDEN LİSTERİYALARIN
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

Eray ATIL

ELAZIĞ - 2009

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ

Danışman

Doktora Sınavı Üyeleri

Prof. Dr. Adile MUZ

Prof. Dr. Hasan Basri GÜLCÜ

Prof. Dr. Ali ARSLAN

Prof. Dr. Fuat AYDIN

TEŞEKKÜR

Doktora tez danışmanlığımı üstlenmesi ve tez çalışmam boyunca hiçbir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca kendilerinden ders aldığım ve yardımlarını gördüğüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Adile MUZ, Prof. Dr. Hasan Basri GÜLCÜ, Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA, Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR hocalarıma, hem moleküler hem de kültür çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Murat KARAHAN ve doktora öğrencisi Recep KALIN'a teşekkür ederim.

Tez ile ilgili laboratuvar çalışmalarım esnasında, örneklerin toplanmasında yardımlarını aldığım mesai arkadaşlarım Nihat SELÇUK ve Alper ÖZEN ile çalışmış olduğum kurum Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü yöneticilerine ve bütün mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince verdiği sonsuz manevi destek ve bana göstermiş olduğu büyük sevgi ve sabrından dolayı eşim Ayşe Gül'e, ilgi ve dualarını hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Ayrıca bu tez çalışmasını TOVAG 106 O 161 nolu proje olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	No
Başlık Sayfası	i
Onay Sayfası	ii
Teşekkür	iii
İçindekiler	iv
Tablo Listesi	vii
Şekil Listesi	ix
Kısaltmalar Listesi	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Tarihçe	5
3.2. Taksonomi	6
3.3. Morfoloji	7
3.4. Biyokimyasal Özellikleri	8
3.4.1. Christie, Atkins, Munch-Peterson (CAMP) Testi	10
3.5. Genetik Özellikler	11
3.6. Virulens Faktörler	12
3.7. Epidemiyoloji	15
3.8. Doğal Yaşam Yerleri	18
3.9. Tarımsal Alanlar	20
3.10. Gıdaların Bulunduğu Çevreler ve Gıdalar Arasındaki İlişkiler	23
3.11. Hayvanlarda Listerialar	24
3.12. Türkiye’de Listeriosis	26
3.13. İzolasyon	30
3.13.1 FDA/BAM ve ISO 11290	31
3.13.2. USDA/FSIS ve AOAC/IDF	32
3.13.3. Kromojenik Besi Yerleri	32
3.14. Monoklonal Antikorlar ile Listeriaların Teşhisi	33
3.15. Moleküler Yöntemler	34

3.15.1.	DNA Hibridizasyonu	34
3.15.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	34
3.15.3.	DNA Sekanslama	35
3.16.	Tiplendirme	36
3.16.1.	Fenotipik Tiplendirme	36
3.16.1.1.	Serotiplendirme	36
3.16.1.2.	Faj Tiplendirme	37
3.16.1.3.	Multilocus Enzyme Electroporesis (MLEE)	38
3.16.2.	Moleküler Tiplendirme	38
3.16.2.1.	Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	38
3.16.2.2.	Ribotiplendirme	39
3.16.2.3.	Restriksiyon Enzim Analizi (REA)	39
3.16.2.4.	PCR Tabanlı Tiplendirme Teknikleri	40
3.16.2.4.1.	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve arbitrarily primed PCR (AP-PCR)	40
3.16.2.4.2.	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	41
3.16.2.4.3.	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	41
3.16.2.4.4.	Repetitive PCR (Rep-PCR)	42
3.16.2.4.5.	DNA Sekanslama	42
3.17.	Amaç	43
4.	GEREÇ ve YÖNTEM	45
4.1.	GEREÇ	45
4.1.1.	İşletme Seçimi	45
4.1.2.	Örneklerin Toplanması ve Kültür İşlemlerine Hazırlanması	45
4.2.	YÖNTEM	48
4.2.1.	İzolasyon	48
4.2.1.1.	Association of Official Agricultural Chemists/International Dairy Federation/International Dairy Federation (AOAC/IDF) Metodu	48
4.2.1.2.	United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) Metodu	49
4.2.2.	Biyokimyasal Testler	50
4.2.3.	Çalışmada Kullanılan Referans Suşlar	50

4.2.4.	Moleküler Testler	51
4.2.4.1.	PCR Analizleri	51
4.2.4.2.	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi	53
4.2.4.3.	Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) Analizi	54
4.2.4.4.	HLWL74 ve HLWL85 Primerleri ile RAPD	54
4.2.5.	Kültür Aşamasında Kullanılan Besi Yeri ve Ayıraçlar	56
4.2.6.	PCR İşlemlerinde Kullanılan Ayıraçlar	56
4.3.	İstatistiksel Analiz	57
5.	BULGULAR	58
5.1.	İzolasyon	58
5.2.	Hayvan Türlerine Göre Dağılımlar	65
5.3.	Mevsimplere Göre Dağılımlar	66
5.4.	Örneklere Göre Dağılımlar	72
5.5.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının Dağılımları	75
5.6.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının <i>AluI</i> ve <i>Tsp509I</i> Restriksiyon Enzimleri RFLP Tiplendirilmesi	78
5.7.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının HLWL74 ve HLWL85 Primerleri ile RAPD Tiplendirmesi	82
6.	TARTIŞMA	85
7.	KAYNAKLAR	100
8.	ÖZGEÇMİŞ	109

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No	
Tablo 1.	Listeria Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri	10
Tablo 2.	<i>L. monocytogenes</i> ve <i>L. innocua</i> 'nın Moleküler Özellikleri	12
Tablo 3.	Listeria İzolasyonunda Kullanılan Kromojenik Besi Yerleri	33
Tablo 4.	Listeriaların Serotip Grupları	37
Tablo 5.	Numune Sayıları ve Dağılımları	47
Tablo 6.	PCR Analizlerinde ve Tiplendirme Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler	55
Tablo 7.	İzole Edilen Listeriaların Biyokimyasal ve Moleküler İdentifikasyon Tablosu	61
Tablo 8.	İzolasyonu Yapılan Listeria Türleri ve Sayıları	64
Tablo 9.	Listeriaların Hayvan Türlerine Göre Dağılımları	65
Tablo 10	Sığır Örneklerinden İzole Edilen <i>Listeria spp.</i> İzolatlarının Dağılımları	65
Tablo 11	Koyun Örneklerinden İzole Edilen <i>Listeria spp.</i> İzolatlarının Dağılımı	66
Tablo 12.	Listeria İzolatlarının Mevsimsel Dağılımları	67
Tablo 13.	Listeria Türlerinin Mevsimlere Göre Dağılımı	69
Tablo 14.	Sığır İzolatlarının Mevsimsel Dağılımı	70
Tablo 15.	Koyun İzolatlarının Mevsimsel Dağılımı	72
Tablo 16.	İzolasyonu Yapılan Listeriaların Örneklere Göre Dağılımı	73
Tablo 17.	Listeria Türlerinin Örneklere Göre Dağılımı	74
Tablo 18.	Sığır İzolatlarının Örneklere Örneklere Göre Dağılımı	75
Tablo 19.	Koyun İzolatlarının Örneklere Göre Dağılımı	75
Tablo 20.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının Hayvan Türlerine Göre Dağılımları	76
Tablo 21.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının Örneklere Göre Dağılımları	76
Tablo 22.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının Mevsimsel Dağılımları	78
Tablo 23.	İzolasyonları Yapılan <i>L. monocytogenes</i> Suşlarının RFLP Profillerinin Restriksiyon Enzimlerine Göre Dağılımı	79

Tablo 24. İzolasyonları Yapılan *L. monocytogenes* Suşlarının HLWL 74 ve HLWL85 Primerleri ile RAPD Tiplendirme Sonuçları

82

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 1.	Listeriaların Fenotipik İdentifikasyonu	9
Şekil 2.	Christie, Atkins, Munch–Peterson (CAMP) Testi Örneği	11
Şekil 3.	Listeriaların Hücre İçindeki Hayat Döngüsü	13
Şekil 4.	<i>L. monocytogenes</i> ve <i>L. innocua</i> 'nın Sirküler Genom Haritaları	14
Şekil 5.	Listeriaların Yaşam Döngüsü	17
Şekil 6.	AOAC/IDF Metodu ile İzolasyon	49
Şekil 7.	USDA/FSIS Metodu ile İzolasyon	50
Şekil 8.	<i>Listeria spp.</i> İzolatlarının PCR ile Doğrulanması	58
Şekil 9.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görünümü	59
Şekil 10.	Listeria Selektif Agarda Listeria Kolonilerinin Görüntüsü	63
Şekil 11.	Christie, Atkins, Munch–Peterson (CAMP) Testi	63
Şekil 12.	İzolasyonu Yapılan Listeria Türlerinin Dağılımları	64
Şekil 13.	Listeria İzolatlarının Mevsimsel Dağılımları	67
Şekil 14.	Listeria Türlerinin Mevsimsel Dağılımı	69
Şekil 15.	Sığır İzolatlarının Mevsimsel Dağılımı	71
Şekil 16.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının PCR-RFLP Tiplendirmesi için Çoğaltılan Ürünlerin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	79
Şekil 17.	<i>AluI</i> ile Muamele Edilmiş PCR-RFLP Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü	80
Şekil 18.	<i>Tsp509I</i> ile Muamele Edilmiş PCR-RFLP Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü	81
Şekil 19.	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının HLWL74 Primeri ile RAPD Tiplendirmesi	83
Şekil 20	<i>L. monocytogenes</i> İzolatlarının HLWL85 Primeri ile RAPD Tiplendirmesi	84

KISALTMALAR

Association of Official Agricultural Chemists/International Dairy Federation
(AOAC/IDF)

United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service
(USDA/FSIS)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Christie, Atkins, Munch–Peterson (CAMP) Testi

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Half Fraser Broth (Half FB)

Fraser Broth (FB)

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

Polyacrylamide Gel Elektroforez (PAGE)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Listeria Enrichment Broth (LEB)

University of Vermont Broth I (UVM I)

Modifiye Oxford agar (MOX)

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

1. ÖZET

Bu çalışma, Şubat 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında Elazığ ve çevresinde yapıldı. Sığır ve koyunlardan, süt ve peynirlerden ve bu hayvanların yetiştirildiği çevrelerden 12 ay boyunca örnekler toplanarak listeriaların varlığı araştırıldı. Bölgedeki listeriaların varlığının mevsimsel dağılımı ortaya konuldu. İzole edilen *L. monocytogenes* suşlarının moleküler tiplendirilmesi yapılarak, profil dağılımı ortaya konuldu. Ayrıca *L. monocytogenes* suşları ile hayvan, gıda ve çevre olguları arasındaki ilişkiler araştırıldı.

Elazığ ve çevresinden seçilen 6 sığır ve 5 koyun işletmesinden süt, peynir, su, yem, süt tankı, fekal ve çevresel örnekler toplandı. Bu çalışmada sığır çiftliklerinden 415, koyun çiftliklerinden de 304 adet olmak üzere toplam 719 adet örnek incelendi. Bu örneklerin dağılımı 132 adet (72 adet sığır, 60 adet koyun) gaita, su, yem, çevre, 106 adet süt (75 adet sığır, 35 adet koyun), 57 adet peynir (28 adet sığır, 29 adet koyun), 28 adet sığır süt tankı svabı şeklinde oldu.

Süt ve süt ürünlerinde listeria izolasyonu Association of Official Agricultural Chemists/International Dairy Federation (AOAC/IDF), diğer örneklerde ise United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS)'in önerdiği yöntem kullanılarak yapıldı. İzole edilen *Listeria* spp. suşları biyokimyasal testler ile isimlendirildi. İzolatlar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cins düzeyinde ve *L. monocytogenes* izolatları ise tür düzeyinde PCR ile doğrulandı. Hem PCR hem de biyokimyasal testler ile tanımlenen *L. monocytogenes* izolatları Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) moleküler analiz yöntemleri ile tiplendirildi.

Toplam 719 örneğin 46 adedinden (% 6.40) *Listeria* spp. izolasyonu yapıldı. Bu izolatların moleküler ve biyokimyasal yöntemler ile 8'i (% 17.4) *L. monocytogenes*, 18'i (% 39.0) *L. innocua*, 8'i (% 17.4) *L. seeligeri*, 7'si (% 15.2) *L. grayi* ve 5'i (% 10.8) *L. welshimeri* olarak saptandı. Listeriaların 39 adedi (% 9.4) sığır, 7 adedi (% 2.4) koyun orijinli örneklerden izole edildi.

İzole edilen *L. monocytogenes* suşlarının RAPD analizleri iki farklı primerle birlikte (HLWL74 ve HLWL85) yapıldı. HLWL74 primeri ile 4 farklı profil 1-4 arası sayıda bantlar, HLWL85 primeri ile 6 farklı profil ve 1 ile 3 arası bantlar elde edildi. RFLP analizi ile tiplendirmede *inlA* genine spesifik PCR'dan sonra *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimleri kullanıldı. *AluI* restriksiyon enzimiyle 2 farklı profil ve 2-3 arasında bantlar elde edildi. *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimleriyle toplam 4 farklı profil elde edildi. Çalışmada, RAPD analizinin RFLP analizine göre daha ayırt edici bir test olduğu saptandı.

Sonuç olarak; listeriaların, o bölgedeki insan ve hayvanlar için risk faktörü olduğu tespit edildi. Ayrıca sığır çiftliklerinin koyun çiftliklerine oranla daha yüksek bir riske sahip olduğu belirlendi. Elde edilen bulgular, süt ve süt ürünlerinin listeria kontaminasyonunun, bakterilerin hayvanlardan süte geçmesinden daha çok, gıdaların işlenmesi esnasında çevreden kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada listeriaların görülme sıklığı ve buldukları yerler açısından sonbahar ve ilkbahar mevsimlerinde, diğer mevsimlere göre daha fazla oranda izolasyon ve identifikasyonu yapıldı.

Anahtar Kelimeler: listeria, mevsimsel varyasyon, RAPD, RFLP, sığır, koyun, süt, peynir, çevre.

2. ABSTRACT

In this study, listeria prevalence in sheep and cattle feeding Elazığ and it's around investigated in February 2007- January 2008. Raw milk, cheese, water, animal food, feces, bulk milk swabs and environmental samples was collected from both farmhouses. Moreover, seasonal variation in listeria species was researched in those animals. To determinate genetic relationships between *L. monocytogenes* isolates was planned by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

Six cattle and 5 sheep farmhouses was used. Totally 719 samples as 415 bovine samples and as 304 sheep samples were cultured in this study. Total 106 milk (75 bovine, 35 sheep), 57 cheese samples (28 bovine, 29 sheep), 28 samples bulk milk swabs were performed. Furthermore, 72 fecal, 72 animal food, 72 water and 72 environment bovine samples and 60 fecal, 60 animal food, 60 water and 60 environment sheep samples were examined.

Association of Official Agricultural Chemists/International Dairy Federation (AOAC/IDF) method in milk and cheese samples and United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) method in environmental and other samples were followed in this study. Isolated *L. monocytogenes* and other listeria strains were confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and biochemical reactions. Then, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) methods were performed amongst *L. monocytogenes* isolates. Furthermore, seasonal variations in listeria isolates were found out with some differency.

Prevalence of *Listeria* spp. was found 6,4 % in whole samples. Eight of 46 isolates (17,4 %) *L. monocytogenes*, 18 of 46 (39,0 %) *L. innocua*, 5 of 46 (10,8) *L. welshimeri*, 8 of 46 (17,4 %) *L. seeligeri* and 7 of 46 (15,2 %) *L. grayi* were identified. *L. ivanovii* was not isolated in this study. listeria prevalence were found in cattle 9,4% and in sheep 2,4%.

RAPD analyses were performed by two different primers (HLWL74 and HLWL85) and obtained 10 different profiles with 1-4 band patterns. In RFLP analysis by *AluI* and *Tsp509I* restriction endonucleases was obtained 4 different profiles and 2-3 bands patterns. According to obtained results in this study, RAPD analysis was found more discriminative than RFLP.

Consequently, listeria existence in Elazığ and it's around, the people of that region and animals were found to be as a risk factor. Moreover, higher proportion of cattle farms than sheep farms have been identified at risk. Results obtained that listeria that more transmitting to milk and milk products from animals than food during the preparation of environmental exposure is caused by listeria contaminations. Furthermore, seasonal variations indicate that autumn and spring more important than other seasons.

Key words: listeria, seasonal variation, RAPD, RFLP, cattle, sheep, milk, cheese, environment.

3. GİRİŞ

3.1. Tarihçe

Listerialar ilk olarak, Almanya’da 1891 yılında hastaların doku örneklerinden izole edilmiştir. İlk dönemlerde listeriaların tek türü olduğu kabul edilmişti. İsveç’te, 1911 yılında bir tavşanın karaciğerinden, 1917 ve 1920 yıllarında da hastaların omurilik sıvılarından *Listeria monocytogenes* izole edilmiştir. Ancak, bu bakterilerin tam anlamıyla tanınması, Murray, Webb ve Swann tarafından 1926 yılında hamster ve tavşanlarda çıkan bir salgında etkenlerin izole edilmesiyle olmuştur. Murray, Webb ve Swann, buldukları küçük, Gram pozitif çomakçık şeklindeki bakteriye ilk olarak “*Bacterium monocytogenes*” adını vermişlerdir. Listeriosis, bundan bir yıl sonra Almanya’da koyunlarda görülen, ama etkeni izole edilemeyen bir hastalık olarak bildirilmiştir. Pirie, 1927 yılında Güney Afrika’da yaşayan kemirgenlerden bu Gram pozitif basilleri izole ettiğini açıklamış; bulduğu bakteriyi, Cerrah Lord Lister’in anısına “*Listerella hepatolytica*” olarak isimlendirmiştir. Bu bakterinin adı 20. yüzyılın ortalarına doğru, dolaşım sisteminde monositozis yaptığından dolayı “*Listeria monocytogenes*” olarak değiştirilmiştir ve günümüzde de bu isim kullanılmaktadır (101).

Listeria türlerinden *Listeria grayi* 1948’de, *Listeria murrayi* 1966 yılında keşfedilinceye kadar uzunca bir süre *Listeria monocytogenes* bilinen tek tür olarak kalmıştır. İlk insan listeriosis vakası 1936 yılında bildirilmiştir. Bu zamana kadar, listeriaların yalnızca hayvanlarda hastalık yapabildiği görüşü bilim dünyasında hâkimdir. İlk gıda kaynaklı listeriosis vakası ise 1953 yılında bildirilmiş olup, *L. monocytogenes*’in sebep olduğu mastitisli bir ineğin sütünün içilmesi suretiyle

etkenin alınmış olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bu etkenlerin ikiz hamileliği bulunan bir annenin bebeklerinin ölü doğmasına sebep olduğu da bildirilmiştir (27, 43). Bu tarihten başlayarak uzunca bir süre listeriaların önemi araştırmacılar tarafından fark edilememiştir ve mevcut durumu da göz ardı edilmiştir. Kanada'da 1983 yılında kontamine gıdalar vasıtasıyla insanlara bulaşan listeriosis salgınının ortaya çıkması, bilim adamlarının dikkatlerini yeniden listerialara çevirmesine sebep olmuştur (99). Bu salgından sonra, araştırmacıların listerialara olan ilgisi artarak devam etmiştir.

3.2. Taksonomi

Listerialar, ilk keşfedildiklerinden bu yana bilim adamları tarafından pek çok kez başka bir bakteri grubunun alt türü olarak sınıflandırılmışlardır. Taksonomide, listeriaların kendi başlarına bir cins olarak yer alması, 20. yüzyılın son çeyreğinde olmuştur. Taksonomide listerialar, Brochotrix cinsine oldukça yakındır. Son yıllarda yapılan 16S ribozomal RNA çalışmaları listeriaların sınıflandırmada Lactobacilluslar ile Bacilluslar arasındaki yeri işgal ettiğini göstermiştir. Bilim adamları, listeriaların brochotrixler ile birlikte buldukları ve bu şekilde sınıflandırılmaları gerektiği kanaatine varmışlardır (75). Günümüzde taksonomide listeria genusu içerisinde 6 tür bulunmaktadır. Bunlar *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, ve *L. grayi*'dir (92).

Listeria genusunda, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. innocua* patojen türlerdir. İnsan ve hayvanlar için en önemli patojen türü *L. monocytogenes*'dir. *L. ivanovii* ve *L. innocua*'nın hayvanlar için patojen olduğu bildirilmesine rağmen, *L. ivanovii* nadiren insanlarda da hastalık oluşturabilmektedir. *L. grayi*; *L. grayi*

subsp. *murrayi* ve *L. grayi* subsp. *grayi* ve *L. ivanovii* türü de, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ve *L. ivanovii* subsp. *londiniensis* olmak üzere ikişer alt türe sahiptirler (43). *L. monocytogenes*'in, gıda kaynaklı patojen bakteriler arasında da önemli bir yer aldığı bildirilmektedir (75). Listerialar tabiatta bulunmalarından dolayı, süt, gıda ve yem bitkilerine kolaylıkla bulaşabilmektedir. Bu sebeple listeria enfeksiyonlarında bulaşma kaynağının tespitini yapabilmek oldukça güçtür (59).

3.3. Morfoloji

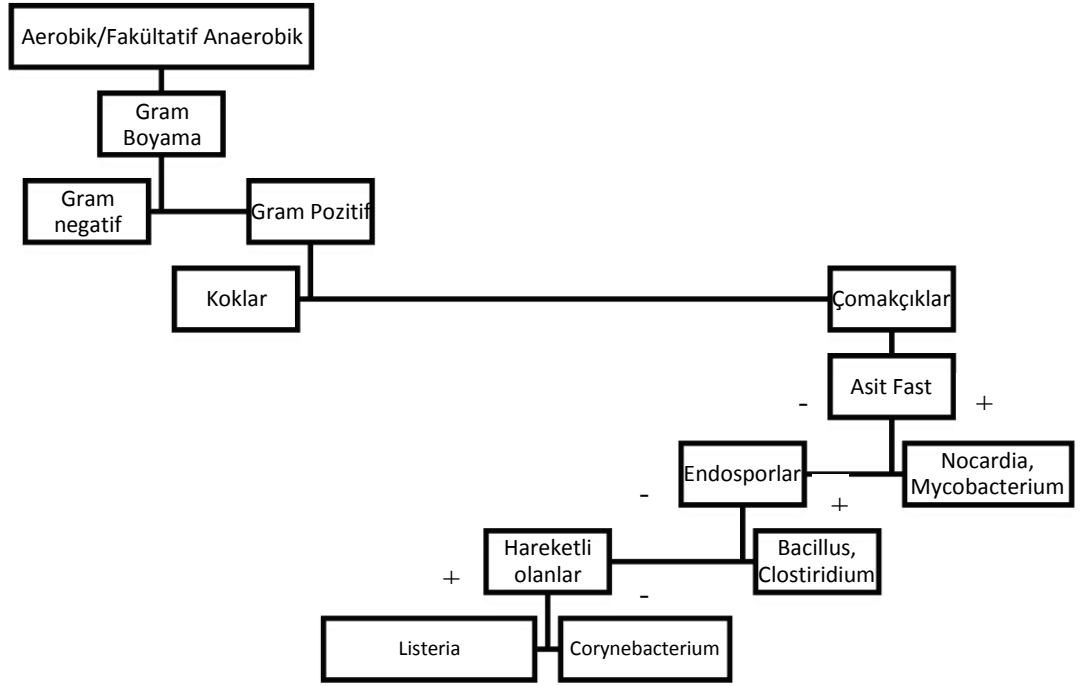
Listerialar, 0.5-2 µm boyunda, 0.4-0.5 µm eninde, Gram pozitif aerob bakterilerdir. Ancak fakültatif anaerobik ortamlarda da üreyebilirler. Mikroskopik görünimleri sporsuz, çomakçık şeklindedir (23, 44). Hareket kabiliyetlerini 20-28°C sıcaklıklarda göstermelerine rağmen, 35-37°C'de hareket yeteneklerini kaybetmektedirler. Taze kültür ortamlarında Gram pozitif olarak görünmelerine rağmen, eskimiş kültürlerde Gram negatif olarak da görünebilmektedirler. Kapsülleri olmamasına rağmen, bazı çalışmalarda mukopolisakkarit bir katmana sahip oldukları bildirilmiştir (10, 13, 58). Psikrotrofik mikroorganizmalar olup, 0°C ile 45°C (optimum 37°C) sıcaklık aralığında çoğalabilmektedirler. Bu bakteriler için optimal su aktivitesi değeri 0.97 dir (40). Listerialar yüksek adaptasyon yeteneklerine sahip olduklarından dolayı, çok değişik ortamlarda yaşayabilmektedirler. Örneğin, yüksek tuz yoğunluklarında (% 10), geniş pH (pH 4.4-9.4) ve sıcaklıklarda hayatta kalabilmektedirler (101).

Listerialar % 0.25 agar, % 8 jelatin, % 1 glikoz içeren yarı katı ortamlarda 37°C de 24 saatte ürerler ve üremeleri yüzeyden aşağıya doğru şemsiye benzeri bir görünüm oluşturur. Listerialar, nutrient agarda 24-48 saatlik inkubasyonlarda, 0.5-1.5 mm çapında, yuvarlak, şeffaf, etrafı tamamen belirgin koloniler

oluştururlar. Tryptic soy agarda (TSA) hem iyi ürer hem de tipik koloniler meydana getirirler. TSA’da 18-24 saatlik listeria kolonilerine stereo mikroskopla 45°’lik açı ile verilen ışıktaki bakıldığında, smooth (S) tipi koloniler, yüzeylerinde çok ince gözenekli yapı ile birlikte karakteristik mavi-yeşil röfle verirler. Normal ışıktaki incelendiğinde mavimsi-gri renkte görünmektedirler. Koyun kanlı agar başta olmak üzere diğer temel besi yerlerinde de kolaylıkla üreyebilirler. Glikoz içeren besi yerlerinde “taze ayran kokusu” na benzer bir koku yayarlar. *L. monocytogenes* suşları penisilin veya glisin içeren ortamlarda ürediklerinde L-tipi koloniler meydana getirirler (101).

3.4. Biyokimyasal Özellikleri

Listeriaların identifikasyonunda Gram boyama, hareket, üreaz, H₂S, indol, oksidaz, Methyl Red/Voges Proskauer (MR/VP), eskülin hidrolizi, katalaz, glikoz, hemoliz, mannitol, xylose, rhamnose ve Christie, Atkins and Munch-Peterson (CAMP) testi kullanılmaktadır. Listerialar biyokimyasal olarak, Gram pozitif, düzgün çomak şeklinde, üreaz, H₂S, indol, oksidaz negatif; methyl red/Voges Proskauer (MR/VP), eskülin hidrolizi, katalaz pozitif; glikoz ve salisinden gaz oluşturmadan asit oluşturan bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Tür düzeyinde ayrımları ise Şekil 1 ve Tablo 1’deki metotlarla ve biyokimyasal testlerle yapılmaktadır (22, 48, 101).



Şekil 1. Listeriaların fenotipik identifikasyonu (Kısaltılarak kullanılmıştır, 48).

Listerialar 20-28°C sıcaklıkta hareketlidirler. Bu hareketliliklerini, oda ısısında inkube edilmiş 8-24 saatlik genç sıvı kültürlerde (tryptone soya yeast extract broth) asılı damla metoduyla veya yarı katı agarda gözlemlemek mümkündür (3).

L. monocytogenes, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* türleri pek çok memeli alyuvar hücrelerini lize ederek, hemoliz oluşturabilirler. Hemolitik aktivite at ya da koyun kanı eklenmiş agarlarda daha iyi görülmektedir. *L. ivanovii* diğerlerine göre daha geniş bir hemoliz alanı oluşturur, bazen çoklu hemoliz alanları da görülebilir. *L. monocytogenes*'in oluşturduğu hemoliz *Streptococcus agalactiae*'nin yaptığı dar alanlı hemolize benzemektedir. Hemoliz bölgesi kolonilerin sınırından çok uzakta değildir. *L. seeligeri* ise daha dar bir hemoliz alanı oluşturmaktadır (101).

Tablo 1. Listeria Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri (59).

Türler	β -	D-	D-	L-	CAMP	
	Hemoliz ^a	Mannitol	Xylose	Rhamnose	<i>S.aureus</i>	<i>R.equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	+	-
<i>L. ivanovii</i> ^b	++	-	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	d ^c	-	-
<i>L. welshimerii</i>	-	-	+	d ^c	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	-	+	-
<i>L. grayi</i> ^d	-	+	-	d ^c	-	-

a: Koyun kanlı agarda hemoliz

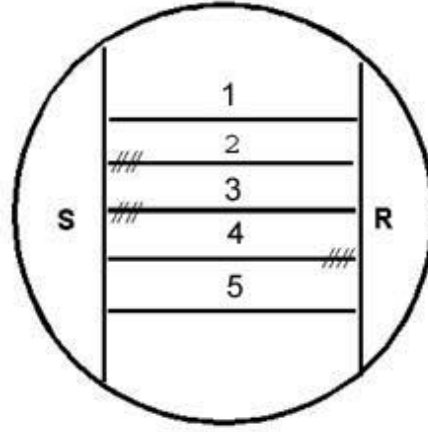
b: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ribozu fermente eder, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* ribozu fermente edemez.

c: değişken reaksiyon

d: *L. grayi* subsp. *murrayi* nitratı indirgemektedir, *L. grayi* subsp. *grayi* nitratı indirgeyemez.

3.4.1. Christie, Atkins, Munch, Peterson (CAMP) Testi

CAMP testi, hemolitik listeriaların yani *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* türlerinin ayırımında kullanılan başlıca testlerdendir. Şekil 2’de görüldüğü gibi β -hemolitik *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* kanlı agara birbirine paralel olacak düz bir çizgi şeklinde ekilir. Şüpheli listeria kültürleri de bu çizgilere dik olacak şekilde, birbirine değmeden tek düz çizgi halinde ekilir ve 35°C de 24-48 saat inkubasyona bırakılır. *L. monocytogenes*, *S. aureus* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur, *R. equi* tarafında herhangi bir hemoliz oluşturmaz. *L. ivanovii*, *R. equi* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur. *L. seeligeri* ise *L. monocytogenes*’e göre daha zayıf bir hemoliz oluşturmaktadır (51, 58).



Şekil 2. Christie, Atkins, Munch–Peterson (CAMP) Testi Örneği (Dikey çizgiler: *S. aureus* (S) ve *R. equi* (R). Küçük yan çizgiler: Hemolizli bölgeler) Yatay çizgiler: 1,5: *Listeria* spp. şüpheli koloni, 2: *L. monocytogenes* (kuvvetli hemoliz), 3: *L. seeligeri* (zayıf hemoliz), 4: *L. ivanovii*.) (59).

3.5. Genetik Özellikler

Günümüzde yapılan moleküler çalışmalarla listeriaların genomunun tüm haritası çıkarılmış ve bu bakterilerle ilgili pek çok yararlı bilgiye ulaşılmıştır. Listeriaların genomlarının büyüklükleri 2.7 ile 3 milyon baz (mb) arasında değişmektedir. Toplam gen dizilimlerinin yaklaşık % 89'u kodlanmaktadır ve bu kodlanan genlerin % 62.5 oranındaki kısmının bir fonksiyonu vardır. *Listeria* suşları ve serotiplerinin kendilerine özgü genleri dışında, *Listeria* genomlarının gen organizasyonlarında ve içeriklerinde yüksek bir benzerlik bulunmaktadır. *Listeria* türleri karşılaştırıldığında en küçük genoma sahip olan *L. welshimeri* (2.7 mb)'dir (54).

Araştırmacılar, son yıllarda, *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin genom özelliklerini ortaya koymuşlar ve bu bakteriler hakkında oldukça ilginç bilgiler elde etmişlerdir. *Listeria* cinsinin başlıca patojen türü olan *L. monocytogenes*'in tüm kromozomu 2.944.528 baz çifti büyüklüğünde ve halka (sirküler)

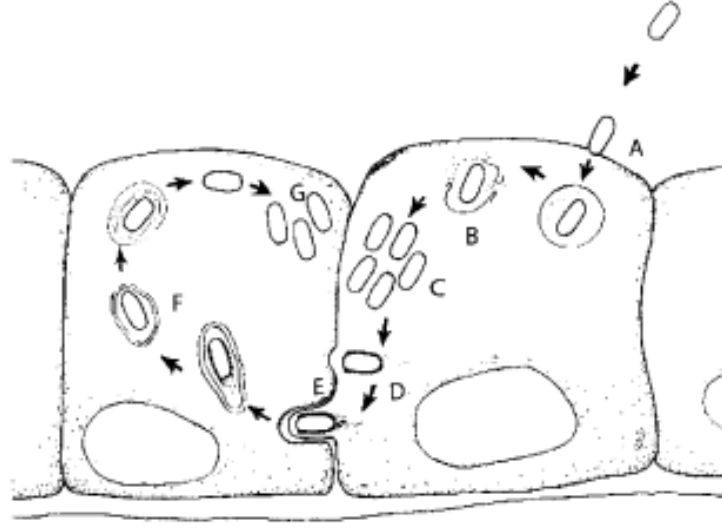
formundadır. *L. innocua* ise 3.011.209 baz çifti büyüklüğünde bir genoma sahiptir. *L. monocytogenes*'in genomunda G+C nükleotidlerinin oranı % 39, *L. innocua*'nın ise % 37'dir. Ayrıca her iki listeria türünde de çevreye adaptasyonu kolaylaştıran, yüzey, sekresyon, transport proteinlerini ve transkripsiyon düzenleyici proteinlerini kodlayan (Tablo 2 ve Şekil 3) çok sayıda gen bulunmaktadır (28, 49, 54, 55).

Tablo 2. *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'nın Moleküler Genel Özellikleri (49).

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Kromozom büyüklüğü	2.944.528	3.011.209
G + C içeriği (%)	39	37
Protein kodlayan G + C içeriği (%)	38	38
Protein kodlayan genlerin toplam sayısı	2853	2973
Protein kodlayan kodonların ortalama büyüklüğü	306	299
rRNA operonlarının sayısı(16S, 23S, 5S)	6	6
tRNA genlerinin sayısı	67	66
Kodlama yüzdesi	90.3	90.3
Profajlar	1 (60 gen, 41.6 kbp)	5 (301 gen, 219.4 kbp)
Plazmid	0	1 (79 gen, 81.9 kbp)
Suş spesifik genlerin sayısı	270 (294 kbp)	149 (195 kbp)
Ortholog genlerin sayısı	2523	2523
Transpozonların Sayısı	1 (Tn916-benzeri)	-

3.6. Virulens Faktörler

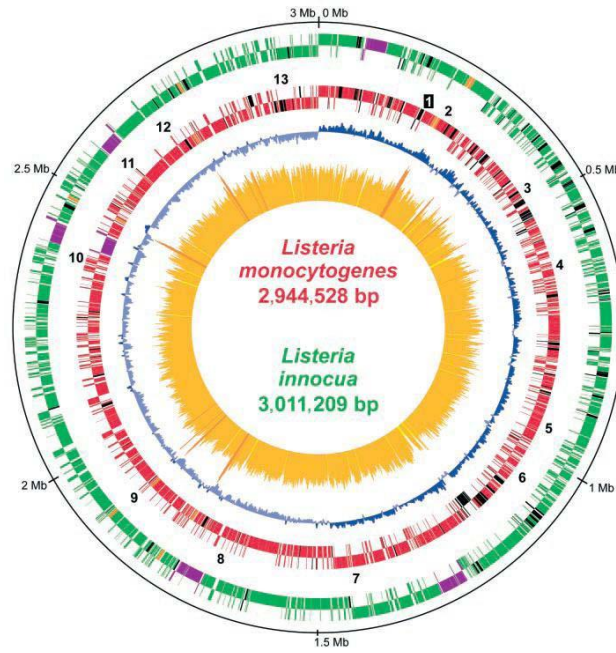
L. monocytogenes, çok özellikleri bulunan ve hücre içinde yaşayan patojen bir bakteridir. Çok çeşitli baskı faktörlerinden kaçış mekanizmalarına sahiptir. Örneğin, bulaşmış olduğu gıdaların konakçısı tarafından alınmasıyla, konakçının sindirim sisteminde proteolitik enzimlerle, asidik bir pH (yaklaşık pH 2), safra tuzları ve konakçının savunma hücrelerine karşı koyabilmektedir. Bütün bu stresten kaçış mekanizmalarının kodları *opuCA*, *lmo1421*, *bsh* gibi virulens genler olarak isimlendirilen bazı genlerde bulunmaktadır (55).



Şekil 3. Listeriaların konakçı hücreleri istila etmelerini, hücre içinde çoğalmalarını ve hücreden hücreye geçişlerini gösteren basitleştirilmiş şekil (A), (B), (C), (D), (E), (F) ve (G) harfleri aşağıdaki paragrafta açıklanmıştır (110).

Şekil 3’de *L. monocytogenes* için hücrelerdeki yaşam döngüsü basitleştirilerek anlatılmıştır. *L. monocytogenes*, hücreleri (fagositler ve diğer tüm doku hücreleri duyarlıdır) *internalin* ismi verilen protein yardımıyla istila eder. *Internalin A* ve *B* (*inl A* ve *inl B*) proteinleri başlangıçta, patojen listeriaların hücelere tutunmasına ve yaşamını sürdürmesine yardımcı olan başlıca proteinlerdir (A). Patojen listeriaların konakçı hücrelerine girdikten sonra ilk yaptıkları iş, tek membranlı vakuollere yerleşmektir. Tek membranlı vakuolleri *listeriolysin O (LLO)* ve *phosphatidylinositol-phospholipase C (PI-PLC)* proteinleri ile lize etmektedirler. *LLO*, *haemolysin (hly)* geni tarafından kodlanan 58 kDa ağırlığında, patojen listeriaların virulensini belirleyen başlıca proteindir. *PI-PLC* ise *plcA* geni tarafından kodlanır ve 33 kDa ağırlığındadır. *plcB* geni tarafından kodlanan *phosphatidylcholine-phospholipase C (PCPLC)* ise *LLO* ile aynı görevi yapmaktadır (B). Listeriaların hücre içinde çoğalabilmesi için

ortalama 1 saatlik süre yeterlidir (C). Çoğaldıktan sonra diğer hücelere geçmek için başka bir proteine ihtiyaç duyar. Bu, *actA* geni tarafından kodlanan ve 67 kDa ağırlığında bir proteindir. Başarılı bir başka hücreye geçişten sonra yeni bir enfeksiyon siklusu başlangıcı *mpl* geni tarafından kodlanan 60 kDa ağırlığındaki *metalloprotease* proteininin PC-PLC yi aktive etmesine bağlıdır (D). Daha sonra diğer konakçı hücreye geçmeye çalışan listerialar invagine olur (E). Konakçı hücreye geçen listeria hücreleri için aynı davranışları gösterir (F ve G). Virülens ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin tümü virulens gen bölgesinde *prfA* tarafından kodlanan ve 27 kDa ağırlığındaki *pleiotropic virulence regulator* proteini tarafından düzenlenir (109, 110).



Şekil 4. *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'nın sirküler genom haritaları (49).

Şekil 4'de dıştaki ilk çember *L. innocua*'yı, içteki çember ise *L. monocytogenes*'i göstermektedir. Yeşil renk: *L. innocua* genlerini, kırmızı renk *L. monocytogenes*, siyah renk: *L. monocytogenes* ya da *L. innocua*'ya ait spesifik

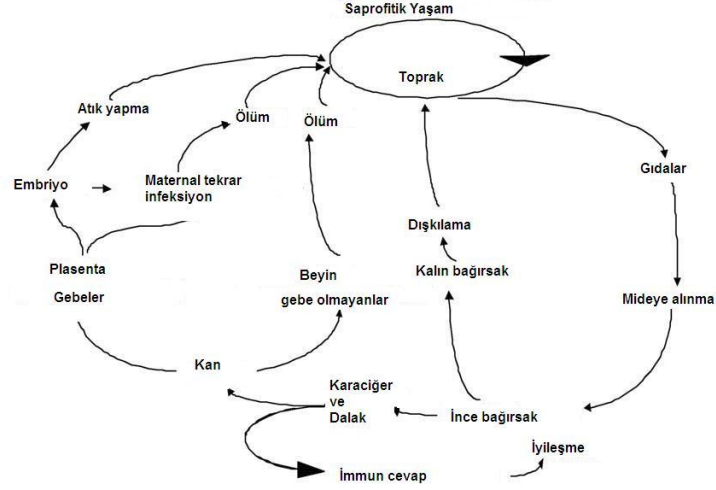
genleri, turuncu renk: rRNA operon bölgelerini, mor renk: profaj genlerini göstermektedir. Sayılar ise bilinen virulens gen pozisyonlarını göstermektedir. (1) virulens gen lokusu (*prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*); (2) *clpC*; (3) *inlAB*; (4) *iap*; (5) *dal*; (6) *clpE*; (7) *lisRK*; (8) *dat*; (9) *inlC*; (10) *arpJ*; (11); *clpP*; (12) *ami*; (13) *byrABC*. İçteki 3. Çember, *L. monocytogenes*'in G/C oranını (G+C/G-C), 4 numaralı çember *L.monocytogenes*'in G+C oranını (< % 32.3 ise açık sarı renkte, % 32.5-43.5 arasında ise sarı renkte, >% 43.5 ise koyu sarı renkte) göstermektedir.

3.7. Epidemiyoloji

Patojen listerialar özellikle de *L. monocytogenes* hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalık oluşturduğundan önemli zoonozlardan biri olarak kabul edilmektedir. Listerialar, doğada (toprak, su, lağım suları, atık sular, gübre), gıdalarda ve hayvan yemlerinde (yem, ot, silaj, sebze, bitki, et, süt ve bunlardan elde edilen gıda ürünlerinde), insanlarda, hayvanlarda ve hayvanların atık yavruları, vajinal akıntıları, fetal membranları, süt, idrar ve gaitalarında, çürümüş sebzelerde ve deniz ürünlerinde bulunurlar (10, 13, 58, 74). Listeriaların saprofit olarak yaşadıkları yerler çürümüş bitki yığınları olup, aynı zamanda onların doğal yaşam çevreleridir. Ayrıca nemli ve kuru çevre şartlarında, toprak ve bitkilerde aylarca canlı kalabilirler (29). Günümüzde listeriaların insanlara ve hayvanlara daha çok gıda kaynaklı olarak bulaştıklarına dair yaygın bir kanı bulunmaktadır. Ancak listerialar, vertikal (anneden çocuğuna), zoonotik (hayvanlardan insana), nosokomial (hastane orjinli) gibi farklı yollardan kolaylıkla bulaşabilmektedir (101).

1980-82 yıllarında ve 1986 yılında Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kurumunun yaptırmış olduğu farklı anketlerde ABD’de yıllık enfeksiyon oranı 1 milyon kişide 7.5 ve yıllık vaka sayısı 425’i ölüm olmak üzere 1850 adet tespit edilmiştir (9). Gıda endüstrisinde yapılan hijyenle ilgili çeşitli düzenlemelerden sonra listeriosis’in insidensi % 4.4’e düşmüştür. Benzer bir düşüş tüketime hazır gıda ve kanatlı endüstrisinde düzenlemelere giden Fransa’da da görülmüştür (6). En yüksek enfeksiyon oranı yeni doğanlar ile 60 yaşından büyüklerde görülmektedir. Tüm vakaların % 30’unu hamile kadınlar ve 10-40 yaş arasındaki insanlar oluşturmaktadır. Ayrıca, hamilelikle ilgili olmayan hastaların % 70’i, yaşlı insanlar, yeni doğan bebekler, bağışıklık sistemini baskılayan ilaç kullananlar veya bu sistemi baskılayan bir hastalığa (AIDS gibi) sahip olanlar listeriosise daha duyarlıdır. Ancak patojen listerialar tüm insanlarda hastalık oluşturabilirler. Hamile kadınlarda, ölü doğumlara, erken doğumlara ya da düşüklere sebep olabilirler (7).

Avrupa Birliği ülkelerinde 2003 yılı verilerine göre yıllık listeria insidensi 1 milyon vakada % 0.3-7.5, Avustralya’da % 3’tür. CDC verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) 1997 yılında gıda kaynaklı 2493 listeriosis vakası görülmüş ve bunlardan 499’u ölümlle sonuçlanmıştır (7, 9). Günümüzde ABD’de Listeriosis, ihbarı mecburi hastalıklar arasında kabul edilmektedir (4).



Şekil 5. Listeriaların Yaşam Döngüsü(86).

Süt, peynir, tereyağı, tütülenmiş balık, tüketime hazır domuz eti, sosis, et, hindi eti gibi gıdaların tüketilmesiyle bakteriyemi ve meningitis ile sonuçlanmış listeria salgınları mevcuttur. Ayrıca yenmeye hazır gıda ürünleri arasında kontaminasyonun en çok olduğu gıda grubunu kanatlı ürünleri oluşturmaktadır (74).

İnsanlara gıdalarla ya da diğer yollarla *L. monocytogenes* bulaşabilir. Diğer yollarla bulaşma anneden çocuğa plasenta ya da doğum kanalı yoluyla olabilir. Yeni doğan bebeklere kontamine olmuş sularda banyo yaptırılması yoluyla da *L. monocytogenes* bulaşabilmektedir. Enfekte hayvanlara doğrudan temas ile çiftçi ve veteriner hekimlerde lokalize kutanöz enfeksiyonlar oluşabilmektedir (85).

Listeriosis genellikle gelişmiş ülkelerde önem kazanmış bir hastalık durumundadır. Listerialar ile ilgili yapılan bilimsel çalışmaların büyük bir bölümü gelişmiş toplumların yaşadığı ülkelerde yapılmaktadır. İlk zamanlar listeriaların buldukları yerlerin tespitine yönelik araştırmalar yapılırken, son yıllarda ise

doğada yaşayan patojen listerialar ile insanlardan izolasyonu yapılan listerialar arasındaki genetik ilişkiler araştırılmaktadır (109).

3.8. Doğal Yaşam Yerleri

Listerialarla ilgili yapılan çalışmaların büyük bölümü (83) gıda, çiftlik ve bunlarla ilişkili yerlerden izolasyonu konularına odaklanmıştır. Bilimsel kaynaklarda listeriaların toprak ve sularda çok uzun süre canlı kalabildiği bildirilmektedir. Son zamanlarda tabiat veya çiftlik dışındaki çevrelerde de insan listeriosis vakalarına rastlandığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda (85) tespit edilen listeria etkenlerinin insanlar için hastalık kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Listeriaların varlığını araştırmaya yönelik ilk çalışmalar, toprak, tarımsal bitkiler ve tarımsal araziler dışındaki çevre üzerine yapılmaktaydı. Welshimer ve Donker'in (113) 1971 yılında yaptığı çalışmada tarımsal araziler dışındaki alanlarda ilkbahar döneminde % 6 oranında *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmektedir. Güney Almanya'da yapılan başka bir çalışmada mısır bitkisinde % 9.7, çimenlerde % 13.3, tarım arazilerinde % 12.5, tarımsal olmayan arazilerde % 44, otlaklarda % 15.5, ormanlarda % 21.3 ve vahşi hayvanların beslendiği bölgelerde % 23.1 oranında *Listeria* spp. tespit edildiği bildirilmiştir (85). Başka bir çalışma ise topraktan hiç *L. monocytogenes* izole edilmediğini bildirmesine rağmen, silaj ile beslenen koyun ve sığırların gezindiği bölgelerdeki topraklardan izole edildiğine, toprak ve bitkilerin *L. monocytogenes* kaynağı olarak hayvanlar için önemine işaret etmiştir (46).

İki yıl süren, tabiat ve şehirsal alanların karşılaştırıldığı bir çalışmada ise *L. monocytogenes*'in şehir alanlarındaki varlığı (% 7.5), tabiattaki varlığından (% 1.4) daha yüksek bulunmuştur (98). Listeriaların doğal yaşam çevresinin tarımsal araziler dışındaki çevre olduğunu bildiren pek çok bilimsel çalışma mevcuttur (46, 83). Çiftliklerin etrafındaki doğal çevrede *L. monocytogenes* prevalansı daha düşük bulunmuştur. Ayrıca *L. seeligeri*, şehir, doğal çevreler ve topraktan sıklıkla izole edilen tür olmuştur. *L. seeligeri* memeliler için patojen olarak bildirilmemiş olsa da, patojen listerialar gibi hemolitik özellik gösterirler ve çevrede hayatta kalmak için aynı virulens genlere sahiptirler (85).

Listeriaların toprakta 295 gün canlı kalabildiğini gösteren çalışmanın yanında, bir diğer çalışmada ise steril veya steril olmayan toprakta (doğal), suda, kış şartlarında doğada -15°C ile 45°C arasında canlı kalabildiği ve çoğalabildiği bildirilmiştir. Örneğin, 10⁵ kob/ml listeria bakterisi verilmiş steril bir toprakta etkenin 154 gün hayatta kalabildiği vurgulanmıştır (85).

İnsanlar için patojen tür olduğunun kanıtlanmasından beri çok farklı çevrelerden *L. monocytogenes* izole edildiği bildirilmiştir. Ancak günümüzde yapılan çalışmalar (32), *L. monocytogenes*'in şehirsal alanlarda kendine yaşama alanları bulunduğunu ve insanlarda listeriosise sebep olduğunu göstermektedir. Doğal çevrelerden izole edilen patojen *L. monocytogenes* suşlarının çoğunluğunun (% 90) serotip II olduğunu göstermiştir. İnsanlarda hastalık yapan *L. monocytogenes* serotipleri arasında, serotip II'nin daha az öneme sahip olduğu açıktır.

3.9. Tarımsal Alanlar

Hayvanlarda ilk listeria izolasyonundan bu yana, pek çok kez evcil ve vahşi hayvanlardan *Listeria* spp. izole edildiği bildirilmiştir (56). Bu hayvanlar çoğunlukla sığırlar, koyunlar ve keçiler yani çiftlik ruminantlarıdır. Bu sebeple listerialar hakkında edinilmiş bilgilerin büyük kısmı ruminantlar ve ruminant çiftliklerinde listeriaların ekolojisine ve varlığına dayalı olmaktadır. *L. monocytogenes*'in prevalansı ruminantlarda ve ruminant çiftliklerinde değişiklik göstermesine rağmen, en yüksek prevalans silaj ile beslenen sığırlarda görülmektedir. Çiftlik çevreleri ve fekal materyal bulaşmış silajla beslenen hayvanlarda bu oran % 20 olup ortalama değerlerin üzerindedir. Ayrıca insan hastalıklarıyla bağlantıları bulunan *L. monocytogenes* alt tipleri de bu oranın içindedir. Çiftlik çevreleri ve çiftlik hayvanları bu sebeplerden dolayı *L. monocytogenes* için önemli bir kaynak ve potansiyel bir rezervuar olabilir (83).

Patojen listeriaların silaj yemlerindeki varlığı ve ruminantların bulunduğu çevredeki fekal bulaşması, hayvanlar arasında ve çiftlik çevresinde yaşayan insanlara bulaşma için en önemli sebep olarak gösterilmektedir (44). Patojen listerialar fekal olarak kolaylıkla bitkilere ve bitkilerin bulunduğu çevreye bulaşabilir ve bu bitkiler hayvan yemi ya da insan gıdası olarak tüketilebilir. Ruminantların yetiştirildiği çiftliklerde fekal bulaşmanın prevalansının % 2-3'lerden % 50'lere kadar ve silajla beslemenin yapıldığı çiftliklerde ise bu rakamların daha yükseklere çıkabildiğini gösteren pek çok çalışma bildirilmiştir (61, 83, 107).

Herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen pek çok sığırın dışkısında listerialara, özellikle de *L. monocytogenes* türüne rastlanabilir (74). Öte yandan

küçük ruminantların dışkılarında genellikle daha az oranda listeria bulunur ve silaj yemleriyle beslendiklerinde patojen listerialara maruz kalırlar. Silaj yemleriyle beslenen sığırlar üzerinde yapılan bir çalışmada (46), sığırlardan toplanan dışkı örnekleri incelenmiş ve en düşük 5×10^2 adet *L. monocytogenes* bulunduğu bildirilmiştir. *L. monocytogenes* için fekal bulaşma oral yolla olmaktadır ve bu bulaşmayı hayvanın sağlık durumu, gıda değişiklikleri, transport veya immunolojik değişiklikler ve benzeri durumlar etkilemektedir.

İsveç'te 2003 yılında *L. monocytogenes*'in silajlarda yaşama kabiliyetinin ölçüldüğü bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *L. monocytogenes* bakterilerinin $\text{pH} \leq 4.9$ dan daha düşük pH'larda 30 günden fazla yaşayabildiği bildirilmiştir. Büyük miktarlardaki silaj yığınlarının ise *L. monocytogenes* için daha uygun yaşam ortamını sağladığı bildirilmiştir. Listeriaların silajlarda yaşamasını önlemek için silajların 30 günden fazla fermentasyona bırakılması gerektiği tespit edilmiştir (88).

İnsan listeriosislerinde olduğu gibi, hayvan listeriosis vakalarında da yem kaynaklı, özellikle silaj yapılmış yemlerin tüketimine, kısmen de doğru bir şekilde fermente edilmemiş yemlere bağlı bir hastalık durumu mevcuttur. Silaj ile besleme ve fekal yolla bulaşan *L. monocytogenes*, ruminantlarda listeriosis hastalığına sebep olan yüksek risk faktörleridir (83). Ruminantların beslenmesinde silaj yemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Eğer doğru bir şekilde fermentasyon gerçekleşmişse, silaj yemlerinde patojen listeriaları ve diğer mikroorganizmaları inhibe etmeye yardımcı olan bir pH ($\leq \text{pH} 4.5$) vardır. Doğru bir fermentasyon yapılmamış silajlarda pH yaklaşık ≥ 5.5 'tir. Bu ortamda kolaylıkla patojenler ve çürüme bakterileri çoğalabilir. Silaj yapılmadan önce

mısır tarlaları, vahşi hayvanlar, çiftlik hayvanları, fekal bulaşma gibi pek çok vasıta ile patojen listerialar ile bulaşmış olabilir. Bu şekilde herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın mısırlardan yapılan silajda doğru bir fermentasyon oluşturulmadığı takdirde, patojen listerialar yaygın olarak bulunabilir. Ruminantlarda görülen listerial hastalıkların en önemli kaynağının silaj yemleri olduğunu gösteren çalışmalar vardır (61, 85).

Ruminantlar dışında pek çok hayvandan veya tarım arazileri dışındaki çevrelerde yaşayan hayvan türlerinden de listerialar izole edilmiştir. Listeriaların izole edildiği hayvanlar arasında kuş, domuz, at, kümes hayvanları ve diğer evcil hayvanlar, balıklar bulunmaktadır (52, 56, 112, 115).

Ruminant ya da diğer çiftlik hayvanlarının yetiştirildiği çiftliklerde listerialar yaygın olarak yaşamaktadır. Gıda üretim-işleme faaliyetleri de genelde bu yerlerde yapıldığından dolayı, buralarda hazırlanmış gıdalara bulaşma, bu gıdaların da insanlar tarafından tüketilmesiyle, patojen listeriaların insanlara bulaşması daha kolay olmaktadır. Örneğin *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş çiğ süt tüketilmesiyle, etken insanlara bulaşabilir. Çoğu listeriosis vakasında, tarımsal çevreden kaynaklanan bulaşmadan daha çok, çiğ olarak gıdaların tüketilmesinden bulaştığı olduğu bildirilmiştir. Patojen listeriaların prevalansı çiğ gıdalarda % 1.1-85.7 oranlarında bulunabilmektedir. Ayrıca çiğ sebzelerin tüketilmesiyle insanlara bulaşan patojen listeriaların da büyük bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (85).

Patojen listeriaların tarımsal alanlarda yaşama süreleri 6 yıla kadar çıkabilmektedir. Ayrıca yaşam süreleri hayvan dışıklarında ve tarım yapılan

topraklarda daha da uzamaktadır. Örneğin, *L. monocytogenes* hayvan dışkısında 182- 2190 güne kadar yaşayabilmektedir (64, 81).

İnsanlardan izole edilen *L. monocytogenes* izolatları ile topraktan, tarımsal alanlardan, hayvan dışkılarından izole edilen *L. monocytogenes* izolatları arasında bir ilişki olduğunu, dolayısıyla tarımsal çevrenin ve çiftliklerin insan ve hayvanlardaki listeriosis ile bir bağı olduğunu gösteren pek çok çalışma yayınlanmıştır (25, 83, 97).

3.10. Gıdaların Bulunduğu Çevreler ve Gıdalar Arasındaki İlişkiler

Listeriaların gıdalarda, özellikle hayvansal gıdalar ve yenmeye hazır gıdalarda bulunduğunu gösteren pek çok araştırma bulunmaktadır (44, 85, 104). Günümüzde ise gıdalardaki listeriaların bulaşma kaynağını ve hangi *L. monocytogenes* alt tiplerin olduğunu tespit etmeye yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Ek olarak, 2004 yılında yapılan ve 1000 adet insan ve gıda orijinli *L. monocytogenes* izolatlarının ribotiplendirildiği çalışmada, *L. monocytogenes* 1/2b ve 4b prevalanslarının yüksek olduğu gösterilmiştir (104). Gıda izolatları ile insanlardan izole edilen izolatlar arasında virulens genlere bakılarak yapılan (*inlA*, *iap*, *hly*, *prfA*) çalışmalarda ve tiplendirmelerde farklı *L. monocytogenes* alt tiplerinin insanlardaki listeriosisten sorumlu olduğu bildirilmiştir. Gıda işleme ve perakende satış yapılan çevrelerden *L. monocytogenes*'in izole edildiği tiplendirme çalışmalarında insanlardaki izolatlarla bu çevrelerdeki izolatların birbirleriyle ilişkilerinin bulunduğu belirtilmiştir (85)

3.11. Hayvanlarda Listerialar

Hayvanlarda listeriosis çok çeşitli klinik formlarda görülmekte ya da semptomlarla seyretmektedir. *L. monocytogenes* koyun, keçi ve sığırlarda ensefalitis, abortus, septisemi, endoftalmitis, sığırlarda mastitis, at, kedi ve köpeklerde abortus ve nadiren de olsa ensefalitis, domuzlarda septisemi, ensefalitis ve daha az olarak abortus, kuşlarda septisemi, *L. ivanovii* koyun ve sığırlarda abortus, *L. innocua* ise koyunlarda meningoensefalitis yapmaktadır. Kuşlar genellikle subklinik taşıyıcılar olmasına rağmen, sporadik vakalar halinde septisemi ve meningoensefalitis rapor edilmiştir. Avian listeriosis, salmonellosis veya viral hastalıkların sonucunda ikincil olarak ortaya çıkabilir (10).

Listeriosis, hayvanlarda ensefalitik veya septisemik formu seyredebilir. Septisemik form, pek yaygın olmamakla beraber, çoğunlukla yeni doğan hayvanlarda görülmektedir. Depresyon, iştahsızlık, ateş ve ölüm görülmektedir. Ensefalitik form ise genellikle “tek yöne doğru dönme” ile karakterize bir hastalık oluşturmaktadır. Bu sebeple ülkemizde buna “Koyunların Dönme Hastalığı” da denmektedir. Bu hastalıkta, depresyon, iştahsızlık, başın tek yöne sürekli dönmesi, tek taraflı yüz felci, iki yönlü keratokonjunktivitis gibi belirtiler görülmektedir. Yavru atma genellikle gebeliğin son döneminde yani, sığırlarda 7. aydan sonra, koyunlarda ise 12. haftadan sonra görülmektedir (13, 89).

Çiftlik hayvanlarından özellikle ruminantlar, listeriaların kırsal çevredeki fekal-oral siklusunda (dışkıyla kontamine olan gıdaların ağız yoluyla alınması) anahtar rol oynamaktadırlar (109). İyi fermente edilmemiş hayvan yemlerindeki patojen listeriaların varlığı uzun zamanlardan beri bilindiğinden dolayı, silajlı yem ürünleriyle hayvanları beslemek önemli düzeyde risk oluşturmaktadır (37). Ayrıca

yapılan çalışmalarda (83), sığır çiftliklerinin insan veya hayvanlardaki listeriaların çevreye yayılmasında ve hastalığın ortaya çıkmasında, küçük ruminantlara göre daha etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir.

Silajlı yemlerle beslenen ruminantların çevresinde listeriaların yüksek sıklıkta bulunması, bu etkenin hayvanlara geçişini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca bu etkenlerin ruminantlarda yüksek bir prevalansta bulunmalarının yanında, konakçı hücrelerinin duyarlılığının da bulaşmada etkili bir faktör olduğu bildirilmektedir (83). Bu duruma ek olarak ruminantlardaki listeriosis, çok aşırı miktarlarda patojen listeriaların alınması veya sığırlardaki bağışıklık sisteminin baskılanmasından ya da her iki sebebin birden oluşmasından kaynaklanmaktadır. Çevrede patojen listerialar oldukça fazla sayıda bulunmasına rağmen klinik belirtiler az görülmektedir (91).

Monfort ve ark. (80), kabuklu deniz hayvanlarında % 53; Barbuddhea ve ark. (17), Hindistan'da toplam 201 adet koyun ve keçilere ait süt ve et örneklerinde % 17.64; Mieltinen ve ark. (79) gökkuşağı alabalıklarında ise % 35; Kalorey ve ark. (66) sığır sütlerinde % 6.75 oranında *Listeria* spp. varlığını bildirmiştir. Türkiye'de de hayvanlarda listeriaların varlığı bilim adamları tarafından bildirilmiştir. Şahin ve ark. (95), Kars ve bölgesindeki koyunlarda görülen abortlardan *L. ivanovii* izole etmişlerdir. Aygün ve ark. (14), Hatay bölgesinde 157 adet koyun sütü örneğinden % 8.23 oranında *Listeria* spp. izole ettiklerini bildirmiştir.

Silajlı yemlerle beslenmeden dolayı ruminantların rumen ekosisteminde patojenlerle konakçı arasında bir denge kurulmuş olabilir (61). Ancak konakçının sürekli ya da sıklıkla patojen listerialara maruz kalması sonucunda, konakçıda bir

bağışıklık gelişebilir. Bu sebeple mevsimsel olarak silajla beslenen ruminantlarda, muhtemelen de silajlı yemler olmadan yapılan besleme süresince bağışıklıktaki azalmadan dolayı şiddetli bir listeriosis kaçınılmazdır. Tarımsal çevrelerde silajla beslenen ruminantlardan izole edilen insan kaynaklı *L. monocytogenes* için, silaj önemli bir kaynaktır, fakat tamamıyla listeriosis enfeksiyonundan sorumlu olmayabilirler. Çiftlik kaynaklı patojen listeria suşlarının nadiren insan listerial hastalıkları ve gıda kontaminasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Yenmeye hazır yiyecekler ve ekseri hazırlanma insanlardaki listerial hastalıkları ve gıda kontaminasyonlarından sorumludurlar (83).

3.12. Türkiye’de Listeriosis

Türkiye’de ilk listeriosis vakası Özcebe tarafından 1945’te bildirilmiş ve Bandırma Merinos Çiftliği koyunlarının beyinlerinden yaptığı ekimlerde *L. monocytogenes*’i tanımlamıştır. Bu yıldan sonra 1952 yılında Pendik Bakteriyoloji Enstitüsünde, İnanlı İnekhanesinde koyunlarda, danalarda ve daha sonra da bir sığırdada meydana gelen atık vakasında listeriosis hastalığı teşhis edilmiştir. Ancak 1961 yılında Türkiye’de FAO’nun düzenlediği “Emerging Diseases” isimli kongre raporunda, ülkemizde listeriosisin sporadik vakalar halinde seyrettiğinden önemli bir hastalık olmadığı bildirilmiştir (36). Bu tarihten sonra listeriosis dünya ile paralellik arz ederek önemini ülkemizde kaybetmiş ve 1980’lere kadar pek üzerinde durulan bir hastalık olmamıştır.

Türkiye’de 1988 yılında beyaz peynirler üzerine yapılmış bir çalışmada, 323 peynir örneğinin % 5.8’inin listerialar ile kontamine olduğunu ve bunun % 3.4’ünün *L. monocytogenes* olduğunu tespit etmişlerdir (105).

Elazığ ve çevresindeki 14 koyun ve 12 keçi sürüsünde, sağlıklı ve abort yapmış hayvanlardan toplanan çiğ süt örneklerinde listeriaların varlığı araştırılmış ve incelenen 300 örneğin 5'inde *Listeria* spp., izole edilmiş, *L. monocytogenes* izole edilmemiştir. Dolayısıyla bölge için listeriaların ciddi bir hastalık sorunu oluşturmayacağı kanısına varılmıştır (42).

1998 yılında çiğ süt örnekleri üzerine yapılan mevsimsel bir çalışmada ise 211 örnekten ikisinde biri kış mevsiminde, diğeri ise yaz mevsiminde *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmıştır ve izolasyonu yapılan *L. monocytogenes* izolatlarının büyük şehir ve çevresinden elde edildiği vurgulanmıştır (108).

Elazığ ve civarındaki illerde imal edilen taze beyaz peynir, tulum peyniri, tereyağı ve çökelekte listeria türlerinin prevalansının tespitinin amaçlandığı çalışmada, 51 taze Şavak tipi beyaz peynir, 52 tulum peyniri, 50 tereyağı ve 10 çökelek olmak üzere toplam 163 örnek incelenmiştir. Bu örneklerin kültürü neticesinde, bir adet taze beyaz peynirden *L. monocytogenes* ve bir adet tuzlu tereyağından ise *L. innocua* izole edilirken, süt ürünlerinde diğeri listeria türleri bulunmamıştır. Türkiye'de tereyağında *Listeria* spp. izolasyonu bildirilen ilk çalışma olması yanında listeria türlerinin gerek hayvanların sütünde ve gerekse çevrede pek yaygın olarak bulunmadığı, ancak bunu ispatlamak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (35). Erzurum ilinde beyaz peynirler ve yöresel peynir örnekleri üzerinde yapılan çalışmada listerialar aranmış ve beyaz peynirlerde % 2.94, civil peynir örneklerinde ise % 6.25 listeria prevalansı bulunmuştur (67).

Keban baraj gölündeki balıklarda *L. monocytogenes*'in varlığı ve izole edilen suşların moleküler tiplendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada; 150 balık

örneği incelenmiştir. İncelenen balık bağırsaklarından 10 adet (% 6.6) *L. monocytogenes* izole ve identifiye edilmiş ve çalışma sonunda yapılan tiplendirme sonuçlarına göre izolatların farklı kaynaklardan balıklara bulaşmış olabilecekleri bu balıkların avlanıp yenmesi halinde insanlarda ciddi sağlık sorunlara yol açabileceği bildirilmiştir (41).

Listeriaların çeşitli hayvanlardaki varlığı üzerine çeşitli araştırmalar ülkemizde de yapılmaktadır. Örneğin, atlar üzerine yapılan ve listeriosis varlığı serolojik yöntemler kullanılarak araştırılan çalışmada, toplanmış olan 203 adet at kan serumundan 176 'sında (% 86.69) oldukça yüksek bir oranda seropozitiflik tespit edilmiştir (102). Van yöresinde klinik olarak sağlıklı sokak köpeklerinde listeriaların prevalansını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada, toplam 90 adet klinik olarak sağlıklı sokak kpeğinden alınan kan serumlarının 36 (% 40) adedi seropozitif bulunmuştur (30).

Kars ilinde listeriaların yaygınlığının araştırıldığı 150 süt ve 11 silaj rneği üzerinde yapılan çalışmada, süt rneklelerinde 14 adet (% 0.93) *Listeria* spp. izole edilmiştir. Üç adet (% 2) süt ve bir adet silaj örneğinden (% 9) *L. monocytogenes* izole edilmiş ve yöre hayvancılığında silajın listeriosis yönünden bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (12).

Elazığ bölgesindeki yerel kesimhanelerde 2003 yılında yapılan bir çalışmada kesilen 206 piliç, 170 koyun ve 130 sığıra ait fekal rneklelerde *L. monocytogenes*'in prevalansı piliçlerde % 4.36, koyunlarda % 0.58 ve sığırlarda % 1.53 olarak tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 12 adet *L. monocytogenes* izolatının 7 adedi 1 serotipine, 5 adedi 4 serotipine ait bulunmuş ve bu izolatların gıda kaynaklı listeriosise sebep olabileceği bildirilmiştir (65).

Süt ve süt ürünlerinde listeriosis hastalığının varlığı üzerine Van ilinde yapılan bir çalışmada, et ve et ürünlerinde listeria suşlarının ve bunların içinde *L. monocytogenes* bulunma sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, et, işlenmiş ve çeşitli katkı maddesi içeren et ürünleri incelenmiştir. Listerialar tarafından oluşturulan kontaminasyonun özellikle kıymalarda fazla miktarlara ulaştıkları, çeşitli katkı maddelerini ihtiva eden, aynı zamanda özellikle fabrikasyon üretimi olabilen et ürünlerinin daha az kontamine olduğu tespit edilmiştir (21). Salam, sucuk ve sosisler üzerine yapılmış olan, benzer bir çalışmada 2007 yılında aynı ilde *L. monocytogenes*'in prevalansı salamlarda % 10, sosislerde % 30 tespit edilmiş ve vakumlu ürünlerde hiç *L. monocytogenes* tespit edilememiştir (96).

Listeriaların yayılmasında sığırların önemini ortaya koymaya yönelik yapılan çalışmada, süt sığırcılığı yapılan özel bir işletmeye ait sağlıklı sığırlardan Ekim, Ocak, Nisan, Temmuz aylarında alınan dışkı örneklerinden soğuk ve yağışlı mevsimlerde daha yüksek bir *Listeria* spp. izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirilerek insan ve hayvan sağlığı açısından potansiyel bir tehlike olabileceği saptanmıştır (1).

Tavuk karkası ve bağırsak içeriklerinden *Listeria* spp. izolasyonu ve identifikasyonunun yapıldığı bir çalışmada, karkas örneklerinde % 76 oranında *Listeria* spp. izole edilmiş ve bunların % 46'sının *L. monocytogenes* olarak identifiye edildiği bildirilmiştir. Bağırsak içeriği örneklerinden ise % 12 oranında *Listeria* spp. izole edilmiş ve bunların % 5'inin *L. monocytogenes* olarak identifiye edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, Türkiye'de kanatlı ürünleri arasındaki listeriaların yüksek prevalansına dikkat çekilmiştir (87).

3.13. İzolasyon

Günümüzde listeriaların izolasyonu yeni metotların geliştirilmesiyle oldukça kolaylaşmıştır. İzolasyonda dikkat edilmesi gereken durum listeriaların izole edileceği ortam veya örneklerdir. Listerialar steril ortamlardan alınan numunelerden örneğin; kan, beyin omurilik sıvısı, amniyotik sıvı, plasenta ya da kulak svabları vb. doğrudan selektif besi yerlerine ekimi yapılarak kültürü yapılabilir. Listeriaların ekildikleri ortama alışabilmeleri için bir gece 35°C de inkube edilmeleri gerekmektedir. Ancak dışkı, çevresel örnekler ve gıda örnekleri izolasyon için kullanılacak olursa, selektif zenginleştirmeye gerek duyulmaktadır. Eğer çok farklı mikroorganizmaların bulunduğu bir örnekle çalışılıyorsa, diğer bakterileri elimine etmek için immunomagnetik seperasyon da yapılabilir (48).

Listeriaların izolasyonunda iki anahtar konu vardır. Bunlardan biri zaman, diğeri ise zarar görmüş, zedelenmiş listeria hücrelerinin geri kazanılması konusudur. Gıdalardan ve diğer materyallerden listeriaların izolasyonunda, önceki zamanlarda bu bakterilerin düşük sıcaklıklardaki üreme kabiliyetlerinden yararlanılıyordu. Ancak bu yöntemle listeriaların izolasyonu haftalar almakta ve de zarar görmüş listeria hücreleri ortamın stresinden dolayı geri kazanılamamaktadır. Ayrıca izolasyonda yarışmacı bakterilere, mantar vb. ajanlara karşı listerialara bir avantaj sağlamak için acrifilavin ve nalidixic asit gibi bazı kimyasallar tüm standart metotlarda kullanılmaktadır (48).

Pek çok farklı metotlarla listeria izolasyonu yapmak mümkündür. Ancak dünya çapında kabul görmüş ve tercih edilen metotlar; bütün gıda örneklerinden izolasyonlarda "Food and Drugs Administration-Bacteriological and Analytical Method (FDA-BAM)" ve "International Standards of Organization (ISO) 11290,

“United States of Department of Agriculture (USDA)”, Food Safety and Inspection Service (FSIS) özelleştirilmiş gıdalarda, yumurta ve çevre örneklerinde, “Association of Analytical Chemists/The International Dairy Federation (AOAC/IDF)” metodlarıdır.

3.13.1. FDA BAM ve ISO 11290

FDA BAM, içerisinde yalnızca bir zenginleştirme basamağı içeren bir metottur. Bu zenginleştirme basamağında acrifilavin, nalidixic asit cycloheximide selektif ajanları içeren Listeria Enrichment Broth (LEB) kullanılır. LEB’de 30°C de 48 saat inkübe edilir ve ardından Oxford, PALCAM, MOX gibi selektif listeria agara ekim yapılır (59, 100).

ISO 11290 metodu ise iki aşamalı zenginleştirme basamağı içermektedir. İlk aşama zenginleştirmede Half Fraser Broth (Half FB) kullanılır. Half FB’de 24 saat 30°C de inkübe edilir. İkinci aşamada zenginleştirme için Fraser Broth (FB) kullanılır. FB, acrifilavin ve nalidixic asit kimyasal ajanlarına ilaveten β -D-glukozidaz aktivitesini ölçmek için eskülin de içerir. FB’de 36-48 saat 37°C de inkubasyon yapılır. Daha sonra Oxford ya da PALCAM agara geçilir (59, 100).

Listeriaların izolasyonunda selektif kimyasal ajanların kullanılması ne kadar yararlı ise de, bazı bilimsel makalelerde bu ajanların listeria hücrelerine de zarar verdiği ve listeria izolasyonunda başarısızlıklara sebep olduğu bildirilmiştir (59, 101). Bu iki metot da bu dezavantajlarını farklı yöntemlerle aşmaya çalışmaktadır. FDA BAM metodu zenginleştirmede inkubasyondan 4 saat sonra selektif ajanların eklenmesini, ISO 11290’da ise birinci zenginleştirmede selektif ajanların yoğunluğunun yarıya indirilmesini benimsemiştir (59, 100).

3.13.2. USDA/FSIS ve AOAC/IDF

USDA'nın metodu sıklıkla et, yumurta, kanatlı ve çevresel örneklerden listeria izolasyonunda kullanılmaktadır. Bu metot iki zenginleştirme aşaması içermektedir. İlk zenginleştirme adımında acrifilavin ve nalidixic asit içeren University of Vermont Medium (UVM) kullanılır. UVM'de 30°C de 24-36 saat inkübe edilir. İkinci adımında acrifilavin, nalidixic asit ve eskülin içeren FB kullanılır. FB'de 37°C de 24-36 saat inkubasyon yapılır. Daha sonraki aşamada moxalactam ve colistin sulphate içeren Modified Oxford (MOX) agara ekim yapılır (5, 8).

Süt ve ürünlerinden listeria izolasyonunda tercih edilen metot ise AOAC/IDF metodudur. Bu metot bir zenginleştirme basamağı içermektedir. Acrifilavin ve nalidixic asit içeren LEB besiyerinde 36-48 saat 30°C de inkübe edilir ve ardından Oxford agara geçilir (5, 8).

3.13.3. Kromojenik Besi Yerleri

Listeriaların izolasyon ve identifikasyon sürelerinin uzunluğu ve güçlüğü sebebiyle besi yeri üreten firmaları; "RAPID'L.MONO, ALOA, BCM *Listeria monocytogenes*" gibi isimlere sahip kromojenik besi yerlerini üretmiştir. Kromojenik besi yerlerinin ortak özellikleri kısa süre içinde, genellikle 24-48 saat içinde *Listeria* spp. veya *L. monocytogenes* için hızlı, spesifik identifikasyon imkanı vermeleridir. Kromojenik besi yerlerinin, standart besi yerlerine göre izolasyon ve identifikasyon performanslarının daha iyi olduğu ve daha hızlı sonuca gidildiği pek çok literatürde bildirilmiştir (18, 50, 57, 63, 90). Ticari

firmaların ürettikleri kromojenik agarlar ile listeriaların izolasyonunda kullanılan agarların bir karşılaştırılması Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Listeria İzolasyonunda Kullanılan Kromojenik Besi Yerleri (90)

Besiyesi	Aranan madde		Koloni rengi	
	B-D-gluctosidaz	PI-PLC	Diğer listerialar	<i>L.monocytogenes/ L.ivanovii</i>
PALCAM;- OXFORD, LPM;-MOX	Esculin	-	Gri, etrafı kahverengi-siyah	Gri, etrafı kahverengi, siyah
Harlequin™ Listeria (Lab M)	CHE-β-D-glucopyranoside	-	siyah	Siyah
BCM Listeria monocytogenes (Biosynth)		5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-myoinositol-1-phosphate (X-IP)	beyaz	mavi-türkuaz
Rapid’L. mono (Bio-Rad)		X-IP	beyaz	<i>L. monocytogenes</i> : beyaz, <i>L. ivanovii</i> : sarı halkalı mavi-yeşil
LIMONO-Ident-Agar (Heipha)		X-IP	beyaz	Etrafında beyaz kalıntılarla mavi-türkuaz
ALOA (AES, Biolife)	5-Bromo-4-chloro	L-a-Phosphatidyl	mavi-türkuaz	Etrafında beyaz kalıntılarla mavi-türkuaz
CHROMagark Listeria (CHROMagarkBBL™) CHROMagarkListeria (BD) OCLA (Oxoid)	3-indoxyl-h-dglucopyranoside	inositol	mavi-türkuaz	Etrafında beyaz kalıntılarla mavi-türkuaz

3.14. Monoklonal Antikorlar ile Listeriaların Teşhisi

Listerialara spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak gıda örneklerinden hızlı tarama metoduyla teşhisi yapılabilmektedir. Bu monoklonal antikorları ticari olarak bulmak mümkündür. Örneğin; “Assurance Listeria EIA-BioControl Systems, Inc.” kiti ile çeşitli gıda örneklerinde *Listeria* spp. aranabilir. “Vidas LMO-bioMerieux” ticari kiti ile gıdalarda *L. monocytogenes*, “TECRA Listeria Visual Immuno Assay-TECRA International” kiti ile gıda ve çevresel örneklerde *Listeria* spp. taranabilir (48).

3.15. Moleküler Yöntemler

Günümüzde moleküler tekniklerle listeriaların identifikasyonu gittikçe popüler bir konu olmaktadır. Bunun en önemli sebebi, moleküler yöntemlerin son derece doğru, hızlı, duyarlı ve spesifik olmasıdır. Moleküler teknikler arasında DNA hibridizasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) diğerlerine göre ön plana çıkmaktadır.

3.15.1. DNA Hibridizasyonu

Gıdalarda listeriaların aranmasında kullanılan en basit moleküler yöntemdir. Kimyasal bir ışık veren DNA problrarı ile ilk izolasyon agarlarından *L. monocytogenes* kolonilerinin tespiti mümkündür. Radyoaktif özelliğe sahip bir maddenin problrarı ile hedef DNA üzerindeki kendine özgü bölgesine bağlanır. Serbest kalınca radyoaktif madde floresan ışık vermeye başlar ve bu floresanın ölçülmesiyle teşhis yapılır. Yüksek bir spesifiteye sahip bu metot ile 30 dakika içinde sonuç almak mümkündür. Elde edilen sonuçlar oldukça güvenilirdir. Bu metotların dezavantajı ise, tipik olmayan *L. monocytogenes* sonuçlarında son identifikasyon için diğer moleküler analizlerden biriyle doğrulama yapılmasını gerektirmesidir (48).

3.15.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bilim dünyası PCR ile tanıştığında beri, PCR'nin bütün moleküler uygulamalara çok büyük etkisi olmuştur. Listerialara özgü virulens genleri ya da ribozomal bölgeleri hedefleyen primerler (16S ve 23S rRNA genleri, intergenic bölgeler, *hly*, *inlA*, *inlB*, *iap*, hypersensitivite geni, aminopeptidaz geni ve putative transcriptional regulator geni gibi ...) ile hem tür bazında hem de cins bazında

PCR ile identifikasyonlar yapmak mümkündür (48). PCR analizi, 24-48 saatlik zenginleştirmelerden sonra yapılır. Doğrudan örneklerden yapılan PCR sonuçları doğru sonuçlar vermemektedir. Doğrudan örneklerden yapılamaması, şüpheli materyallerin içinde PCR'yi inhibe eden faktörlerin bulunması ve bunların kolaylıkla bertaraf edilememesinden kaynaklanmaktadır. Bütün bunlara rağmen yeni teknikler geliştirildikçe doğrudan örneklerden listeria identifikasyonuna yönelik çalışmalar artmaktadır (15).

PCR karışımına bir adet değil de, çoklu primer çiftlerinin eklenmesiyle yapılan metodun adına multipleks PCR denilmektedir. Multipleks PCR metoduyla, çoklu primer setleri kullanılarak aynı anda aynı örnek için birden fazla patojen taranabilmektedir. Örneğin; listeria ve salmonella (70) ya da bütün listeria türlerinin tek PCR analizinde aranması mümkündür (26). Çoklu primer setlerinin kullanıldığı diğer PCR yöntemi ise nested PCR dir. Spesifite ve sensitivitenin artırılması amaçlanan gıda, çevre, kan ve süt örneklerinde listeria taranmasında, aynı hedef için farklı primerler kullanılmaktadır (33). Multipleks PCR'da dikkat edilmesi gereken nokta, seçilen hedef genin seçilen türler için tek olmasını gerektirmesidir (48).

3.15.3. DNA Sekanslama

Listeriaların identifikasyonunda 16S rRNA'ya spesifik sekanslama kitleriyle sekanslama yapılmaktadır. Sekanslama yapıldıktan sonra elde edilen DNA dizisi çeşitli DNA veritabanlarında araştırılarak hangi türe ait olduğu bulunmaktadır. DNA sekanslamada en çok kullanılan bilgisayar yazılımı "BLAST" ve veritabanı ise internetten kolaylıkla ulaşılabilen internet adresi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>'dur (48).

3.16. Tiplendirme

Listeriaların sebep olduğu salgınlarda, suşların çeşitliliğini çıkarmak, epidemiyolojisini ortaya koymak, populasyon genetiğini görmek amacıyla tiplendirme yapılmaktadır. Tiplendirme metotları fenotipik ve genotipik (moleküler ya da DNA) tiplendirme olarak temelde ikiye ayrılır. Fenotipik tiplendirme olarak serotiplendirme, faj tiplendirme, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) ve esteraz yöntemleri sayılabilir. Moleküler tiplendirme metotları ise pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), ribotiplendirme, random amplification polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), repetitive element PCR (rep-PCR) ve DNA sekanslama şeklinde sayılabilir. Fenotipik tiplendirmenin düşük bir ayırım gücü ve üretilebilirliği vardır. Moleküler tiplendirmelerde, yüksek duyarlılık, ayırım gücü ve üretilebilirlik vardır. *Listeria* salgınlarında iyi bir alt tiplendirme yapabilmek için iki ya da daha fazla moleküler ya da fenotipik tiplendirme tekniğini birlikte kullanmak gerekmektedir (3).

3.16.1. Fenotipik Tiplendirme

3.16.1.1. Serotiplendirme

Listerialar ısıya dayanıklı karbonhidrat içeren somatik (O) (I'den XV'e kadar) ve ısıya dayanıksız flagellar (H) (A'dan-E'ye kadar) antijenlerine göre çeşitli serotiplere ayrılırlar. Günümüzde *L. monocytogenes*'in 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7 olarak isimlendirilen 13 serotipi bulunmaktadır (Tablo 4). Serotiplendirme ile *Listeria* türleri arasında tam bir ayırım yapılamaz. Bunun yerine *Listeria* genusunun doğrulanmasında rahatlıkla kullanılabilir. *L. monocytogenes*'in identifikasyonunda serolojik olarak doğrulanmasına gerek

yoktur. Serotiplendirme daha çok epidemiyolojik çalışmalarda çevresel kontaminasyonları izlemede serotiplerin spesifik prevalansını belirlemek için kullanılmaktadır (20).

Tablo 4. Listeriaların Serotip Grupları (101)

Türler	Serovar	O Antijeni	H Antijeni
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	I II (III)	AB
	1/2b	I II (III)	ABC
	1/2c	I II (III)	BD
	3a	II (III) IV	AB
	3b	II (III) IV (XII) (XIII)	ABC
	3c	II (III) IV (XII) (XIII)	BD
	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
	7	(III) XII XIII	ABC
	<i>L. ivanovii</i>	5	(III) (V) VI VIII X
<i>L. innocua</i>	6a	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	ABC
	6b	(III) (V) (VI) (VII) IX X XI	ABC
<i>L. grayi</i>		(III) XII XIV	E

3.16.1.2. Faj Tiplendirme

Bakteriyofajlar, bakterilere özgü, doğal olarak bulunan viruslardır. Listeriaların da kendilerine hatta kendi içlerindeki türlere özgü fajları bulunmaktadır. Fajların kendilerine özgünlüğü ve konakçıları lize etme özellikleri kullanılarak tiplendirme yapılabilmektedir (71). 1984 yılındaki listeria salgınında, fajları kullanarak, listerialar 4 faj grubuna ve 41 farklı alt gruba ayrılmıştır. Yapılan iki farklı çalışmada ise fajların listeriaları tiplendirebilme oranı % 84.5 (72) ve % 89.5 (73) bulunmuştur. Faj tiplendirme yapılması ve

sonuçların okunmasının kolay, az maliyet ve işgücü gerektirmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Faj tiplendirmenin en büyük dezavantajı ise sınırlı tiplendirme kabiliyetinin olmasıdır. Bu sebeple araştırmacılar tarafından tercih edilen bir tiplendirme tekniği değildir (3).

3.16.1.3. Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)

MLEE, gelişmiş bir protein tabanlı tiplendirme tekniğidir. Enzimlerin amino asit sekanslarındaki değişikliklerin, farklı elektrik yüklü proteinlerin polyacrylamide gel elektroforezde (PAGE) yürütülmesi sonucu gözlemlenmesine dayalı bir tekniktir. Bu değişiklikler doğrudan bu enzimleri kodlayan genlerin allel değişiklikleriyle ilişkilidir. İzolatların sahip oldukları farklı elektrik yükünden dolayı, elektroforetik tiplerine göre bir sıralama yapılabilir. Faj tiplendirme gibi bu tekniğin de kolay yapılabilirlik, okunabilirlik ve az maliyet ve işgücü gibi avantajları bulunmaktadır. Ayrıca MLEE, Dünya Sağlık Örgütü tarafından (WHO) laboratuvarlar arası çalışmalarda kullanılması tavsiye edilen bir tekniktir (114).

3.16.2. Moleküler Tiplendirme

3.16.2.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Yüksek ayırım gücü ve tekrar edilebilirliği ile bakteriyel DNA'nın enzimlerle kesilip jel elektroforezde yürütülmesine dayalı, etkili bir moleküler tiplendirme tekniğidir. Tüm bakteriyel genom restriksiyon enzimleriyle kesilerek, agaroz jelde yürütülür. Buradaki DNA parçaları oldukça büyük moleküller olduğundan (40-600 kb), elektrik akımı her yönden 50-60 saat süreyle verilerek agaroz jelde yürütülmektedir. Sonuç olarak her DNA için spesifik bir bant profili

elde edilerek jelde görüntülenir. Uzun zaman alması, özel donanım ve işgücü gerektirmesi gibi dezavantajlarından dolayı referans laboratuvarlar dışında yaygın olarak kullanılmamaktadır (48).

3.16.2.2. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme ribozomal genler ya da proteinlerin varyasyonlarının görüntülenmesi temeline dayalı bir tekniktir. Bu teknik temel olarak filogenetik ilişkileri araştırmakta ve modern prokaryot sistematğinde kullanılmaktaydı. Bir gen eşleşmesi birbirine ne kadar yakınsa organizmaların yakınlıkları da o kadar artmaktadır. Filogenetik ilişkiler için en kullanışlı gen, rRNA'yı kodlayanıdır. Çünkü ribozomlar hem kendi DNA'larına sahipler hem de evrimleşmenin erken dönemlerinden beri varlıklarını sürdürebilmektedirler. *Listeria* izolatlarının ribotiplendirmesi, bir rRNA gen probu kullanılarak çoğaltılan DNA'nın, bu işlemin ardından restriksiyon enzimiyle (*EcoRI*, *PvuII*, *XhoI* gibi) küçük parçalara ayrılmasını (1-30 kb) içermektedir. Sonuç olarak elde edilen bant profilleri ile izolatlar arasındaki ilişki kurulur. Ribotiplendirme epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve rutin analizler için bu metodun uyarlanması kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu teknik, oldukça elverişli, sağlam ve mükemmel bir tekrarlanabilirlik vermesine rağmen, *L. monocytogenes*'in ayırma gücü diğer moleküler tiplendirme tekniklerinden daha düşüktür (3).

3.16.2.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

DNA molekülü içindeki belirli bölgeleri tanıyan ve tanıdığı bu bölgelerden DNA molekülünü kesebilen enzimlerin kullanılmasını içeren bir tekniktir. DNA molekülünün kesilmesiyle değişik boyutlarda DNA parçaları oluşur ve bunlar

agaroz jel üzerinde bant oluştururlar. Kromozomal bakteri DNA molekülünün REA'sı makrorestriksiyon analizi olarak bilinmektedir ve tekniğin performansı PFGE ile kombinasyonu ile önemli derecede artmaktadır. Yani, PFGE deki gibi agaroz jelde yürütme yaparken elektrik akımının büyüklüğünü ve yönünü belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle büyük parçalı DNA moleküllerinin de oldukça kolay yürütmesi sağlanmıştır. PFGE ve makrorestriksiyon kombinasyonu oldukça etkili, ucuz, yüksek ayırım gücü olduğundan ve düşük maliyetli olması sebebiyle tercih edilen bir tiplendirme metodu olmuştur. Bu tiplendirme metodu listeriaların genomik DNA'larının tiplendirilmesinde yapıldığı gibi, belirli bir proteini kodlayan genin üzerine de yapılmıştır. Bu yöntem ise mikrorestriksiyon denmiştir. Moleküler tiplendirmelerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kısmen de olsa *L. monocytogenes*'in 1/2 ve 4 serotipleri için en iyi tiplendirme sonucunu vermiştir (39).

3.16.2.4. PCR Tabanlı Tiplendirme Teknikleri

3.16.2.4.1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve arbitrarily primed PCR (AP-PCR)

RAPD ve AP-PCR nin her ikisi de rastgele primer kullanılarak DNA parçalarının rastgele çoğaltılmasından ibarettir. Bu teknikte kısa AP-PCR için bir primer (yaklaşık 10 bazlık), RAPD için biraz daha uzun primer (yaklaşık 15 baz) kullanılır. RAPD ve AP-PCR tekniğinin temelindeki mekanizma, primer bağlanma sıcaklığının düşük tutulmasıdır. Rastgele seçilen bir primer genom ile tamamıyla bir homoloji göstermeyebilir. Yani primerin 3' ucundaki 3 nükleotidden 2 tanesi bağlanabilir. Bu durumda DNA polimeraz enzimi yeni DNA zincirini sentezletir. RAPD tiplendirme, listeriosis salgınlarını tespit etmede

kullanılacak epidemiyolojik çalışmalar için mükemmel bir araçtır (34, 77, 78). RAPD ya da AP-PCR ile diğer tiplendirme metotlarına nazaran daha ekonomik ve daha hızlı sonuçlar alınması mümkündür. Ayrıca RAPD tiplendirme ile çok sayıda örnek üzerinde çalışılabilmektedir. Fakat bu tekniğin dezavantajı ise ayırım gücünün tutarsızlık göstermesidir (47).

3.16.2.4.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP, kesilen DNA'nın restriksiyon enzimlerine adaptör eklenmesiyle yapılan bir modifikasyondur ve takiben PCR ürünlerinin çoğaltılması ve elektroforezde yürütülmesi yapılır. Bu teknikte, *L. monocytogenes* DNA molekülü önce iki restriksiyon enzimiyle (Örneğin *EcoRI* ve *MseI*) kesilir. Kesilen fragmentler çift zincirli adaptörlerle bağlanır ve spesifik primerlerle PCR ürünleri çoğaltılır. *L. monocytogenes* 40-200 bp arasında bant oluşturur. AFLP, listeria türleri içinde olduğu gibi *L. monocytogenes* suşları arasında da faydalı bir tiplendirme yapabilir. AFLP'nin yüksek ayırım gücü, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği göz önüne alındığında listerialar için değerli bir tiplendirme tekniğidir (71).

3.16.2.4.3. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Bir ya da daha fazla virulens ile ilişkili ya da ribozomal genlerin (örneğin, *hly*, *actA*, *inlA* gibi) spesifik primerleriyle PCR de çoğaltılmasını takiben, PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle (*HhaI*, *SacI*, *HinfI* gibi) kesilmesidir. Kesilen parçaların agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bantlar tiplendirmede kullanılır.

PCR-RFLP başlangıç için çok az miktarda DNA molekülü gerektirmektedir. Diğer tiplendirme metotlarıyla birlikte kullanıldığında, duyarlılığı, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü yüksek bir tiplendirmedir (93, 106).

3.16.2.4.4. Repetitive PCR (Rep-PCR)

Bakteriler DNA'larında rastgele dağılmış tekrar eden sekanslar içermektedir. Örneğin tekrar eden 35-40 bp boyutlarında repetitive ekstragenik palindromlar (rep) ve genler arasındaki tekrar eden üniteler ya da yüksek derecede saklanmış 124-147 bp uzunluğunda tekrar eden Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sekansları (ERICs). *L. monocytogenes* suşlarının ve listeria türlerin ayırımını yapabilmek için REP ve ERIC sekanslarına primer bağlanabilir ve PCR de çoğaltılıp, elektroforezde yürütüldükten sonra tiplendirme yapılabilir. Rep-PCR ile *L. monocytogenes* suşları 4 bölüme ayrılmıştır. Ayrıca her bir suşun çoklu alt tipleri de mevcuttur. PFGE ve ribotiplendirme ile de benzer ayırım gücü elde edilmiştir (71). *L. monocytogenes* suşları için Rep-PCR değerli, hızlı bir alternatif olabilir.

3.16.2.4.5. DNA Sekanslama

DNA'nın doğrudan sekanslanması organizmaların genetik yakınlıklarını ve aralarındaki ilişkilerini değerlendirmek için en doğru yöntemdir. Fakat sekanslama pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. DNA zincirinin oluşumu sırasında zincire normal nükleotidler yerine işaretlenmiş dideksionükleotidlerin eklenmesi ve bu eklenen nükleotidlerin okunması temeline dayanan bir tekniktir. Sonuç olarak, gendeki baz diziliminin tamamı ortaya çıkarılmaktadır. 16S rRNA geni sekanslamada bilim adamları tarafından en çok tercih edilen genidir. Ayrıca

23S, 5S ve diğerk bölgeler de tiplendirme ve identifikasyon için kullanılmaktadır (114). 16S rRNA genleri yüksek derecede korunmuş bölgeler içermektedir. Hedef DNA'nın konserve edilmiş bölgesi için tasarlanan primerler PCR ürününün sekanslanmasıyla çok geniş bir yelpazedeki farklı organizmaların analizinde kullanılabilir. Yüksek derecede farklılaşan bölgeler ise aynı suşa ait alt tiplendirmelerde kullanılabilir.

Çoklu genlerde ya da gen parçalarında (örneğin *fla*, *hly*, *actA*, *iap*, *inl*, *mpl*) yapılan sekanslamaya multi locus sequence typing (MLST) denmektedir. MLST ile yaklaşık olarak 450 bp uzunluğundaki gen parçaları çoğaltılır ve ardından sekanslama yapılır. Bu genlerin sekansları içindeki değişiklikler bu lokasyondaki alleller olarak adlandırılır. MLST'nin ayırım gücü ve doğruluğu oldukça yüksektir. MLST ile herhangi bir suşun tiplendirilmesi belirgin bir şekilde yapılabilir. *L. monocytogenes*'in sekanslama ile tiplendirilmesi ilk olarak temel işlevlerin yürütülmesinden sorumlu genler üzerinde yapıldı. MLST uygulaması, laboratuarlarda rutin olarak uygulanamaz ve özelleşmiş laboratuarlarda yüksek maliyetlerle yapılabilir (38).

3.17. Amaç

Bu çalışma ile temelde Elazığ ve civarındaki zoonoz bakterilerden olan listeriaların varlığının, insan, hayvan, yem ve gıdalar arasındaki taşınma mekanizmasının açıklığa kavuşturulmasının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Elazığ ili ve civarından rastgele belirlenen koyun ve sığır çiftliklerinden süt, peynir, süt tankı, su, yem, fekal ve çevresel örnekler alınarak listeriaların varlığı araştırılmıştır. Listeriaların mevsimsel değişimlerinin ortaya konması, bu bakterilerin biyolojisi ve mücadelenin nasıl yapılacağı konusunda

yararlı bilgiler ortaya çıkaracağı düşünülerek, bir yıl boyunca her ay periyodik şekilde örnek toplanmıştır. Aynı zamanda hayvan ve insanlar için patojen listeria türleri hakkında ayrıntılı bilgi elde edileceği düşünülmektedir. Random Amplified Polymorphic DNA ile (RAPD) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) moleküler tiplendirme metotlarından yararlanılarak *L. monocytogenes*'in genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. Süt ve peynirlerin kontaminasyon kaynaklarının ya da kontaminasyonun hangi aşamada olduğunun tespiti planlanmıştır. Listeria varlığının, mevsimsel değişimlerinin, alt tiplerinin belirlenmesiyle, hayvan-gıda-yem-çevre ilişkilerinin gösterilmesi listerialarla ilgili geniş bir bilgi kaynağı oluşturulacaktır. Bu bilgilerin listerialara karşı gıda güvenliği ve bu enfeksiyon yönünden halk ve hayvan sağlığı konusunda strateji geliştirilmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. GEREÇ

4.1.1. İşletme Seçimi

Elazığ ili çevresinde, 5 adet koyun ve 6 adet sığır işletmesinden örnekler toplandı. İşletmeler arasında kontaminasyon riskini en aza indirmek için birbirine yakın olmayan çiftliklere gidildi. Elazığ ve civarındaki işletmeler, özellikle koyun yetiştiricileri yaz aylarında yaylaya gittiklerinden dolayı, yıl boyunca yer değiştirmeyecek olanlar arasından seçildi. Çalışmada kullanılacak koyun işletmelerinde en az 50 koyun veya daha fazla, sığır işletmelerinde ise 5 sığır veya daha fazla kapasiteye sahip olma şartı arandı. Ayrıca çiftlik seçimi yapılırken daha önce listeriosis vakası bildirilmemiş olan işletmeler tercih edildi. Sığır ve koyun işletmelerinden toplanan numunelerin sayıları, nereden ve ne zaman alındıkları ile ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 5’de verilmiştir.

4.1.2. Örneklerin Toplanması ve Kültür İşlemlerine Hazırlanması

Örnek toplama işlemi, Şubat 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında belirlenen koyun ve sığır çiftliklerine her ay bir defa gidilmek suretiyle, toplam 12 kez yapıldı. Örnekler toplanırken tek kullanımlık steril kaplar kullanıldı. Koyun ve sığır işletmelerinden toplanan süt, peynir, süt tankı svabı, su, yem, fekal ve çevresel örnekler soğuk ortamda taşınarak en kısa sürede laboratuara getirildi. Örnekler laboratuarda ivedilikle zenginleştirme işlemlerine alındı. Her örnek katı veya sıvı oluşuna göre 50 g ya da 50 ml miktarlarında toplandı. Süt ve fekal örnekler beş farklı hayvandan 50 g ya 50 ml, toplamda 250 g ya da 250 ml olacak şekilde alındı. Su, yem ve çevresel örnekler ahırda 5 farklı noktadan 50 g ya da 50

ml toplam 250 g ya da 250 ml olacak şekilde alındı. Süt tankı örnekleri steril pamuklu çubuklar vasıtasıyla alındı ve laboratuara getirilinceye kadar transport besi yerinde bekletildi. Aynı ahırdan 5 farklı hayvandan alınan 5 adet süt bir kaptaki birleştirildi. Örnek havuzunun homojen karışımının sağlanması için uygun yöntem veya karıştırıcı-parçalayıcı alet yardımıyla karıştırıldı. Zenginleştirme işlemlerinde kullanılmak üzere oluşturulan havuzlardan 25 g/ml örnek kullanıldı. Steril pamuklu çubuğa alınan süt tankı örnekleri doğrudan zenginleştirmeye alındı. Her svab örneği yaklaşık 1 g kabul edildi. Svab örnekleri için zenginleştirme besi yeri 1/10 oranında daha küçük hacimlerde hazırlandı.

Koyunlar mevsimsel laktasyon periyoduna sahip olduğundan, eylül ayından ocak ayına kadar süt örneği toplanamadı. Dolayısıyla koyun çiftliklerinden aynı süre içinde peynir örneği de toplanmadı. Koyun yetiştiricileri süt sağımı için herhangi bir alet veya makine kullanmadıklarından, hiç süt tankı örneği alınmadı. Süt sağımı işleminin ardından, süt tankları temizlendiğinden bazı sığır çiftliği ziyaretlerinde süt tankı svabı alınamadı.

Havuz örnekleri esas alınarak toplanılan örneklerin sayımı yapıldı. Örneğin, bir sığır ahırından alınan 5 süt örneği bir kaptaki birleştirildikten sonra örnek sayısı bir olarak hesaplandı. Örnek sayılarıyla ilgili bilgiler Tablo 5’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 5. Numune Sayıları ve Dağılımları

Aylar	Süt		Peynir		Süt Tankı		Dışkı		Yem		Su		Çevre		Toplam		Toplam
	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	Sığır	Koyun	
Şubat '07	6	5	3	2	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	35	27	62
Mart '07	6	5	2	5	3	0	6	5	6	5	6	5	6	5	35	30	65
Nisan '07	6	5	2	5	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	34	30	64
Mayıs '07	6	5	3	5	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	35	30	65
Haziran '07	6	5	3	5	3	0	6	5	6	5	6	5	6	5	36	30	66
Temmuz '07	6	5	2	5	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	34	30	64
Ağustos '07	6	5	2	2	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	34	27	61
Eylül '07	6	0	2	0	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	34	20	54
Ekim '07	6	0	2	0	3	0	6	5	6	5	6	5	6	5	35	20	55
Kasım '07	6	0	3	0	3	0	6	5	6	5	6	5	6	5	36	20	56
Aralık '07	6	0	2	0	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	34	20	54
Ocak '08	5	0	2	0	2	0	6	5	6	5	6	5	6	5	33	20	53
Toplam	71	35	28	29	28	0	72	60	72	60	72	60	72	60	415	304	719
Genel Toplam	106		57		28		132		132		132		132		719		719

4.2. YÖNTEM

4.2.1. İzolasyon

Listeriaların izolasyonu için iki farklı yöntem kullanıldı. Süt, peynir ve süt tankı örneklerinden izolasyon için AOAC/IDF yöntemi, su, yem, fekal ve çevresel örneklerden izolasyon için USDA/FSIS yöntemi kullanıldı.

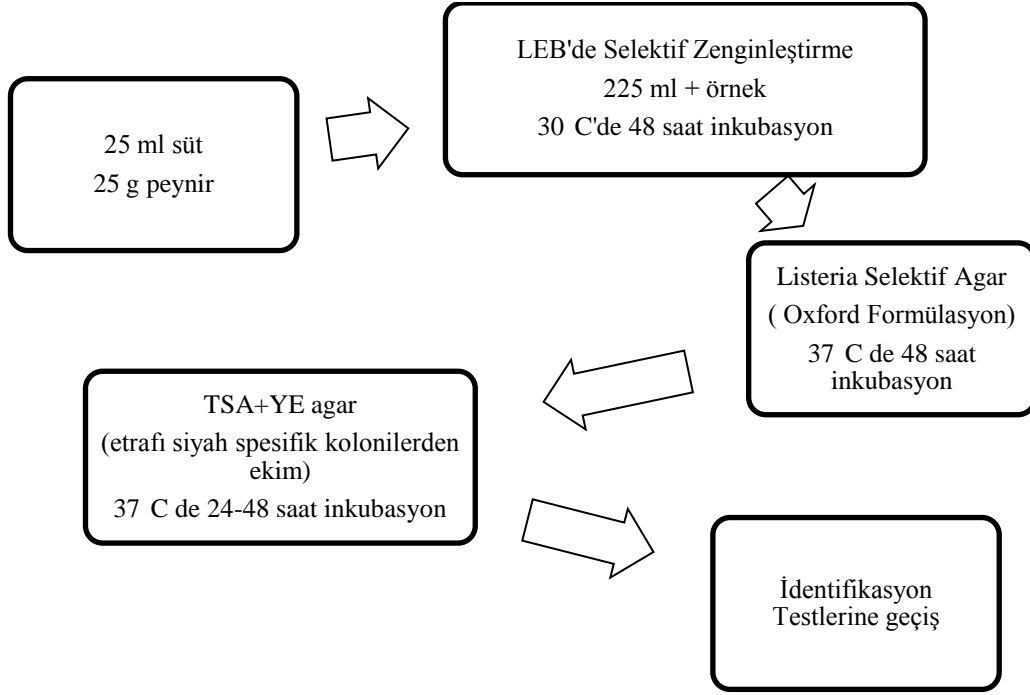
4.2.1.1. Association of Official Agricultural

Chemists/International Dairy Federation (AOAC/IDF)

Metodu (5, 45)

Bir tankta birleştirilmiş ve homojen karıştırılmış süt örneklerinden 25 ml, peynir örneklerinden 25 g alınarak, 225 ml Listeria Enrichment Broth'a (LEB, LabM, İngiltere) inoküle edilerek, 30°C de 48 saat selektif zenginleştirmeye bırakıldı. Peynir örneklerinin zenginleştirme besi yeri ile homojen karışmasını sağlamak için bir karıştırıcı-parçalayıcı yardımıyla çok küçük parçalara ayrıldı. Süt tanklarından alınan svab örnekleri doğrudan 1/10 oranında hazırlanan LEB besi yerine ekimleri yapıldı.

Zenginleştirme işleminden sonra, süt, peynir ve süt tankı örneklerinin zenginleştirmeleri Oxford formülasyonlu Listeria Isolation Medium (LabM, İngiltere)'a geçilerek, 24-48 saat 37°C de inkubasyona bırakıldı. Etrafı gri, kahverengi siyah koloniler seçilerek %0,6 maya ekstraktı (Difco, ABD) eklenmiş Tryptone Soy Agar (TSA, Difco, ABD)'a tek koloni geçildi. Saf olarak izole edilen koloniler identifikasyona alındı (Şekil 6).

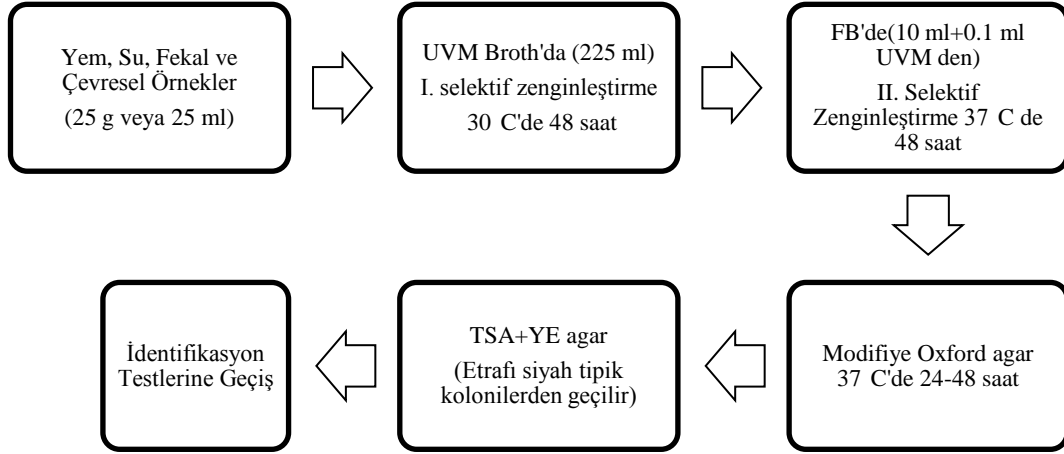


şekil 6. AOAC/IDF Metodu ile İzolasyon (5, 45)

4.2.1.2. United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) Metodu (8)

Bir kapta birleştirilmiş ve homojen karıştırılmış dışkı, yem ve çevresel örneklerden 25 g, su numunelerinden 25 ml alınarak birinci zenginleştirmeye geçildi. Birinci zenginleştirme basamağında University of Vermont Broth I (UVM I, LabM, İngiltere) kullanıldı. Birinci zenginleştirmede örnekler 25 g veya 25 ml, 225 ml besi yeri içerisine inoküle edildi. Besi yerleri 30°C de 48 saat inkube edildi. İkinci zenginleştirme besi yeri olarak Fraser Broth (FB, LabM, İngiltere) kullanıldı. FB'ye ekim yapılırken UVM I'deki kültürden besi yerinden 0.1 ml alınarak 10 ml FB içerisine inoküle edildi. FB'de 37°C 'de 48 saat inkube edildi. FB'de inkubasyonun ardından rnekler Modifiye Oxford agara (MOX, Oxoid, İngiltere) ze ile ekim yapıldı. MOX agarda, gri renkte etrafi kahverengi/siyah

renkte üreyen kolonilerden maya ekstraktı eklenmiş TSA'ya geçildi. Saf olarak izolasyonu yapılan koloniler identifikasyon işlemlerine alındı (Şekil 7).



Şekil 7. USDA/FSIS Metodu ile İzolasyon (8)

4.2.2. Biyokimyasal Testler

Saf olarak izole edilmiş listeria şüpheli tipik kolonilerin identifikasyonu amacıyla Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de (101) belirtilen biyokimyasal testlerden Gram boyama, katalaz, oksidaz, karbonhidrat (ksiloz, ramnoz, mannitol), CAMP ve hareket testleri yapıldı. Biyokimyasal testlerin ardından Listeria izolatları % 10 gliserin içeren sıvı besi yerinde moleküler testler yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

4.2.3. Çalışmada Kullanılan Referans Suşlar

İzolasyon ve identifikasyon çalışmalarında herhangi bir yanlış pozitifliği veya negatifliği önlemek için elde edilen izolatlara paralel olarak referans suşlar ile de aynı testler yapıldı. *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *L. grayi*

referans suşları F.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edildi.

Çalışmada kullanılan diğer referans suşlar *L. monocytogenes serovar 1/2a* CLIP-12498/SLCC 2371/ATCC-35152, *L. ivanovii serovar 5*: CLIP-12510/SLCC-2379/ATCC-19119, *L. innocua serovar 6a*: CLIP-12511/SLCC-3397/ATCC-33090, *L. innocua serovar 6a*: CLIP-12511/SLCC-3397/ATCC-33090, *L. welshimeri serovar 6b*: CLIP-12514/SLCC 5334/ATCC-35897'dir.

4.2.4. Moleküler Testler

4.2.4.1. PCR Analizleri

Listeria kolonilerinden DNA ekstraksiyonunda Proteinaz K yönteminden yararlanıldı (26). Elde edilen DNA örnekleri moleküler işlemlerde kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. PCR amplifikasyon işlemleri Techne TC-512 (İngiltere) cihazında yapıldı. Tüm moleküler işlemlerde kullanılan primerler Tablo 6'da verilmiştir.

Biyokimyasal olarak *Listeria* spp. olarak tespit edilen kolonilerin PCR ile konfirmasyonu yapıldı. Bu işlem için Bubert ve ark. (26)'ın geliştirdiği metot takip edildi. Bubert ve ark. tarafından yayınlanmış *iap* genine spesifik primer çifti (Lis1A ve Lis1B) kullanıldı (Tablo 6). PCR amplifikasyonunda 94 °C de 3 dakika ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 45 saniye denaturasyon, 55 °C'de 1 dk bağlanma ve 72 °C'de 1 dk uzama safhası olmak üzere toplam 30 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 5 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Toplam 25 µl 'lik hacimde PCR işlemleri yapıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 1454 bp moleküler uzunluğundaki bantlar

Listeria spp. göstergesi olarak kabul edildi. Tüm *Listeria* spp. PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* serovar 1/2a: CLIP-12498/SLCC 2371/ATCC-35152, *L. ivanovii* serovar 5: CLIP-12510/SLCC-2379/ATCC-19119, *L. innocua* serovar 6a: CLIP-12511/SLCC-3397/ATCC-33090, *L. innocua* serovar 6a: CLIP-12511/SLCC-3397/ATCC-33090, *L. welshimeri* serovar 6b: CLIP-12514/SLCC 5334/ATCC-35897 suşları ve negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

Biyokimyasal metot ile *L. monocytogenes* olarak identifiye edilen suşların doğrulanması için Border ve ark.'ın (24) geliştirdiği yöntem küçük modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. PCR karışımı bir tüp için toplam 25 µl olarak ayarlandı. Border ve ark. tarafından kullanılan *listeriolysin* genine spesifik primer çifti (LM1 ve LM2) kullanıldı (Tablo 6). PCR amplifikasyonunda 94 °C de 4 dakika ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 30 saniye denaturasyon, 52 °C'de 60 saniye bağlanma ve 72 °C'de 90 saniye uzama safhası olmak üzere toplam 30 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C'de 7 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 702 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *L. monocytogenes* göstergesi olarak kabul edildi. Tüm *L. monocytogenes* için yapılan PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes* serovar 1/2a: CLIP-12498/SLCC 2371/ATCC-35152 ve negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

4.2.4.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Analizi

RFLP işlemine başlamadan önce *L. monocytogenes* için *internalin A* genine spesifik PCR yapıldı. PCR işleminde, Rousseaux ve ark. (93) geliştirdiği yöntem küçük değişikliklerle kullanıldı. Bir tüp için PCR karışımı toplam 50 µl olarak ayarlandı. PCR amplifikasyonunda 94 °C de 4 dakika ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C’de 30 saniye denaturasyon, 52 °C’de 60 saniye bağlanma ve 72 °C’de 150 saniye uzama safhası olmak üzere toplam 30 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. Son siklusu müteakip 72 °C’de 7 dk ekstra sentez işlemi yapıldı. Rousseaux ve ark. (93) tarafından yayınlanmış *inl A* genine spesifik primer çiftinin (seq01 ve seq02) her birinden (Tablo 6) PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi neticesinde oluşan 733 bp moleküler uzunluğundaki bantlar *L. monocytogenes* göstergesi olarak kabul edildi. Tüm *L. monocytogenes* için yapılan PCR uygulamalarında pozitif kontrol olarak *L. monocytogenes serovar 1/2a*: CLIP-12498/SLCC 2371/ATCC-35152 ve negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

PCR işleminden sonra, elektroforez işleminin ardından pozitif olduğu belirlenen PCR ürünleri restriksiyon işlemine tabi tutuldu. *AluI* (MBI, Fermentas) ve *Tsp509I* (MBI, Fermentas) enzimleriyle ayrı ayrı kesimleri gerçekleştirildi. Bu işlemi takiben oluşan profiller UV transilluminatörde analiz edildi ve fotoğraflandı. RFLP farklı zamanlarda 2 kez tekrar edilip, bağımsız iki araştırmacı tarafından yorumlandı.

4.2.4.3. Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) Analizi

L. monocytogenes izolatlarının RAPD analizinde primer seçiminde gen bölgesinin mutasyona elverişli bölgelerinin seçilmesine öncelik verildi. Öncelikle rastgele seçilen 5 izolatın DNA'sı kullanılarak 2 farklı primer ile deneme yapıldı. Bu primerlerden RAPD analizinde kullanılanlar Tablo 6'da belirtilmiştir. Bu primerler son yıllarda en çok kullanılan primerler arasından seçildi.

4.2.4.4. HLWL74 ve HLWL85 Primerleri ile RAPD

HLWL74 ve HLWL85 primerleri (Tablo 6) kullanılarak yapılan RAPD analizlerinde Aguado ve ark.'ın (2) in geliştirdiği metot takip edildi. Amplifikasyon işlemi, 94 °C'de 4 dk, 39 °C 45 s, 72 °C'de 1 dk 1 siklus ön denaturasyon aşamasını takiben, 94 °C'de 15 s denaturasyon, 39 °C'de 45 s, 72 °C'de 1 dk 43 siklus ve 94 °C'de 15 s, 39 °C 45s, 72 °C'de 10 dk bir siklus olacak şekilde yapıldı. Daha sonra elektroforez işlemi yapıldı. Ethidium bromide ile boyamayı müteakip sonuçlar UV transilluminatör altında fotoğraflanarak analiz edildi.

Tablo 6. PCR Analizlerinde ve Tiplendirme Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler

Primer	Spesifiklik	Gen Bölgesi	Sekans (5'-3')	PCR Ürünü(bp)	Literatür
HLWL74	RAPD	Tüm DNA	ACGTATCTGC		(2)
HLWL85	RAPD	Tüm DNA	ACAACTGCTC		(2)
seq01 (F)	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i>	AATCTAGCACCCTGTCGGG	733	(93)
seq02 (R)			TGTGACCTTCTTTTACGGGC		
Lis1A	<i>Listeria spp.</i>	<i>İap</i>	ATGAATATGAAAAAAGCAA	1454	(26)
Lis1B			TTGGCTTCGGTCGCGTATAA		
LM1	<i>L. monocytogenes</i>	<i>listeriolysin</i>	CCTAAGACGCCAATCGAA	702	(24)
LM2			CGCTTGCAACTGCTC		

4.2.5. Kültür Aşamasında Kullanılan Besi Yeri ve Ayraçlar

Çalışmanın kültür aşamasında, University of Vermont Broth ve supplement I (LabM, İngiltere), Fraser Broth ve supplementi (LabM, İngiltere), Listeria Enrichment Broth ve supplementi (LabM, İngiltere), Listeria Isolation Medium, Oxford Formulation (LabM, İngiltere) ve C.N.C.A.F. (Cefotetan, Natamycin, Colistin, Acriflavine, Fosfomycin) supplementi (LabM, İngiltere), Listeria Selective Agar Base, Oxford formulation (Oxoid, İngiltere) ve Modified Listeria Selective Supplementi, Oxford Formulation (Oxoid, İngiltere), Bacto Tryptic Soy Agar (Difco, ABD), Kanlı Agar (Blood Agar Base), (LabM, İngiltere) ve Semi-solid Indol Motility Medium (Oxoid, İngiltere) kullanıldı.

4.2.6. PCR İşlemlerinde Kullanılan Ayraçlar

Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, St. Louis, MO, ABD), Tris-HCl Solüsyonu (1 M, Sigma, St. Louis, MO, ABD), 1x Tris-EDTA (TE) Buffer (Promega, Madison, ABD), MgCl₂ (MBI Fermentas, Litvanya), *Taq* DNA Polymerase Master Mix Enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), *AluI* Restriksiyon Enzimi (10U/µl; MBI Fermentas, Litvanya), 10x Restriksiyon Buffer (*AluI*, MBI Fermentas, Litvanya), *Tsp509I* Restriksiyon Enzimi (10U/ µl; New England BioLabs, ABD), 10x Restriksiyon Buffer (*Tsp509I*; MBI Fermentas, Litvaanya), 5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu, Agarose LE, (Promega, Madison, ABD), 100 bp DNA Ladder (50µg/100µl; MBI Fermentas, Litvanya), 6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (MBI Fermentas, Litvanya) ve Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Ayrıca kullanılan tüm primerler İontek (Türkiye) firmasına sentez ettirildi.

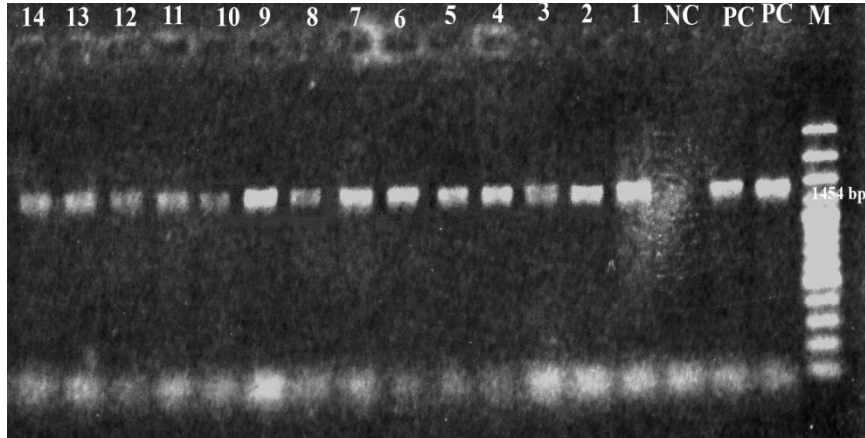
4.2.7. İstatistiksel Analiz

Mevsimsel izolasyon farklılıklarının istatistiksel olarak önemliliğini ortaya koymak amacıyla χ^2 testi kullanıldı. $P < 0.05$ 'ten küçük bulunan değerler istatistiksel açıdan önemli kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. İzolasyon

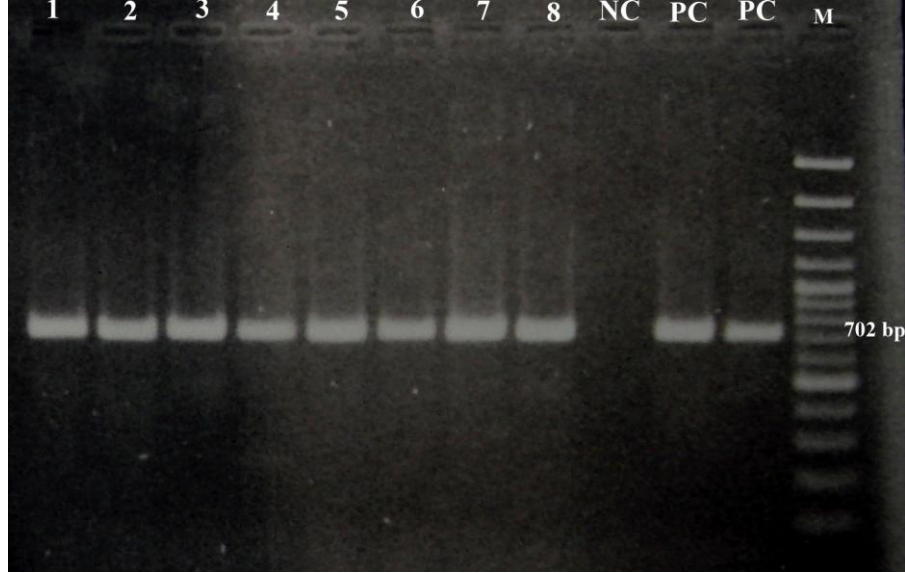
Çalışmada 719 adet (süt, süt tankı, peynir, su, yem, dışkı ve çevre) örnekten toplam 46 adet (% 6.39) *Listeria* spp. izolasyonu yapıldı. Bu izolatların identifikasyon testlerinin ardından 8 adet *L. monocytogenes* (% 17.39), 18 adet *L. innocua* (% 39.13), 5 adet *L. welshimeri* (% 10.86), 8 adet *L. seeligeri* (% 17.39) ve 7 adet *L. grayi* (% 15.21) bulundu (Tablo 8). Çalışmada hiç *L. ivanovii* izolasyonu yapılmadı. *Listeria* spp. izolatlarının tamamı Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, 25°C’de hareket pozitif olarak tespit edildi. Tüm *Listeria* spp. izolatlarına CAMP ve karbonhidrat testleri yapıldı. Ardından tüm suşlara listeria cins düzeyinde PCR yapılarak, 46 *Listeria* spp. izolatının moleküler doğrulaması, 1454 bp büyüklüğündeki bantların UV de görüntülenmesi ile yapıldı (Şekil 8).



Şekil 8. *Listeria* spp. İzolatlarının PCR ile Doğrulanması (1-14 numaralı izolatlar *Listeria* spp., NC:Negatif kontrol, PC: Pozitif kontrol, M: Marker)

Klasik yöntemler kullanılarak isimlendirilen 8 adet *L. monocytogenes* izolatının da tür düzeyindeki doğrulaması, PCR ile yapıldı. Şekil 9’da görüldüğü

gibi *listeriolysin* genine spesifik primer ile çoğaltılan 702 bp boyutlarındaki DNA fragmentlerinin görülmesiyle suşlar, *L. monocytogenes* olarak teyit edildi.



Şekil 9. *L. monocytogenes* izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. (Soldan sağa 1-8 *L. monocytogenes*, NC: Negatif kontrol, PC: Pozitif kontrol, M: DNA ladder)

L. monocytogenes dışındaki diğer *Listeria* türlerin identifikasyonunda kültür ve biyokimyasal yöntemler kullanıldı (Şekil 10 ve 11). İncelenen örnekler ve izolasyonlar hakkında ayrıntılı bilgi Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. İzole Edilen Listeriaların Biyokimyasal ve Moleküler İdentifikasyon Tablosu

Sıra	Ay	Hayvan	Örnek	Gram	Katalaz	Oksidaz	Hemoliz	Hareket	Karbonhidratlar			CAMP		PCR							
									Xylose	Mannitol	Ramnoz	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. ivanovii</i>	
1.	Şubat	Sığır	yem	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
2.	Aralık	Koyun	yem	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
3.	Aralık	Sığır	yem	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
4.	Ocak	Sığır	çevre	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
5.	Aralık	Koyun	fekal	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
6.	Ekim	Sığır	yem	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
7.	Ocak	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
8.	Nisan	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
9.	Şubat	Sığır	yem	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
10.	Haziran	Sığır	su	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
11.	Şubat	Sığır	süt	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
12.	Mayıs	Koyun	yem	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
13.	Mayıs	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
14.	Mayıs	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
15.	Mayıs	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
16.	Ekim	Sığır	çevre	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
17.	Nisan	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
18.	Ekim	Koyun	yem	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
19.	Aralık	Sığır	yem	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
20.	Ocak	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	

Tablo 7. İzole Edilen Listeriaların Biyokimyasal ve Moleküler İdentifikasyon Tablosu (Devam)

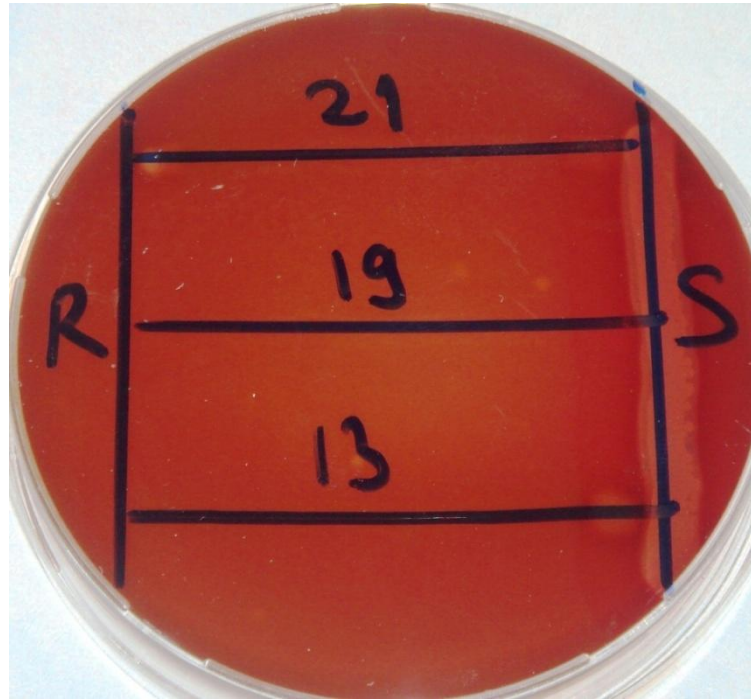
Sıra	Ay	Hayvan	Örnek	Gram	Karbonhidratlar			CAMP		PCR											
					Katalaz	Oksidaz	Hemoliz	Hareket	Xylose	Mannitol	Ramnoz	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. ivanovii</i>	
21.	Haziran	Sığır	su	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
22.	Temmuz	Koyun	çevre	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
23.	Mayıs	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
24.	Ekim	Sığır	fekal	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
25.	Nisan	Sığır	su	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
26.	Eylül	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
27.	Şubat	Sığır	su	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
28.	Mart	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
29.	Aralık	Sığır	yem	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
30.	Haziran	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
31.	Mayıs	Sığır	çevre	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
32.	Kasım	Sığır	yem	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
33.	Ocak	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
34.	Nisan	Sığır	yem	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
35.	Nisan	Sığır	su	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
36.	Mayıs	Sığır	çevre	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
37.	Mart	Sığır	fekal	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
38.	Kasım	Sığır	fekal	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
39.	Şubat	Sığır	su	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
40.	Haziran	Sığır	yem	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	

Tablo 7. İzole Edilen Listeriaların Biyokimyasal ve Moleküler İdentifikasyon Tablosu (Devam)

Sıra	Ay	Hayvan	Örnek	Gram	Katalaz	Oksidaz	Hemoliz	Hareket	Karbonhidratlar			CAMP		PCR						
									Xylose	Mannitol	Ramnoz	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. ivanovii</i>
41.	Mayıs	Sığır	süt	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
42.	Mart	Sığır	yem	+	+	-		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
43.	Aralık	Sığır	çevre	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
44.	Kasım	Koyun	yem	+	+	-		+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
45.	Şubat	Koyun	fekal	+	+	-		+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
46.	Mayıs	Sığır	çevre	+	+	-		+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-



Şekil 10. Listeria Selektif Agar'da Listeria Kolonilerinin Görüntüsü

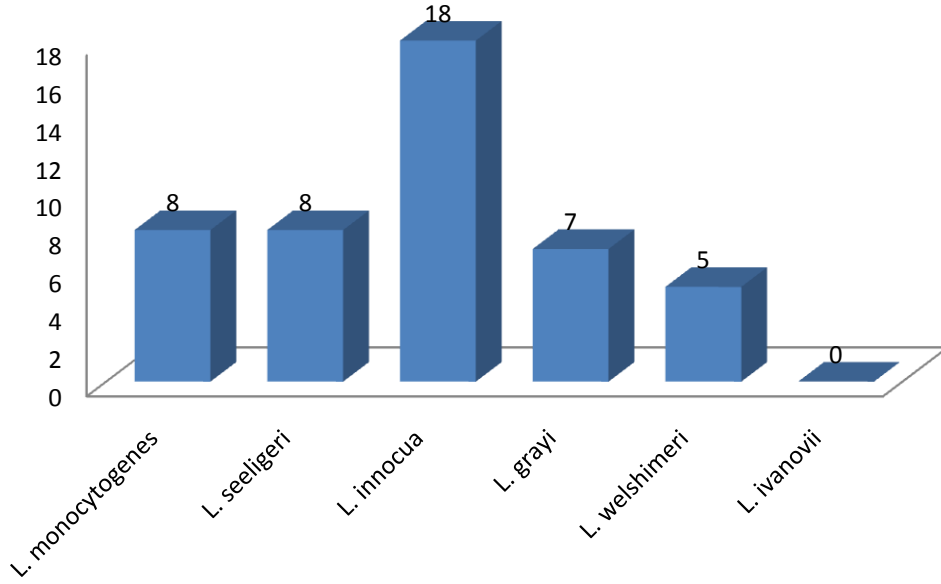


Şekil 11. CAMP Testi (R: *R.equi*, S: *S. aureus*, 13: *L. monocytogenes* referans suşu, 19: non-hemolitik listeria referans suşu, 21: *L. ivanovii* referans suşu).

Çalışmada *L. innocua* % 39.13, *L. monocytogenes* % 17.39, *L. seeligeri* % 17.39, *L. grayi* % 15.22 ve *L. welshimeri* % 10.91 prevalansı saptandı. Ayrıntılı bilgiler Tablo 8 ve Şekil 12’de verilmiştir.

Tablo 8. İzolasyonu Yapılan Listeria Türleri ve Sayıları

Tür Adı	İzolat Sayısı	Yüzde (%)
<i>L. monocytogenes</i>	8	17.39
<i>L. seeligeri</i>	8	17.39
<i>L. innocua</i>	18	39.13
<i>L. grayi</i>	7	15.22
<i>L. welshimeri</i>	5	10.91
<i>L. ivanovii</i>	0	0
TOPLAM	46	100



Şekil 12. İzolasyonu Yapılan Listeria Türlerinin Dağılımı

5.2. Hayvan Türlerine Göre Dağılımlar

Sığırlardan toplanan toplam 415 adet süt, peynir, süt tankı svabı, dışkı, yem, su ve çevre örneklerinde 39 adet (% 9.39) *Listeria* spp. izole edildi. Koyunlardan ise toplam 304 süt, peynir, süt tankı svabı, dışkı, yem, su ve çevre örneğinden 7 adet (% 2.30) *Listeria* izole edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Listeriaların Hayvan Türlerine Göre Dağılımları

	Toplam Örnek	Pozitif Örnek	Yüzde %
Sığır	415	39	9.40
Koyun	304	7	2.30
TOPLAM	719	46	6.39

Sığır çiftliklerinden toplanan örneklerden izole edilen toplam 39 adet *Listeria* spp. izolatının, 7 adedi *L. monocytogenes*, 7 adedi *L. seeligeri*, 17 adedi *L. innocua*, 5 adedi *L. grayi* ve 3 adedi *L. welshimeri* olarak isimlendirildi (Tablo 10).

Tablo 10. Sığır Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* spp. İzolatlarının Dağılımları

Tür Adı	İzolat Sayısı	Yüzde (%)
<i>L. monocytogenes</i>	7	17.94
<i>L. seeligeri</i>	7	17.94
<i>L. innocua</i>	17	43.58
<i>L. grayi</i>	5	12.82
<i>L. welshimeri</i>	3	7.69
TOPLAM	39	100

Koyun çiftliklerinden toplanan örneklerden izole edilen toplam 7 adet *Listeria* spp. suşunun, 1'i *L. monocytogenes*, 1'i *L. seeligeri*, 1'i *L. innocua*, 2'si *L. grayi* ve 2'si *L. welshimeri* olarak isimlendirildi (Tablo 11).

Tablo 11. Koyun Örneklerinden İzole Edilen *Listeria* spp. İzolatlarının Dağılımı

Tür Adı	İzolat Sayısı	Yüzde (%)
<i>L. monocytogenes</i>	1	14.28
<i>L. seeligeri</i>	1	14.28
<i>L. innocua</i>	1	14.28
<i>L. grayi</i>	2	28.57
<i>L. welshimeri</i>	2	28.57
TOPLAM	7	100

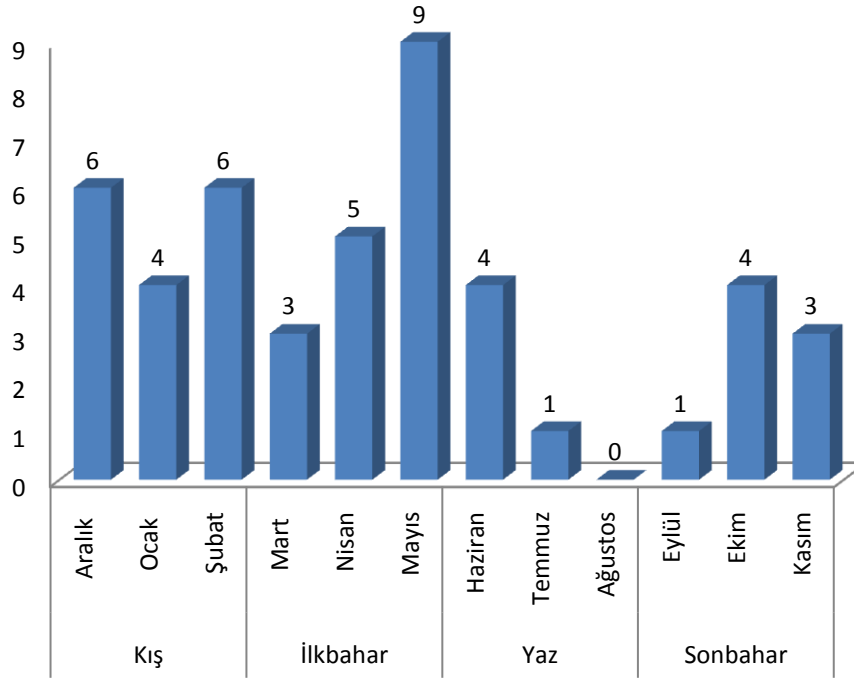
5.3. Mevsimlere Göre Dağılımlar

Ağustos ayı dışında yıl boyunca her ay örneklerden *Listeria* izolasyonu yapıldı. Mayıs ayı 9 adet *Listeria* spp. izolasyonu ile en çok izolasyonun yapıldığı ay olurken, en az izolasyon birer adet *Listeria* spp. ile Temmuz ve Eylül aylarında yapıldı. Mevsim olarak bakıldığında ise en yüksek izolasyon % 8.72 ile (17 adet) ilkbaharda yapılırken, en düşük izolasyon oranı ise % 2.91 ile yaz mevsiminde yapıldı (Tablo 12 ve Şekil 13). Yapılan istatistiklerde, mevsimler arasındaki izolasyon farklarının tümü ($p < 0.001$) istatistiksel açıdan da önemli olduğu görüldü. Aylar içinde ise kış ve ilkbahar aylarında elde edilen izolasyon sayılarının da ($p < 0.001$) istatistiksel açıdan önemli olduğu saptandı.

Tablo 12. Listeria İzolatlarının Mevsimsel Dağılımları

Mevsim	Ay	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek sayısı	%	Mevsim Toplamı	%
Kış	Aralık	62	6*	9.68	16*	8.38
	Ocak	65	4*	6.15		
	Şubat	64	6*	9.38		
İlkbahar	Mart	65	3*	4.62	17*	8.72
	Nisan	66	5*	9.09		
	Mayıs	64	9*	14.06		
Yaz	Haziran	61	4	6.56	5*	2.91
	Temmuz	54	1	1.85		
	Ağustos	55	-	0.00		
Sonbahar	Eylül	56	1	1.85	8*	4.94
	Ekim	54	4	7.41		
	Kasım	53	3	5.66		
TOPLAM		719	46		46	

• p<0.001



Şekil 13. Listeria İzolatlarının Mevsimsel Dağılımları

L. monocytogenes olarak isimlendirilen toplam 8 adet izolat; 2 adet Aralık, 2 adet, Nisan, 1 adet Temmuz, 1 adet Ekim ve 2 adet Kasım ayı olacak şekilde dağılım gösterdi. Yaz mevsimi 1 adet izolat ile en az *L. monocytogenes* izole edilen mevsim olurken, 3 adet ile en fazla izolasyon Sonbahar mevsiminde gerçekleşti (Tablo 13 ve Şekil 14).

L. seeligeri olarak tanımlanan toplam 8 adet izolat; 2 adet Aralık, 1 adet Ocak, 1 adet Şubat, 2 adet Mayıs, 1 adet Haziran ve 1 adet Ekim aylarında izole edildi. Kış mevsimi toplam 4 izolat ile en çok izolasyonun yapıldığı mevsim olurken, diğer mevsimlerde de izolasyon gerçekleşti (Tablo 13 ve Şekil 14).

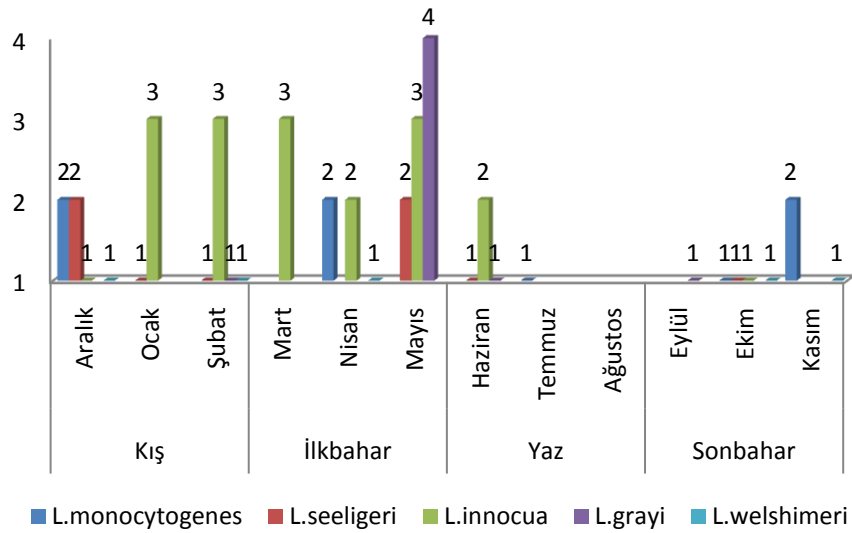
L. innocua olarak identifiye edilen toplam 18 adet izolat; 1 adet Aralık, 3 adet Ocak, 3 adet Şubat, 3 adet Mart, 2 adet Nisan, 3 adet Mayıs, 2 adet Haziran ve 1 adet Kasım aylarında izole edildi. Her mevsim izolasyon gerçekleşirken, en fazla izolasyon 17 izolasyon ile ilkbahar mevsiminde, en az izolasyon ise yalnızca 2 adet izolasyon ile yaz mevsiminde yapıldı (Tablo 13 ve Şekil 14).

L. grayi olarak tespit edilen toplam 7 adet izolat; 1 adet Şubat, 1 adet Ocak, 1 adet Şubat, 2 adet Mayıs, 1 adet Haziran ve 1 adet Ekim aylarında olacak şekilde dağılım gösterdi. Kış mevsimi toplam 4 izolat ile en çok izolasyonun yapıldığı mevsim olurken, diğer mevsimlerde de izolasyon gerçekleşti (Tablo 13 ve Şekil 14).

L. welshimeri olarak isimlendirilen toplam 5 adet izolat; 1 adet Aralık, 1 adet Şubat, 1 adet Nisan, 1 adet Ekim ve 1 adet Kasım ayı olacak şekilde dağılım gösterdi. Kış ve sonbahar mevsimlerinde ikişer, ilkbaharda ise 1 adet izolasyon yapıldı. Yaz mevsiminde ise *L. welshimeri* izole edilmedi (Tablo 13 ve Şekil 14).

Tablo 13. Listeria Türlerinin Mevsimsel Dağılımı

Mevsim	Ay	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.welshimeri</i>	TOPLAM
Kış	Aralık	2	2	1	-	1	6
	Ocak	-	1	3	-	-	4
	Şubat	-	1	3	1	1	6
İlkbahar	Mart	-	-	3	-	-	3
	Nisan	2	-	2	-	1	5
	Mayıs	-	2	3	4	-	9
Yaz	Haziran	-	1	2	1	-	4
	Temmuz	1	-	-	-	-	1
	Ağustos	-	-	-	-	-	-
Sonbahar	Eylül	-	-	-	1	-	1
	Ekim	1	1	1	-	1	4
	Kasım	2	-	-	-	1	3
TOPLAM		8	8	18	7	5	46



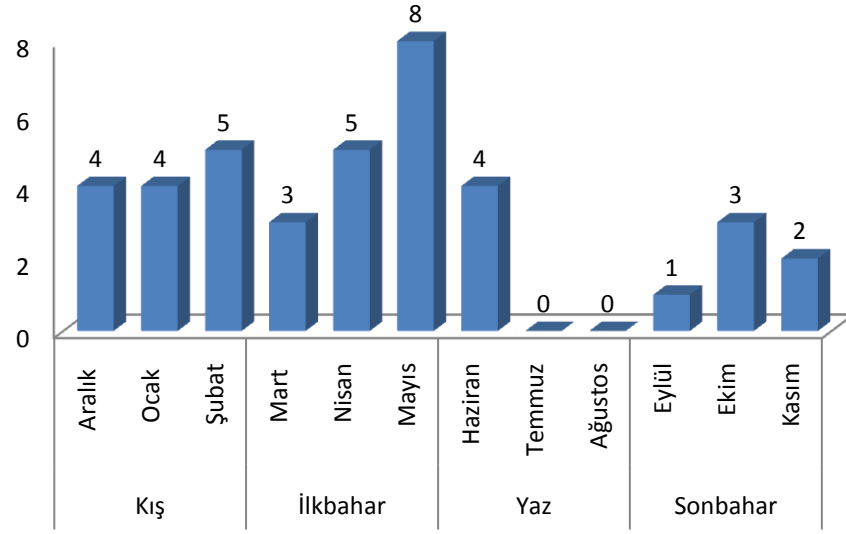
Şekil 14. Listeria Türlerinin Mevsimsel Dağılımı

Sığırlardan yapılan *Listeria* spp. izolasyonlarının dağılımında en yüksek izolasyon ilkbaharda görüldü. Toplam 16 adet *Listeria* spp. izolasyonu Mart 3 adet, Nisan 5 adet ve Mayıs 8 adet olarak dağılım gösterdi. *Listeria* spp. izolasyonu kış mevsiminde toplam 13 olurken, aylara göre dağılımı Aralık 4 adet, Ocak 4 adet ve Şubat 5 adet şeklinde oldu. Sonbahar mevsiminde toplam 6 adet *Listeria* spp. izolasyonu, Eylül 1 adet, Ekim 3 adet ve Kasım 2 adet olarak dağılım gösterdi. Yalnızca 4 adet *Listeria* spp. izolasyonu yaz mevsiminde yapıldı. Haziran ayında 4 adet izolasyon yapılırken, Temmuz ve Ağustos aylarında hiç *Listeria* spp. suşu izole edilmedi. Yıl boyunca en çok *Listeria* spp. suşu 8 adet (% 22.86) Mayıs ayında izole edildi. (Tablo 14 ve Şekil 15).

Koyunlardan yıl boyunca yapılan toplam *Listeria* spp. izolasyon sayısı 7 adet oldu. Mevsim olarak en çok izolasyon Aralık ayında 2 adet ve Şubat ayında 1 adet olmak üzere kış mevsiminde toplam 3 adet yapıldı. Bu sayı koyunlardaki *Listeria* spp. izolasyonu açısından diğer mevsimler ele alındığında en yüksek rakam oldu (Tablo 15).

Tablo 14. Sığır İzolatlarının Mevsimsel Dağılımı

Mevsim	Ay	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Yüzde (%)	Mevsim Toplamı	Yüzde (%)
Kış	Aralık	34	4	11.76	13	12.75
	Ocak	33	4	12.12		
	Şubat	35	5	14.28		
İlkbahar	Mart	35	3	8.57	16	16.35
	Nisan	34	5	14.70		
	Mayıs	35	8	22.85		
Yaz	Haziran	36	4	11.11	4	3.85
	Temmuz	34	-	-		
	Ağustos	34	-	-		
Sonbahar	Eylül	34	1	2.94	6	5.71
	Ekim	35	3	8.57		
	Kasım	36	2	5.55		
TOPLAM		415	39		39	



Şekil 15. Sığır İzolatlarının Mevsimsel Dağılımı

Kış mevsimini, sonbahar Ekim 1 adet ve Kasım 1 adet olmak üzere toplam 2 adet *Listeria* spp. izolasyonu takip etti (Tablo 15).

İlkbahar ve yaz mevsimlerinde Mayıs ve Temmuz aylarında ise birer adet olmak üzere toplam 2 adet *Listeria* spp. izolasyonu yapıldı (Tablo 15).

Aralık ayı 2 adet *Listeria* spp. izolasyonu ile, koyunlardan en çok izolasyonun yapıldığı ay olurken, Ocak, Mart, Nisan, Haziran, Ağustos ve Eylül aylarında hiç izolasyon yapılamadı (Tablo 15).

Tablo 15. Koyun *Listeria* İzolatlarının Mevsimlere Göre Dağılımı

Mevsim	Aylar	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek sayısı	Yüzde (%)	Mevsim Toplamı Pozitif	Yüzde (%)
Kış	Aralık	20	2	10	3	4.48
	Ocak	20	-	-		
	Şubat	27	1	3.70		
İlkbahar	Mart	30	-	-	1	1.11
	Nisan	30	-	-		
	Mayıs	30	1	3.33		
Yaz	Haziran	30	-	-	1	1.15
	Temmuz	30	1	3.33		
	Ağustos	27	-	-		
Sonbahar	Eylül	20	-	-	2	3.33
	Ekim	20	1	5.00		
	Kasım	20	1	5.00		
TOPLAM		304	7		7	

5.4. Örneklerle Göre Dağılımlar

Çalışmada izole edilen *Listeria* spp. suşlarının örnek grubuna göre dağılımına bakıldığında; incelenen 132 adet yem örneğinden (72 adet sığır ve 60 adet koyun) 20 adet, toplam 132 adet (60 adet koyun ve 72 adet sığır) çevre örneğinden 13 adet, toplam 132 adet (72 adet sığır ve 60 adet koyun) fekal örnekten 5 adet, toplam 106 süt örneğinden (75 adet sığır, 35 adet koyun) 2 adet *Listeria* spp. izolasyonu yapıldı. Ancak, toplam 57 adet peynir (28 adet sığır ve 29 adet koyun) ve 28 adet süt tankı svabı örneklerinden hiç *Listeria* spp. izolasyonu yapılamadı (Tablo 16).

Tablo 16. İzolasyonu Yapılan Listeriaların Örneklerle Göre Dağılımı

Örnek	Toplam Örnek	Pozitif Örnek	Yüzde (%)
Yem	132	20	15.91
Çevre	132	13	9.85
Su	132	6	4.55
Dışkı	132	5	3.79
Süt	106	2	1.89
Süt tankı	57	-	-
Peynir	28	-	-
TOPLAM	719	46	

Toplanan örneklerden izole edilen 8 adet *L. monocytogenes* suşlarının örneklerle göre dağılımı 3 adet yem, 3 adet çevre, 1 adet dışkı ve 1 adet su örneği şeklinde oldu. Süt, süt tankı ve peynir örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 17).

Toplanan örneklerden izole edilen 8 adet *L. seeligeri* suşlarının örneklerle göre dağılımı 4 adet yem, 2 adet çevre, 1 adet su ve 1 adet süt örneği şeklinde oldu. Süt tankı ve peynir örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 17).

Toplanan örneklerden izole edilen 18 adet *L. innocua* suşlarının örneklerle göre dağılımı 5 adet yem, 6 adet çevre, 4 adet dışkı, 2 adet su ve 1 adet süt örneği şeklinde oldu. Süt tankı ve peynir örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 17).

Toplanan örneklerden izole edilen 7 adet *L. grayi* suşlarının örneklerle göre dağılımı 4 adet yem, 2 adet çevre ve 1 adet dışkı örneği şeklinde oldu. Süt, süt tankı, peynir ve su örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 17).

Toplanan örneklerden izole edilen 5 adet *L. welshimeri* suşlarının örneklerle göre dağılımı 4 adet yem ve 1 adet su örneği şeklinde oldu. Süt, süt tankı, peynir, dışkı ve çevre örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 17).

Tablo 17. *Listeria* Türlerinin Örneklere Göre Dağılımı

Örnek	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.welshimeri</i>
Süt	-	1	1	-	-
Süt tankı	-	-	-	-	-
Peynir	-	-	-	-	-
Dışkı	1	-	4	1	-
Yem	3	4	5	4	4
Su	1	1	2	-	1
Çevre	3	2	6	2	-
TOPLAM	8	8	18	7	5

Sığır örneklerinden izole edilen 7 adet *L. monocytogenes* suşlarının örneklere göre dağılımı 3 adet yem, 2 adet çevre, 1 adet dışkı ve 1 adet su örneği şeklinde oldu. Süt, süt tankı ve peynir örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 18).

Sığır örneklerinden izole edilen 17 adet *L. innocua* suşlarının örneklere dağılımı 6 adet çevre, 5 adet yem, 3 adet dışkı, 2 adet su ve 1 adet süt örneği şeklinde oldu. Süt tankı ve peynir örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 18).

Sığır örneklerinden izole edilen 7 adet *L. seeligeri* suşlarının örneklere göre dağılımı 3 adet yem, 2 adet çevre, 1 adet süt ve 1 adet su örneği şeklinde oldu. Süt tankı, peynir ve dışkı örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 18).

Sığır örneklerinden izole edilen 5 adet *L. grayi* suşlarının örneklere göre dağılımı 3 adet yem ve 2 adet çevre örneği şeklinde oldu. Süt, süt tankı, peynir, dışkı ve su örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 18).

Sığır örneklerinden izole edilen 3 adet *L. welshimeri* suşlarının örneklere göre dağılımı 2 adet yem ve 1 adet su örneği şeklinde oldu. Süt, süt tankı, peynir, dışkı ve çevre örneklerinden izolasyon yapılamadı (Tablo 18).

Tablo 18. Sığır İzolatlarının Örneklere Göre Dağılımları

Örnek	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L.welshimeri</i>
Süt	-	1	1	-	-
Süt tankı	-	-	-	-	-
Peynir	-	-	-	-	-
Dışkı	1	-	3	-	-
Yem	3	3	5	3	2
Su	1	1	2	-	1
Çevre	2	2	6	2	-
TOPLAM	7	7	17	5	3

Koyun çiftliklerinden toplanan örneklerden 7 adet *Listeria* spp. izolasyonu yapıldı. Bu izolatlar isimlendirildikten sonra, 1 adet *L. monocytogenes* çevre, 1 adet *L. seeligeri* yem, 1 adet *L. innocua* dışkı, 2 adet *L. grayi* yem ve dışkı, 2 adet *L. welshimeri* yem örneklerinden izole edildi. Koyun çiftliklerinin süt, süt tankı, peynir ve su örneklerinde izolasyon yapılamadı (Tablo 19).

Tablo 19. Koyun İzolatlarının Örneklere Göre Dağılımları

Örnek	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L.welshimeri</i>
Yem	-	1	-	1	2
Çevre	1	-	-	-	-
Dışkı	-	-	1	1	-
TOPLAM	1	1	1	2	2

5.5. *L. monocytogenes* İzolatlarının Dağılımları

Toplam 719 süt, süt tankı, peynir, su, yem, fekal ve çevresel örneklerden 7 adet sığır ve 1 adet de koyun olmak üzere toplam 8 adet *L. monocytogenes* suşu izole edildi (Tablo 20).

Tablo 20. *L. monocytogenes* İzolatlarının Hayvan Türlerine Göre Dağılımı

Örnek	Toplam Örnek	Pozitif Örnek	Yüzde %
Sığır	415	7	1.69
Koyun	304	1	0.33
TOPLAM	719	8	1.11

Toplam 132 adet yem örneğinden 3 adet *L. monocytogenes* suşu izole edildi. Yine aynı sayıdaki çevresel örneklerden de 3 adet *L. monocytogenes* izolasyonu yapıldı. Fekal (132 adet) ve su örneklerinden (132 adet) birer adet olmak üzere toplam 2 adet *L. monocytogenes* izolasyonu yapıldı. Süt (106 adet), peynir (57 adet) ve süt tankı (28 adet) örneklerinden ise *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmadı (Tablo 21).

Tablo 21. *L. monocytogenes* İzolatlarının Örneklere Göre Dağılımı

	Toplam Örnek	Pozitif Örnek	Yüzde %
Süt	106	-	-
Peynir	57	-	-
Süt tankı	28	-	-
Fekal	132	1	1.39
Yem	132	3	4.17
Su	132	1	1.39
Çevre	132	3	4.17
TOPLAM	719	8	

Sonbahar mevsimi 3 adet *L. monocytogenes* ile en çok izolasyonun yapıldığı mevsim oldu. Devamında kış mevsiminde 2 adet ve ilkbahar mevsiminde 2 adet olmak üzere toplam 4 adet *L. monocytogenes* izole edildi. Yaz mevsiminde ise yalnızca 1 adet *L. monocytogenes* izole edildi (Tablo 22).

Çevresel örneklerden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının 2 adedi sığırlara ait çevresel örneklerden Ekim ve Aralık aylarında, 1 adedi ise koyunlara ait çevresel örneklerden izole edildi (Tablo 22).

Yem örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının tamamı (3 adet) sığırlara ait yemlerden Nisan, Kasım ve Aralık aylarında izole edildi. Koyunlara ait yem örneklerinden *L. monocytogenes* izole edilmedi (Tablo 22).

Fekal örnekten izole edilen bir adet *L. monocytogenes* izolatu ise sığırlardan alınan örneklerden olup, Kasım ayında izole edildi. Koyunlara ait fekal örneklerden *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmadı (Tablo 22).

Su örneklerinden izolasyonu yapılan 1 adet *L. monocytogenes* izolatu ise sığırlara ait su örneklerinden Nisan ayında izole edildi. Koyunlara ait su örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmadı (Tablo 22).

Ayrıca sığırlara ait süt, peynir ve süt tankı ve koyunlara ait süt, peynir örneklerinden *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmadı (Tablo 22).

Tablo 22. *L. monocytogenes* İzolatlarının Mevsimsel Dağılımı

Mevsim	Aylar	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek	Yüzde %	Mevsim Toplamı	Yüzde %
Kış	Aralık	62	2	3.23	2	1.05
	Ocak	65	-	-		
	Şubat	64	-	-		
İlkbahar	Mart	65	-	-	2	1.03
	Nisan	66	2	3.03		
	Mayıs	64	-	-		
Yaz	Haziran	61	-	-	1	0.59
	Temmuz	54	1	1.85		
	Ağustos	55	-	-		
Sonbahar	Eylül	56	-	-	3	1.84
	Ekim	54	1	1.85		
	Kasım	53	2	3.77		
TOPLAM		719	8		8	

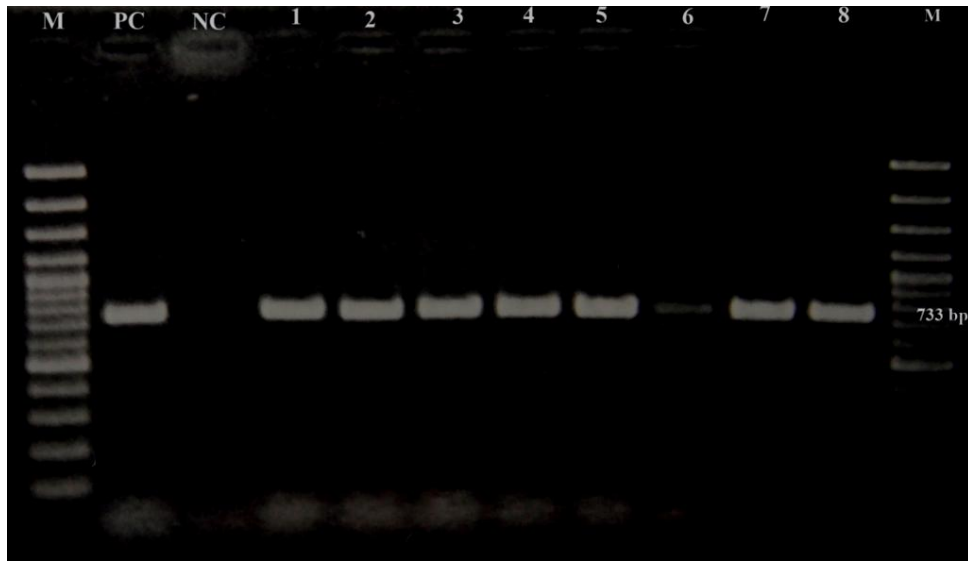
5.6. *L. monocytogenes* İzolatlarının *AluI* ve *Tsp509I* Restriksiyon

Enzimleri RFLP Tiplendirilmesi

L. monocytogenes izolatlarının PCR-RFLP ile tiplendirilmesinde PCR ürünlerinin *AluI* ve *Tsp509I* restriksiyon enzimleriyle muamelesinin ardından agaroz jelde yürütülmesi neticesinde oluşan profil görüntüleri elde edildi (Tablo 23). PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilmeden önce PCR ürünlerinin varlığını doğrulamak için agaroz jelde elektroforezde yürütüldü ve UV'de görüntülendi (Şekil 16).

Tablo 23. İzolasyonları Yapılan *L. monocytogenes* Suşlarının RFLP Profillerinin Restriksiyon Enzimlerine Göre Dağılımı

Restriksiyon Enzimi	Profil	İzolat Sayısı	Bant Sayısı	Suş No
<i>AluI</i>	Profil 1	4	3	1, 3, 7, 8
	Profil 2	4	3	2, 4, 5, 6
<i>Tsp509I</i>	Profil 1	5	3	1, 3, 6, 7, 8
	Profil 2	3	4	2, 4, 5



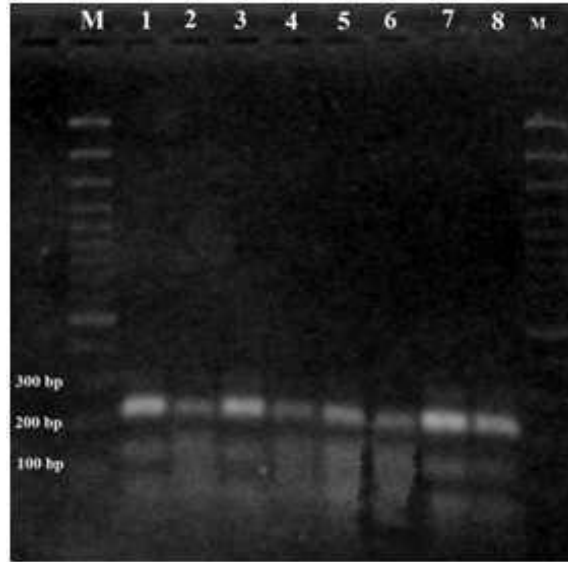
Şekil 16. *L. monocytogenes* İzolatlarının PCR-RFLP Tiplendirmesi için Çoğaltılan Ürünlerin Agaroz Jelde Görüntülenmesi (1-8 no: *L. monocytogenes*, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, M: Marker)

AluI restriksiyon enzimiyle *L. monocytogenes* suşlarının kesiminde toplam iki farklı profil elde edildi. Toplam 4 adet *L. monocytogenes* izolatında (1, 3, 7 ve 8 numaralı) 3 bantlı benzer profil elde edildi. Diğer izolatlarda (2, 4, 5 ve 6 numaralı) ise 2 bantlı benzer profil elde edildi (Şekil 17).

Üç bantlı profil elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının tümü (1, 3, 7 ve 8 numaralı) sığır çiftliklerine ait idi. Üç ve 8 numaralı izolatlar aralık ayına ait sırasıyla yem ve çevresel örneklerden izole edilmişlerdi. Ayrıca 3 ve 7 numaralı izolatlar aynı çiftlikten sırasıyla Aralık ve Kasım aylarında izole edilmişti. Yedi

numaralı izolat sığır fekal örneğinden izole edildi. Bir numaralı izolat farklı bir çiftlikten Ekim ayına ait çevresel örneğe ait idi.

İki bantlı benzer profil sergileyen *L. monocytogenes* (2, 4, 5 ve 6 numaralı) izolatlarından 2 numaralı izolat koyun çiftliği çevre örneği olup Temmuz ayında izole edilmesine rağmen, diğer izolatlar sığır çiftliklerindendi. Ayrıca 4 ve 6 numaralı izolatlar aynı sığır çiftliğinden sırasıyla Kasım ve Nisan aylarında, 5 numaralı izolat ise farklı sığır çiftliğinden alınan yem örneğinden Nisan ayında izole edildi.

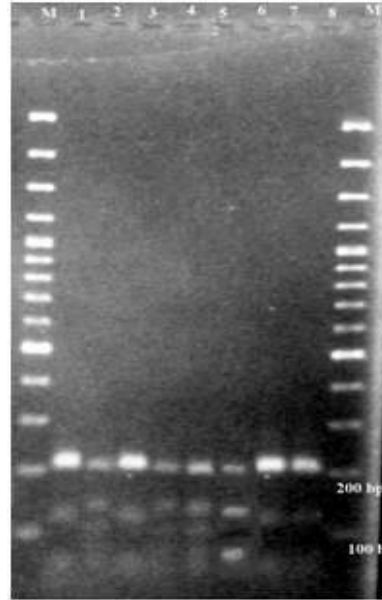


Şekil 17. *AluI* ile Muamele Edilmiş PCR-RFLP Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü (1-8 numara: *L. monocytogenes*, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, M: Marker)

Tsp509I restriksiyon enzimiyle *L. monocytogenes* izolatlarının kesimi sonucunda 1, 3, 6,7 ve 8 numaralı izolatlarda 3 bantlı benzer profil gözlemlendi. İki, 4 ve 5 numaralı *L. monocytogenes* izolatlarında ise 4 bantlı benzer profil gözlemlendi. Toplamda *Tsp509I* enzimi ile kesim sonucunda 2 farklı profil elde edildi (Şekil 18).

Üç bantlı benzer profil elde edilen izolatların (1, 3, 6, 7 ve 8 numaralı) tümü sığır çiftliklerine ait örneklerden izole edildi. Altı ve 8 numaralı izolatlar aynı çiftlikten sırasıyla Nisan ve Aralık aylarında alınan su ve çevre örneklerine ait idi. Diğer izolatlar (1, 3 ve 7) sırasıyla Ekim, Aralık ve Kasım aylarında çevresel, yem ve fekal örneklerden izole edildi.

Dört bantlı benzer profillerin elde edildiği izolatlardan 2 numaralı izolat koyun çiftliğindeki çevre örneğinden Temmuz ayında izole edildi, 4 ve 5 numaralı izolatlar ise sırasıyla Aralık ve Kasım aylarında yem örneklerinden izole edildi.



Şekil 18. *Tsp509I* ile Muamele Edilmiş PCR-RFLP Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü (1-8 numara: *L. monocytogenes*, PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, M: Marker)

5.7. *L. monocytogenes* İzolatlarının HLWL74 ve HLWL85 Primerleri ile RAPD Tiplendirmesi

Koyun ve sığırlardan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının HLWL74 ve HLWL85 primerleri ile RAPD analizleri yapıldı (Tablo 24).

Tablo 24. İzolasyonları Yapılan *L. monocytogenes* Suşlarının HLWL 74 ve HLWL85 Primerleri ile RAPD Tiplendirme Sonuçları

Primer	Profil	İzolat Sayısı	Bant Sayısı	Suş No
HLWL 74	Profil 1	4	4	1, 3, 5, 7
	Profil 2	2	2	2, 4
	Profil 3	1	1	6
	Profil 4	1	1	8
HLWL 85	Profil 1	3	3	2, 5, 6
	Profil 2	1	2	1
	Profil 3	1	2	7
	Profil 4	1	3	8
	Profil 5	1	1	4
	Profil 6	1	3	3

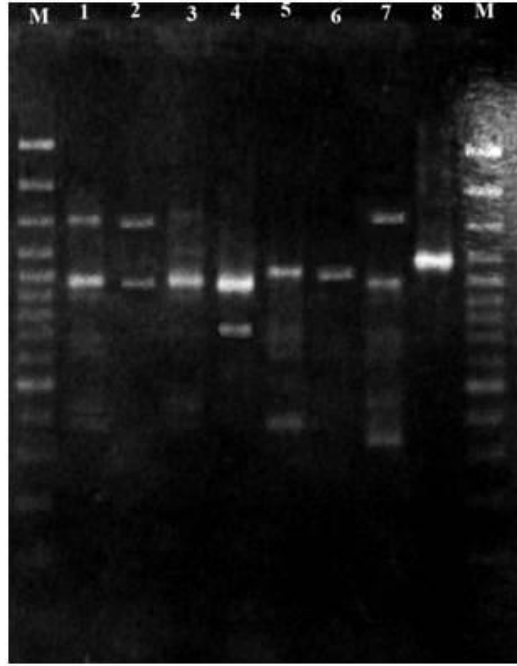
HLWL74 primeri ile analizinde 4 adet izolat (1, 3, 5 ve 7 numaralı izolatlar) benzer görünümlü 4 bantlı profil gösterdi. İki bantlı fakat farklı görünüm sergileyen suşlar ise 2 ve 4 numaralı *L. monocytogenes* izolatları oldu. Geriye kalan 6 ve 8 nolu izolatlar ise birbirinden farklı tek bantlı profil sergilediler. Sonuç olarak, HLWL74 primerleri ile 4 farklı profil ve 1-4 arası sayıda bantlar elde edildi (Şekil 19).

Benzer profil gösteren *L. monocytogenes* izolatları (1, 3, 5 ve 7 nolu) sırayla Ekim, Aralık, Nisan ve Kasım aylarında izole edilen suşlardır. Bu izolatların ortak yönü ise tümünün sığırlardan elde edilmiş olmalarıdır. Yine sırasıyla bu ortak profile sahip *L. monocytogenes* suşları yine sırasıyla çevre, yem ve fekal örneklerden izole edilmişlerdi. Üç ve 7 numaralı *L. monocytogenes*

izolatları aynı sığır çiftliğine ait idi. Ancak 1 ve 5 numaralı izolatlar farklı sığır çiftliklerinden izole edildi.

Birbirinden farklı ancak 2 bantlı profil sergileyen *L. monocytogenes* suşları (2 ve 4 numaralı) ise sırasıyla Temmuz ve Kasım aylarına ait koyun ve sığır örnekleridir. İki numaralı suş çevresel, 4 numaralı ise yem örneklerinden farklı çiftliklerden izole edilmişlerdi.

Yine birbirinden farklı ancak tek bantlı profil sergileyen 6 ve 8 numaralı *L. monocytogenes* izolatları aynı çiftlikten Nisan ve Aralık aylarında sığırlara ait su ve çevresel örneklerden izole edilmişlerdi.



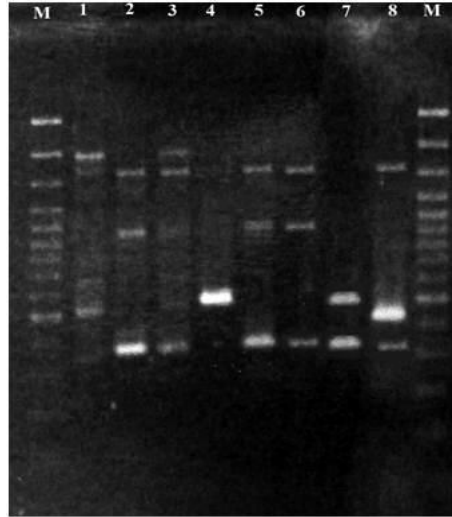
Şekil 19. *L. monocytogenes* İzolatlarının HLWL74 Primeri ile RAPD Tiplendirmesi (1-8 no *L. monocytogenes* izolatları, M:Marker)

HLWL85 primeri ile 3 adet izolatta (2, 5 ve 6 numaralı) birbirine benzeyen 3 bantlı profil elde edildi. Geriye kalan 1, 3, 4, 7 ve 8 numaralı izolatlar ise

sırasıyla kendilerine özgü ikili, tekli, ikili, üçlü ve tekli bant profilleri elde edildi. Sonuç olarak toplam 6 profil ve 1-3 arası sayıda bantlar elde edildi (Şekil 20).

Benzer profil elde edilen 2, 5 ve 6 numaralı *L. monocytogenes* izolatları farklı çiftliklere ait örneklerden idi. İki numaralı izolat koyun çiftliğindeki çevre örneklerinden Temmuz ayında elde edildi. Beş ve 6 numaralı izolatlar ise Nisan ayında farklı sığır çiftliklerindeki yem ve su örneklerinden izole edildi.

Spesifik bantlı profil sergileyen 1, 3, 4, 7 ve 8 numaralı *L. monocytogenes* izolatlarının tamamı sığır çiftliklerine ait örneklerden elde edilmişti. Farklı profil göstermelerine rağmen 4 ve 8 numaralı *L. monocytogenes* izolatları aynı sığır çiftliğine ait yem ve çevre örneklerine ait iken, diğer izolatlar farklı çiftliklere ait idi. Üç ve 8 numaralı izolatlar Aralık, 4 ve 7 numaralı izolatlar Kasım ve 1 numaralı izolat da Ekim ayında izole edildi. Bir, 3 ve 7 numaralı izolatlar ise sırasıyla çevresel, yem ve fekal örneklerden izole edildi.



Şekil 20. *L. monocytogenes* İzolatlarının HLWL85 Primeri ile RAPD Tiplendirmesi (1-8 no: *L. monocytogenes*, M: Marker)

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada gelişmiş ülkelerin önemli hastalıkları arasında yer bulan, ancak Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde ciddiyeti göz ardı edilen listeriosis hastalığının hayvanlarda, bu hayvanların ürünlerinden üretilen gıdalarda ve bu hayvanların etkileşimde bulunduğu çevredeki listeria varlığının ortaya konması öncelikli amaç oldu. Devamında ise zoonoz ve patojen *L. monocytogenes*'in genetik polimorfizmi moleküler teknikler ile ortaya konularak, bu bakteri için insanlar ve hayvanlar için kontaminasyon kaynaklarının ve geçiş noktalarının ortaya konulması amaçlandı. Ayrıca başta *L. monocytogenes* olmak üzere listeria genusundaki diğer üyeler için de (*L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. seeligeri*) mevsimsel varyasyonları incelenerek, bu bakterilerin prevalansları ve tabiatta yaşama tutunma mekanizmaları açıklanmaya çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda öncelikle etken izolasyonları ve spesifik PCR işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlemler neticesinde Elazığ ve civarındaki koyun ve sığır çiftliklerinden toplanan süt, peynir, süt tankı, su, yem, dışkı ve çevre örneklerinin % 6.40'ından, koyun çiftliklerine ait örneklerin % 2.30'undan, sığır çiftliklerine ait olanların % 9.40'ından *Listeria* spp. izole ve identifiye edildi. Bu izolatların da toplam % 56.52'si insan ve hayvanlar için patojeniteye sahip olarak identifiye edildi. Bu oranın % 39.13'ü hem koyun ve sığırlar için patojen *L. innocua* ve % 17.39'u ise zoonoz patojen *L. monocytogenes* olarak tespit edildi. Listeriaların varlığını araştırmak üzerine, dünyada çok çeşitli hayvan, materyaller ve ortamlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların tümünde çok farklı oranlarda *Listeria* spp. izole edildiği bildirilmiştir. Elazığ ve civarında yapılan veya Türkiye'de yapılan çalışmalar (1, 12, 35, 41) dikkate alındığında bildirilen

oranların biraz yüksek olduğu düşünülebilir. Oranlardaki farklılıklar yetiştiricilerin bilinçsiz antibiyotik kullanmasından dolayı listeriaların direnç geliştirmesinden, ortamda yarışmacı bakterilerin varlığı, zenginleştirme metotlarının farklılığı gibi sebeplerden kaynaklanabilir. Elazığ ve bölgesinde daha önce yapılan çalışmalarda *Listeria* spp. varlığının Ertaş (42) tarafından % 1.6, Çetinkaya ve ark. (35) % 0.94, Arslan ve ark. (11) % 5.6, Kalender (65) % 4.36-0.58, Ertaş ve ark. (41) % 6.6 tespit edildiği bildirilmiştir. Fakat son yayınlanan çalışma balıklar üzerine olduğundan, Elazığ ve çevresinde uzun zamandır listeriaların varlığı hakkında fikir sahibi olunacak bir çalışmanın yapılmadığı görülmektedir. Koyun ve sığırlar üzerine çeşitli ülkelerden bildirilmiş ve yapılmış çalışmalar bulunmasına rağmen, bölgedeki koyun ve sığırlarda *Listeria* spp. varlığı ile ilgili yapılmış çalışma olmadığından bilgiler de mevcut değildir. Son 20 yıl içinde bölgede yapılmış listeria çalışmalarından elde edilen *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* oranları sebebiyle, araştırmacılar listeriaların ve yaptıkları hastalıkların bölge için önemli olmadığı kanaatine varmışlardır. Türkiye’de yapılan çeşitli listeria çalışmalarında elde edilen bulgular dünyadaki benzerleriyle paralellik göstermekte ve ve bu kaynaklarda % 4 ile % 70 arasında değişen oranlarda *Listeria* spp. varlığına işaret edilmektedir (16, 21, 65, 87, 105, 108). Gelişmiş ülkelerde oldukça önem gösterilen listerialara, ülkemizde de hak ettiği önemin verilmesi gerektiği açıktır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, listeria varlığı dikkat çekmesi gereken oranlarda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca listeria varlığı açısından koyun ve sığır çiftlikleri arasında fark olduğu ve bu farkın sığır çiftlikleri lehine yüksek olduğu bulunmuştur. Koyun çiftliklerinde oranın düşük olduğu başka çalışmalarda da bildirilmiştir (81).

Listeriaların ve oluşturdukları hastalıkların hayvan sahipleri tarafından pek bilinmemesi ve dikkate alınmamasından dolayı genelde bir tedavi uygulanmamaktadır. Yapılmış olan bilimsel çalışmalarda yüksek oranlarda *Listeria* spp. varlığının bildirilmesinin sebebi olarak bu durum, ileri sürülmektedir. Yetiştiricilerin listeriosis ile ilgili Őikyetlerinin de özellikle sinirsel formu ile seyretmesi durumunda önemsendiği bildirilmektedir (16). Ayrıca oranların yüksekliğinde, listeriaların doğal yaşam vrelerinin oldukça geniş olması ve zor Őartlara karşı dayanıklılık kabiliyetlerinin bulunmasının da etkili olduğu söylenmektedir (86). Zor vre Őartlarına bile dayanıklı bu bakterilerin insanlar için kontaminasyon kaynaklarının Türkiye açısından neler olduğunu bulmaya yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakterilerin öneminin anlaşılamamasının bu konuda da etkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada yapılan tür spesifik PCR sonucunda 8 adet izolat *L. monocytogenes* olarak identifiye edildi. Bu izolatlarda *internalin A* proteinini sentezleyen genin varlığı yine PCR ile araştırıldıktan sonra, bu geni taşıyan suşlardaki genetik polimorfizm araştırıldı. *Internalin A* proteinleri patojen listeriaların konakçı hücrelerine tutunmalarını ve yaşamını sürdürmesine yardımcı olan başlıca proteinlerdendir. Ayrıca birkaç çalışmada bu proteinlerin sentezlenmesini baskılayarak *attenuate L. monocytogenes* suşları elde edilmiştir (94). Yapılan *inl A* genlerine yönelik sekans analizleri bu genlerde nokta mutasyonların olduğunu göstermiştir (84). Dolayısıyla patojeniteden başlıca sorumlu bu gendeki değişikliklerin ortaya konması ile *L. monocytogenes* suşlarının hastalık yapabilme kabiliyetleri daha kolay anlaşılabilir. Rousseaux ve ark. (93) tarafından yapılan 37 adet *L. monocytogenes* izolatının kullanıldığı bir

çalışmada *AluI* restriksiyon enzimi kullanılarak 5 farklı profil ve 8 ile 11 arasında bantlar tespit edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada sığır çiftliklerinden 7 adet ve koyun çiftliklerinden izolasyonu yapılan 1 adet *L. monocytogenes* izolatında *AluI* ile toplam 5 bantlı 2 farklı profil elde edilirken, *Tsp509I* restriksiyon enzimiyle ise 3 ile 4 arasındaki bant sayısına sahip iki farklı profil görüldü. Üç bantlı profile sahip *L. monocytogenes* izolatları 8 suşun 6'sında gözlemlendi. Bu çalışmada elde edilen profil sayıları ve baskın profillerin dağılımı açısından Rousseaux ve ark. (93) nın yaptığı çalışmaya göre daha fazla homojenite saptandı. Dünyanın diğer bölgelerinde yapılan çalışmalarda, 14 ve daha fazla *L. monocytogenes* izolatında toplam 3-15 bantlara sahip, 4 ile 10 arasında farklı restriksiyon profilleri gösteren sonuçlar bildirilmiştir (68, 106). Bu çalışmada elde edilen *L. monocytogenes* suşlarının daha homojen bir dağılım göstermesi, *inl A* genlerinin daha az mutasyon geçirdiğini göstermektedir. Farklı profillere sahip *L. monocytogenes* suşlarının daha invaziv özelliklere daha fazla sahip olabileceği ya da en azından *inl A* genindeki mutasyonların daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Bu durumda *L. monocytogenes* hücrelerinin daha farklı invaze olma yolları deneyebileceği düşünülebilir. Ülkemizin diğer bölgelerinde de *inl A* polimorfizminin saptanmasına yönelik yapılacak benzer çalışmalar ile listeriosis vakalarından elde edilen *L. monocytogenes* izolatları arasında epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konmasının, daha etkili koruma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından faydalı bilgiler sağlayacağı açıktır.

Pek çok bilim adamı tarafından, çiğ süttten izole ve identifiye edilen *Listeria* spp. suşlarının kaynağının, sütlerin depolanması ve taşınması sırasında

fekal ve çevresel kontaminasyon ve çiftliklerdeki enfekte hayvanlardan bulaştığı bildirilmektedir (19, 66). Bu çalışmada izole ve tanımlanmış *Listeria* spp. izolatlarının, süttten izole edilen 2 adet suş dışında, toplam 44 suşun tamamı dışkı, yem, su ve çevresel örneklerden izole edildi. Sığır ve koyun çiftlikleri ve listeriaların kontaminasyonu dikkate alındığında bu örnekler arasında bulaşmaların kolaylıkla olabileceği düşünülmektedir. Süt sağımından sonra süttün çiftlik ve çevresinde bekletilme süresi ve süttün sağım yöntemi, *Listeria* spp. kontaminasyonu açısından önem kazanmaktadır. Bu çalışmada süt sağım makinelerinin süt tanklarından 28 adet örnek incelendi, fakat *Listeria* spp. izolasyonu yapılmamasına rağmen, ancak Leite ve ark. (69) süt sağım ekipmanlarından ve süt tanklarından *Listeria* spp. izolasyon ve tanımlanması yaptıklarını bildirmiştir. Bu çalışmada süt, peynir ve süt tankı örneklerinde *L. monocytogenes* izolasyonunun olmamasına rağmen, süt örneklerinden izole edilen iki adet *Listeria* spp. suşunun (*L. innocua* ve *L. seeligeri*) olması, süt, peynir ve süt tanklarında da çevre ve hayvanlarla etkileşimden dolayı bir kontaminasyonun olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada yapılan RAPD tiplendirmeleri ortak profile sahip *L. monocytogenes* izolatlarının farklı ve aynı çiftliklerdeki çevre, yem ve su örneklerine ait olduklarını gösterdi. Ayrıca süttün sağımından sonra ve peynir yapım aşamasında çiftlik çevresinde tutulması *Listeria* spp. kontaminasyon riskini arttırmaktadır (66). *Listeria* enfeksiyonlarının hayvan, gıda, yem, çevre ve insanlar arasında taşınması ve epidemiyolojisinde, bu çalışma sonuçları düşünüldüğünde *Listeria* spp. kontaminasyon kaynaklarının süt sağımı işlemi, depolama ve süttlerin taşınması esnasındaki yetersiz hijyen tedbirlerinden ya da hiçbir şekilde hijyenin düşünülmemesinden kaynaklandığı açıktır.

Nightingale ve ark. (82), *L. monocytogenes*'in prevalansının mevsimsel değişikliklerini incelediklerinde, sığır, koyun ve keçi çiftliklerinde kış mevsiminde özellikle de dışkı, yem ve depolarda en üst seviyeye çıktığını bildirmişlerdir. Guerini ve ark. da (53), listeria prevalansının sıcak mevsimlere göre soğuk geçen mevsimlerde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hutchinson ve ark. (62) da *Listeria* spp. suşları için sığırlarda yaptıkları çalışmada buldukları mevsimsel farklılıkların soğuk ve yağışlı mevsimlerde istatistiksel açıdan önemli farklılıklara sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada koyun ve sığır çiftliklerinde *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* izolatları için sırasıyla kış % 8.38 ve % 1.05, ilkbahar % 8.72 ve % 1.03, yaz % 2.91 ve % 0.59, sonbahar % 4.94 ve % 1.84 olarak prevalans tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* suşları dikkate alındığında mevsimsel varyasyon açısından belirgin bir farklılık görünmemesine rağmen, *Listeria* spp. olarak ele alındığında ise mevsimler arasında izolasyonlarda farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu bulgulara göre yukarıda bahsedilen iki çalışma ile mevsimsel varyasyonlar bakımından paralellik bulunduğu görülmektedir. Türkiye'de ise Abay (1) yaptığı çalışmada sağlıklı sığırların dışkılarında *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* izolasyonları yaptığını ve sırasıyla sonbahar % 59 ve % 9, kış % 61 ve % 8, ilkbahar % 39 ve % 6, yaz mevsiminde ise % 36 ve % 4 olarak bulunduğunu bildirmişir. Bu çalışmada elde edilen mevsimsel varyasyon sonuçlarında *Listeria* spp. prevalansı yaza ve kurak aylara doğru azalmakta ve bu konudaki literatür bilgilerine uyum göstermektedir. Bu çalışmaya kadar, listerialar ile ilgili mevsimsel varyasyonlar konusunun Türkiye açısından açıklığa kavuşturulması için yapılmış ayrıntılı başka bir çalışma bulunmamaktadır. Dünyada yapılan benzer çalışmalarda, örneğin, Ho ve ark. (60) yaptıkları

çalışmada *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* için mevsimsel prevalansı sırasıyla kış % 13.7 ve % 3.8, bahar % 16.6 ve % 2.1, yaz % 13.9 ve % 3.8, sonbahar % 14.6 ve % 4 olarak bildirmelerine rağmen, mevsimsel prevalansların aralarında önemli bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Yine de, yaz mevsiminde *L. monocytogenes* prevalansında % 2.1 ile en düşük oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Listeriaların mevsimsel prevalansları arasındaki farkların sebeplerini, Ryser (94) ise hayvanların silaj yemleriyle beslenmesine bağlı olduğunu açıklamıştır. Bu çalışmada kullanılan çiftliklerden özellikle, sığır çiftliklerinde sonbahar ve kış mevsimlerinde silajlı yemlerle beslemenin yapıldığı, ancak koyun çiftliklerinde böyle bir durumun olmadığı yetiştiriciler tarafından söylenmiştir. Bu bilgiden hareket edildiğinde, mevsimsel sıcaklıkların, yağışların, toprak ve çevre gibi farklılıkların mevsimsel varyasyonlarda rol oynadığı fikri daha kuvvet kazanmaktadır. Mevsimsel varyasyonlarla ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, listeriaların çok farklı çevre şartlarında (sıcaklık, güneş, yağış, oksijen yoğunluğu, pH, besin gibi) bile hayatlarını sürdürebilme kabiliyetine sahip olduklarını göstermektedir.

L. monocytogenes suşlarının *inl* A RFLP analizinde elde edilen verilerin güvenilirliğini desteklemek amacıyla, *AluI* ve *Tsp509I* olmak üzere iki farklı restriksiyon enzimi kullanıldı. Restriksiyon sonuçlarına bakıldığında, genel olarak profil ve band profil sayıları bakımından önemli bir fark bulunmamasına rağmen, gözlenen profiller arasında iki enzimin ayırım güçleri bakımından *L. monocytogenes* suşları arasında bazı küçük farklılıklar da tespit edildi. Bu çalışmada, her iki enzimle 3 bantlı izolatların % 62.5'inde (5/8) benzerlik tespit edildi. Restriksiyon işlemlerinde benzerlikte böyle bir durum ile karşılaşılması,

enzim seçiminin restriksiyon ile tiplendirmede ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Restriksiyon analizlerinde daha güvenilir sonuçlar elde etmek için iki veya daha fazla enzim kullanımının daha faydalı olacağı ortaya çıkmaktadır.

Ayrıca bu çalışmada izole edilen *L. monocytogenes* suşlarının RAPD tiplendirmesi sonucunda, HLWL 74 primeri ile 4, HLWL 85 primeri ile 6 adet farklı profil elde edildi. Baskın profiller HLWL 74 ile % 50 (4/8), HLWL 85 ile % 37.5 (3/8) oranında temsil edildi. Ancak, Yoshida ve ark. (116), 4 farklı primer ile toplam 20 izolat arasında 18, Martinez ve ark. (77) toplam 432 adet *L. monocytogenes* suşunun Eric-2, M-01, P2 ve M-013 primerleri kullanarak toplam 242, Leite ve ark (69), UBC127 primeri ile 14, UBC 155 primeri ile 4 ve HLWL 85 primeri ile 9 farklı, Kerouanton ve ark. (68) 13 farklı profil elde ettiğini bildirmiştir. Bu araştırmacıların yanında Czajka ve Batt (34) ise HLWL 74 primeri ile tek ya da çift bantlı benzer profiller elde ettiğini ve tek primer ile *L. monocytogenes* izolatlarında RAPD tiplendirmenin yarar sağlamadığını ve birden fazla primer ile RAPD tekniği ile moleküler tiplendirmenin yarar sağlayabileceğini bildirmiştir. Bu araştırmacıların yapmış oldukları RAPD tiplendirmelerinde daha fazla profil elde etmelerine sebep olarak, kullandıkları *L. monocytogenes* izolatlarının sayılarının çok olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Buna rağmen, Aguado ve ark. (2) bu çalışmadan daha çok sayıda *L. monocytogenes* suşu kullanarak aynı primerler ile RAPD tiplendirme yapmalarına rağmen, toplam 13 *L. monocytogenes* izolatında toplam 6 profil elde etmişlerdir. Yukarıda bahsedilen araştırmalara göre, profil sayılarındaki farklılıkların, farklı çevrelerden, gıdalarda veya konakçılardan izolasyonların olması yanında, çevresel faktörlerin, primer seçiminin farklı olması ve yukarıda

bahsi geçen çalışmalarda çok geniş hayvan ve insan popülasyonlarından elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarının kullanılmasından kaynaklanabildiği bildirilmektedir. Ayrıca, RAPD sonuçlarının analizinde, gelde görülen parlak ve temiz bantların yanı sıra silik bantların da bulunması, çalışmada elde edilen verilerin yorumlanmasında farklı değerlendirmelere sebep olabilmektedir. Bu durumlara engel olabilmek için, RAPD analizi yapılırken, farklı primerlerin denemeleri yapıp optimizasyonları sağlandıktan sonra en uygun primerin veya primerlerin seçilmesi ve yapılan analizlerin en az iki kere tekrar edilmesinin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

Ertaş (42), Elazığ bölgesinde yaptığı bir çalışmada koyun sütlerinden 4 adet *Listeria* spp. izole edildiğini ve hiç *L. monocytogenes* identifiye edilmediğini bildirirken, Kalender (65) ise aynı bölgedeki koyunların dışkılarından % 0.58 oranında *L. monocytogenes* izole ve identifiye edildiğini bildirmiştir. Bu çalışmada ise koyunlardan toplanan örneklerden (süt, peynir, dışkı, yem, su ve çevresel) % 2.3 oranında *Listeria* spp. izole edilirken, bunların yalnızca biri *L. monocytogenes* olarak identifiye edilmiştir. Bazı araştırmacılar listeria görülme sıklığının silaj yemlerle beslenen ruminantlara bağlı olarak değiştiğini, dolayısıyla silaj yemlerle beslenen sığırlarda daha fazla listeria izolasyonunun yapılacağını bildirmişlerdir (61, 82). Bu çalışmada örneklerin toplandığı bölge dikkate alındığında, koyun yetiştiricilerinin genelde koyun rasyonlarında silaj yemler kullanmadığı, mera, kuru ve yeşil ot ağırlıklı bir beslenme programı uyguladıkları, yetiştiriciler tarafından söylenmektedir. Ayrıca bu çalışmada koyun çiftliklerinden elde edilen 1 adet *L. monocytogenes* suşunun olması sebebiyle, suşların çiftlikler veya koyunlar, gıda, yem ve çevre örnekleri arasındaki farklılıklar,

kontaminasyon noktaları hakkında bilimsel kaynaklarda belirtilen fikirler çerçevesinde yorum yapmak mümkün olmamaktadır. Yine de bilimsel literatürler ışığında, *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes*'in koyunlar ve koyun çiftliklerine ilgisinin az olduğu kanısına varılabilir.

Bakteriyolojik kültür ve biyokimyasal identifikasyon yöntemiyle toplam 46 adet *Listeria* spp. suşu izole edildi. Suşların tamamı *iap* genine özgü primerler kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda *Listeria* spp. olarak konfirme edildi. Ancak kullanılan primerlerin yüksek bir spesifiteye sahip olduğu bildirilmesine ve diğer gen bölgelerine göre daha kararlı olan *iap* geninden çoğaltılmalarına rağmen, istenilen kalitede bantlar elde edilemedi. Bunun sebebinin, kullanılan primerlerin eski olmalarından ve yaklaşık yirmi yıllık bir süreçte *iap* geninde bazı mutasyonların meydana gelmiş olabileceği kanaatine varıldı(26). *L. monocytogenes* suşlarının PCR analizinde ise *listeriolysin* genine spesifik 702 bp boyutlarında elde edilen spesifik bantlar oldukça parlak ve kuvvetli olduğu görüldü. Listeriaların zenginleştirme kültür ve identifikasyon işlemleri için hangi metot kullanılırsa kullanılsın, moleküler testlerden daha kısa sürede doğru bir şekilde sonuç alınmayacağı açıktır. *L. monocytogenes* suşlarının identifikasyonunda, kültür işlemlerinden sonra biyokimyasal metotlar yerine daha güvenilir bir yöntem olarak rutin teşhis laboratuvarlarında uygulanabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca *L. monocytogenes* bakterilerinin daha spesifik, sensitivitesi yüksek ve hızlı, doğrudan örneklerden PCR ile teşhisi konusunda pek çok makale mevcuttur (3, 26, 48, 71). İnsan ve hayvanlarda önemli hastalıklara sebep olan listeriosis etkenlerinin teşhisi için; zaman kaybı, pahalılığı ve etkenlerin fenotipik özelliklerinin stabil olmaması nedeniyle sensitivite ve

spesifitesi daha düşük olan konvansiyonel tekniklerin yerine çok daha spesifik ve sensitivitesi yüksek olan ve kısa sürede sonuç veren moleküler yöntemlerin kullanılmasının daha faydalı olacağı bilim adamları tarafından bildirilmektedir (3).

Vazquez-Boland ve ark. (111) tarafından *Listeria* spp. suşlarının identifikasyonunda kullanılan fenotipik testlerden biri olan CAMP reaksiyonunun, bazı durumlarda *L. monocytogenes* ile *L. ivanovii* arasında doğru bir şekilde ayırım yapma konusunda yetersiz kaldığı, dolayısıyla da yanlış sonuçlara yol açabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada listeria suşlarının identifikasyonunda CAMP testiyle *L. monocytogenes* olarak identifiye edilen 8 adet suşun tamamı PCR ile de *L. monocytogenes* olarak doğrulandı. CAMP reaksiyonu kullanılırken bazen okumada güçlük yaşanmasına rağmen, CAMP testi *Listeria* spp. suşlarının ayırımında başka bir sorunla karşılaşmadan kullanıldı. Yine de okuma veya başka zorluklar yaşandığı CAMP testi dahil pek çok fenotipik testin yerine, bilim adamları tarafından PCR ile identifikasyon yoluna gidilirse bu sorunların aşılabilceği bildirilmiştir (82, 103). Ayrıca CAMP testinin *Listeria* spp. suşlarının ayırımında bazen zorluklarla karşılaşılrsa da maliyetinin düşüklüğü, fazla işgücü ve tecrübe istememesinden dolayı laboratuarlarda kullanılabileceği kanaatine varıldı.

L. monocytogenes suşlarının moleküler tiplendirilmelerinde birden fazla metot kullanılmasının kontaminasyon noktalarının tespitinde değerli bir araç olduğu önceki bilimsel çalışmalarda bildirilmiştir (31, 69). Bu çalışmada *L. monocytogenes* izolatları arasında RAPD tekniğiyle yapılan tiplendirmeler (her iki primer ile toplam 11 profil), RFLP ile *inl A* genine spesifik (her iki restriksiyon

enzimiyle toplam 4 farklı profil) tiplendirmelerinden daha büyük ayırım gücüne sahip bulundu. RAPD, RFLP tekniğine göre ayırım gücü daha yüksek bir testtir. Ancak tekrarlanabilirliği ve zayıf bantların oluşabilmesinden dolayı bazı profillerin okunabilmesinde zorluk yaşanabilmektedir. Yine de RFLP tekniğinin sadece çoğaltılabilen bölgenin tiplendirilebilmesinden dolayı sınırlı bir ayırım gücüne sahip olduğundan (48), doğal olarak RFLP ile RAPD analizlerine göre daha az profil elde edilmesi beklenmektedir. Bu çalışmada da RFLP ile, RAPD tekniğine göre daha az profil elde edildi. Bu sonuçlar ve literatürler, izolasyonu yapılan *L. monocytogenes* suşları arasındaki genetik ilişkileri araştırmak için, daha önce pek çok araştırmacının bildirdiği gibi (68) RAPD tekniğinin daha uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Tiplendirilebilirlik, yüksek tekrarlanabilirlik, yeterli stabilite ve yüksek ayırıştırma gücü gibi parametreler moleküler çalışmaların tümünde önemli parametreler olarak kabul edilmektedir. Bunlara ek olarak moleküler tekniğin pahalı, karmaşık olmaması, fazla işgücüne gerek duyulmaması, uzun zaman almaması, kolay yorumlanabilmesi ve farklı laboratuarlardan elde edilen sonuçların karşılaştırılabilir olması bilim adamları tarafından tercih edilmektedir. RAPD, tiplendirebilme kabiliyeti yüksek, uygulama kolaylığı olan ve zamandan tasarruf sağlayan bir tekniktir. Ancak laboratuvarlar arasında ve hatta aynı laboratuvar içinde bile tekrarlanabilirliği ve üretkenliği düşük olabilmektedir (48). Bundan dolayı RAPD tekniğinde, hedef DNA'ların ve primer konsantrasyonunun, PCR karışımının ve siklus sayısının optimize edilmesi hatta kullanılan thermal cycler cihazı bile üretkenlik ve tekrarlanabilirlik kapasitelerinde etkili olan birçok dezavantajın avantaja dönüştürülmesi gerekmektedir (76). Bu çalışmada da

yukarıda bahsedilen dezavantajlardan bazılarıyla optimizasyon sürecinde karşılaşıldı ve gerekli optimizasyonlar yapılarak sorunlar aşıldı. RAPD analizleri neticesinde, *L. monocytogenes* suşları arasında RAPD ve RFLP izolatları arasındaki ilişkilerin birbirine yakın olmadığı gözlemlendi. Ek olarak, RAPD analizinin tekrarlanabilirlik ihtiyacının olması ve üretkenliğinin ancak şartlar sağlandığında yüksek olduğu gibi olumsuz yönleri görüldü. Genel olarak polimorfizm teknikleri ele alındığında; *inl A* RFLP ve RAPD olmak üzere her iki metodun da *L.monocytogenes* suşları için kolay uygulanabilir olması, zamandan tasarruf sağlaması, fazla maliyetinin olmaması gibi sebeplerden dolayı tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Daha yüksek bir ayırım gücüne sahip olan, fakat zahmetli, çok fazla işgücü isteyen, daha uzun sürede sonuç veren ve çok daha maliyetli teknikler olan PFGE analizi ve DNA sekanslama metotlarının ise RAPD yerine iyi birer alternatif olabileceği akla gelmektedir (2, 48, 69). Ancak analizlerin, *L. monocytogenes* izolatları açısından yalnızca RAPD analizinin kabul edilebilir olduğu belirlendi. *L. monocytogenes* izolatlarında RFLP analizi ile polimorfizm çalışmalarını gerçekleştirmek için Ueda ve ark. (106)'nın bildirdiklerinin aksine, *inl A* geninin kararlı bir durum göstermesi kabul edilebilir bir durumdur. Bu sebeple *L. monocytogenes* genomu üzerinde virulens ile ilgili başka bir gen bölgesinin seçilmesi ve bu gen üzerinde RFLP analizlerinin yapılmasının gerekli olduğu açıktır. Ayrıca ileriki çalışmalarda insanlardan elde edilen izolatlar ile hayvan, gıda, çevreden elde edilen izolatlar arasındaki genetik ilişkilerin varlığını ortaya koyulması kontaminasyon noktalarının ortaya konmasında bazı soru işaretlerini de kaldıracaktır. Bu işlemlerde RAPD analizinin uygulanmasının listeriaların moleküler tiplendirmesinde faydalı veriler

sağlayabileceği, zoonotik olan bu etken ile hayvanlar için diğer patojen listeria etkenlerinin (*L. innocua* ve *L. ivanovii*) gerekli koruma ve kontrol stratejilerinin ortaya konmasında ve infeksiyon yollarının açıklanmasında uygun bir metot olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Sonuç olarak, listeriosis vakalarının en patojen yaygın etkeni olan *L. monocytogenes* suşlarının polimorfizminin araştırılmasında RAPD, *inl A* genindeki mutasyonların araştırılmasında RFLP tekniğinin bazı önemli noktalar dikkate alınmak suretiyle güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi saptandı. Yine de RAPD tekniğinin daha güçlü ayırma gücü olduğundan dolayı, RFLP yerine tüm genomun tiplendirildiği başka bir teknik ile kullanılmasının daha yararlı sonuçlar vereceği açıktır.

Sığırlar başta olmak üzere koyunların listeria ile gıdaları kontamine etmesi, bu etkenlerin gerek gıdalardan gerekse çevreden insanlara geçişi ile ilgili olarak, sığır çiftliklerinin bir risk faktörü olduğunun üzerinde durulması gerektiği fikrine varıldı.

Bu çalışmada elde edilen *Listeria* izolasyon oranlarının Elazığ bölgesindeki hayvancılık ve dolayısıyla bölge halkı için de risk olmaya başladığından edilebilir. Bu bulgular eşliğinde alınacak başta *L. monocytogenes* olmak üzere patojen listerialar için önemli kontrol stratejilerinin (predominant suşlar kullanılarak aşı geliştirme çalışmaları, etkili antibiyotiklerin geliştirilmesi ve seçimi vs.), bu listeria etkenlerinin görülme sıklığında önemli derecelerde azalmalara sebep olabileceği düşünülmektedir.

Hayvanlar, gıdalar, etken üçgeninde ve insanlarla bu etmenler arasındaki etkileşimlerindeki çeşitli faktörler sebebiyle, *L. monocytogenes* ve patojen diğer listerialarla mücadele ile uygulanacak kontrol programları hazırlanırken bu etkenlerin mevsimsel değişimlerinin de dikkate alınması gerektiği düşünülebilir. Bu şekilde hazırlanan kontrol stratejileri ile hayvan sağlığı, gıda güvenliği ve elbette halk sağlığı açısından gayet önemli ilerlemeler sağlanabileceği kanısına varıldı.

Ayrıca, *L. monocytogenes* dışındaki patojen listeria etkenlerinin (*L. innocua*, *L. ivanovii*) de moleküler genotiplendirme metotları kullanılarak değerlendirilmesi ve detaylı genetik analiz çalışmalarına hız verilmesinin, daha spesifik sonuçların alınmasında ve bu etkenlerin epidemiyolojisi hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesinde faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Abay S. (2004). Sağlıklı Sığırların Dışkılarından *Listeria* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Kayseri, EÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD.
2. Aguado V, Vitas AI, Garcia-Jalon I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from A Vegetable Processing Plant by RAPD and REA. Int J Food Microbiol, 90:341-347.
3. Allerberger F. (2003). *Listeria*: Growth, Phenotypic Differentiation and Molecular Microbiology. Fems Immunol Med Mic, 35: 183-189.
4. Anonim (2000). CDC. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses, United States. Morbidity and Mortality Weekly Report, Erişim: (www.cdc.gov/foodnet/annual/2000/2000_annual_report_foodnet.htm). Erişim tarihi: 20.11.2007.
5. Anonim. (1995). Official Methods of Analysis. 16th edition. AOAC International, USA.
6. Anonim. (1999). EC., European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on *Listeria monocytogenes*. 1999. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General.
7. Anonim. (2004). Microbiological Risk Assessment Series, No. 5, Technical Report ISBN 92 4 156262:5 .WHO. Rome/Italy.
8. Anonim. (2006). US Department of Agriculture, Microbiology Laboratory Guidebook, Chapter 8, Revision 3. Erişim Tarihi 01.01.2008. Erişim: (http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/).
9. Anonim. CDC. (1998). U.S. Centers for Disease Control and Prevention, 1997 Annual Report.
10. Arda M, Aydın N, Minbay A, Kahraman M, Leloğlu N, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. (1999). Özel Mikrobiyoloji, Medisan. Ankara.
11. Arslan N, Muz A. (2001). Elazığ Bölgesindeki Tavuklarda *Listeria* Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Vet Hek Mik Derg, 1: 57-63.
12. Aslantaş Ö, Yıldız P. (2003). Kars İlinde Çiğ Sütlerden *Listeria monocytogenes* İzolasyonu. F.Ü. Sağ Bil Derg, 17(1): 11-15.
13. Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal ÖM, Paracıkoğlu J, Akan M. (2006). Veteriner Mikrobiyoloji. Editör: Aydın N, Paracıkoğlu J. İlke Yayınları, Ankara.

14. Aygün O, Pehlivanlar S. (2006). *Listeria* spp. in The Raw Milk and Dairy Products in Antakya, Turkey. Food Control, 17; 676–679.
15. Aznar R, Alacron B. (2003). PCR detection of *Listeria monocytogenes*: A study of Multiple Factors Affecting Sensitivity. J Appl Microbiol, 95: 958–966.
16. Balcı Ş. (2005). Ankara’da Tüketime Sunulan Bazı Balıklarda *Listeria* Türlerinin İzolasyonu ve Bulunma Sıklığı (Doktora Tezi). GÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.
17. Barbuddhea SB, Malika SVS, Bhilegaonkar KN, Kumar P, Guptab LK. (2000). Isolation of *Listeria monocytogenes* and *Anti-listeriolysin O* Detection in Sheep and Goats. Small Ruminant Res, 38; 151-155.
18. Becker B, Schuler S, Lohneis M, Sabrowski A, Curtis GDW, Holzapfel WH. (2006). Comparison of Two Chromogenic Media for the Detection of *Listeria monocytogenes* with The Plating Media Recommended by EN/DIN 11290-1. Int J Food Microbiol, 109; 127–131.
19. Bemrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW, Cerf O. (1998). Quantitative Risk Assessment of Human Listeriosis from Consumption of Soft Cheese Made from Raw Milk. Prev Vet Med, 37; 129–145.
20. Bennett RW, Weaver RE. (2001). Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes* US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (online). Chapter 11 (2001) Erişim: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-11.html>. Erişim Tarihi: 10.11.2007.
21. Berktaş M, Bozkurt EN, Bozkurt H, Alisharlı M, Güdücüoğlu H. (2006). Et ve Et Ürünlerinden *Listeria monocytogenes*’in İzolasyonu. Van Tıp Dergisi, 13(2):36-41.
22. Bilgehan H. (2002). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Ankara.
23. Bille J, Rocourt J, Swaminathan B. (2003). *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. et al (eds) Manual of Clinical Microbiology, 8th edn. ASM, Washington, DC, pp. 461–471
24. Border P, Howard J, Plastow G, Siggins K. (1990). Detection of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Using Polymerase Chain Reaction. Lett Appl Microbiol, 11: 158-162.
25. Borucki M K, Gay CC, Reynolds J, Mcelwain KL, Kim SH, Call DR, Knowles DP. (2005). Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains from A High Prevalence Dairy Farm. Appl Environ Microbiol, 71;5893–5899.
26. Bubert A, Kohler S, Goebel W. (1992). The Homologous and Heterologous Regions within The *iap* Gene Allow Genus and Species Specific Identification of *Listeria* spp. by Polymerase Chain Reaction. Appl Environ Microbiol, 58: 2625–2632.

27. Buchanan R, Lindqvist R, Ross T, Smith M, Tod, Whiting R. (2004). Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. Technical Report. Microbiological risk assessment series: no. 5. WHO/FAO.
28. Buchrieser C. (2007). Biodiversity of The Species *Listeria monocytogenes* and The Genus *Listeria*. *Microbes and Infect*, 9:1147-1155.
29. Carter GR, Chengappa MM, Roberts AW. (1995). *Essentials of Veterinary Microbiology*, Willams and Wilkins, USA.
30. Ceylan E, Karaca M, Akkan HA, Keleş İ, Kutlu İ. (2005). Van Yöresi Sokak Köpeklerinde Listeriosis Seroprevalansı. *YYÜ Sağ Bil Derg*, 8 (1-2):15-17.
31. Chasseignaux E, Toquin MT, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G. (2001). Molecular Epidemiology of *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from The Environment, Raw Meat and Raw Products in Two Poultry and Pork-Processing Plants. *J Appl Microbiol*; 91, 888-899.
32. Chen Y, Ross, WH, Gray MJ, Wiedmann M, Whiting RC, Scott VN. (2006). Attributing Risk to *Listeria monocytogenes* Subgroups: Dose Response in Relation to Genetic Lineages. *J. Food. Prot.* 69:335–344.
33. Cocolin L, Manzano, M, Cantoni C, Comi G. (1997). A Nested PCR Method to Detect *Listeria monocytogenes* in Artificially Contaminated Blood Specimens. *Res Microbiol*, 148(6):485-90.
34. Czajka J, Batt CA. (1994). Verification of Causal relationships between *Listeria monocytogenes* Isolates Implicated in Foodborne Outbreaks of Listeriosis by Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns. *J Clin Microbiol*, 32: 1280–1287.
35. Çetinkaya B, Ertuş HB, Muz A. (1999). Süt Ürünlerinde *Listeria* Türlerinin İzolasyonu. *FÜ Sağ Bil Derg*, 13(2): 21-25.
36. Doğuer M. (1961). Türkiye’de Listeriosis, FAO Emerging Diseases Congress, Ankara.
37. Donnelly CW. (2002). Detection and Isolation of *Listeria monocytogenes* from Food Samples: Implications of Sublethal Injury. *J AOAC Int*, 85: 495–500.
38. Enright MC, Spratt BG. (1999). Multilocus Sequence Typing. *Trends Microbiol*, 7(12):482-487.
39. Ericsson H, Stalhandske P, Danielsson-Tham ML, Bannerman E, Bille J, Jacquet C, Rocourt J, Tham W. (1995). Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b Strains into Two Groups by PCR and Restriction Enzyme Analysis. *Appl Environ Microbiol*, 61(11):3872-3874.
40. Erol İ. (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Pozitif Matbaacılık, Ankara.

41. Ertaş HB, Şeker E. (2005). Isolation of *Listeria monocytogenes* from Fish Intestines and RAPD Analysis. Turk J Vet Anim Sci, 29; 1007-1011.
42. Ertaş HB. (1997). Elazığ Bölgesinde Koyun ve Keçi Sütlerinden *Listeria* Türlerinin İzolasyonu (Doktora Tezi). Elazığ, FÜ Veteriner Fakültesi.
43. Euzéby JP. (2007). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, Erişim: (<http://www.bacterio.cict.fr/l/listeria.html>), Erişim tarihi: 01.12.2007.
44. Farber JM, Peterkin PI. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev, 55:476–511.
45. Feldsine PT, Lienau AH, Leung SC, Mui LA. (2002). Method Extension Study to Validate Applicability of AOAC Official Method 1996.14 Assurance Polyclonal Enzyme Immunoassay for Detection of *Listeria monocytogenes* and Related *Listeria* spp. from Environmental Surfaces: Collaborative Study. J AOAC Int, 85: 460–469.
46. Fenlon DR, Wilson J, Donachie W. (1996). The Incidence and Level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial processing. J. Appl Bacteriol, 81:641–650.
47. Fonnesbech Vogel B, Huss HH, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Cold-Smoked Salmon Processing Plants Detected by DNA-Based Typing Methods. Appl Environ Microbiol, 67; 2586– 2595.
48. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. (2005). Methods for The Isolation and Identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A Review. FEMS Microbiol Rev, 29: 851-875.
49. Glaser P, Frangeul L, Buchreiser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couve E, De Daruvar A, Dhoux P, Domann, E, Domunguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian D, Fsihi H, Garcia-Del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gomez-Lopez N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Mauduen E, Maitournam A, Mata Vicente JNG, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, De Pablos B, Perez-Diaz JC, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez, A, Vazquez-Boland JA, Voss, Wehland J, Cossart P. (2001). Comparative Genomics of *Listeria* Species. Science, 294: 849-852.
50. Gracieux P, Roche SM, Pardon P, Velge P. (2003). Hypovirulent *Listeria monocytogenes* Strains are Less Frequently Recovered than Virulent Strains on PALCAM and Rapid' L. mono Media. Int J Food Microbiology, 83.133– 145.
51. Groves RD, Welshimer J. (1977). Separation of Pathogenic from Apathogenic *Listeria monocytogenes* by Three Invitro Reactions. J Clin Microbiol, 5; 559–563.

52. Gudmundsdottir K, Svansson V, Aalbaek B, Gunnarsson E, Sigurdarson S. (2004). *Listeria monocytogenes* in Horses in Iceland. *Vet Rec*, 155:456–459.
53. Guerini MN, Brichta-Harhay DM, Schakelford TS, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Wheeler TL, Koohmaraie M. (2007). *Listeria* Prevalance and *Listeria monocytogenes* Serovar Diversity at Cull Cow and Bull Processing Plants in the United States. *J Food Prot*, 70 (11): 2578-2582.
54. Hain T, Chatterjee, SS, Gha, IR, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Kärst U, Jänsch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Kreft J, Klumpp J, Loessner MJ, Dorscht J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, Jacquet C, Martin P, Cossart P, Rusniok C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T. (2007). Pathogenomics of *Listeria* spp.. *Int J Med Microbiol*, 297(7-8):541-557.
55. Hain T, Steinweg C, Chakraborty T. (2006). Comparative and Functional Genomics of *Listeria* spp. *J Biotechnol*, 126: 37–51.
56. Hayashidani H, Kanzaki N, Kaneko Y, Okatani AT, Taniguchi T, Kaneko K, Ogawa J. (2002). Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in Wild Boars in Japan. *Wild Dis*, 38(1):202-205.
57. Hegde V, Leon-Velarde CG, Stam CM, Jaykus LA, Odumeru JA. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar *Listeria* Agar for The Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Food and Environmental Samples. *J Microbiol Methods*, 68(1):82-87.
58. Hirsh DC, Zee YC. (2002). *Veterinary Microbiology*. Blackwell Publications. ABD.
59. Hitchins AD. (2003). *Listeria monocytogenes*. US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (online). Chapter 10 (2003). Erişim: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html> Erişim Tarihi: 05.10.2007.
60. Ho AJ, Lappi VR, Wiedmann M. (2007). Longitudinal Monitoring of *Listeria monocytogenes* Contamination Patterns in a Farmstead Dairy Processing Facility. *J Dairy Sci*, 90(5):2517-2524.
61. Husu JR, Seppane JT, Sivela SK, Rauramaa AL. (1990). Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* on Dairy Farms. *Zbl Vet Med B*, 37: 268–275.
62. Hutchinson ML, Walters LD, Avery SM, Munro F, Moore A. (2005). Analyses of Livestock Production, Waste Storage and Pathogen Levels and Prevalences in Farm Manures. *Appl Environ Microb*, 71 (3): 1231-1236.
63. Jantzen MM, Navas J, De Paz M, Rodriguez B, Da Silva, WP, Nuñez M, Martinez-Suarez JV. (2006). Evaluation of ALOA Plating Medium for Its Suitability to Recover High Pressure-Injured *Listeria monocytogenes* from Ground Chicken Meat. *Lett Appl Microbiol*, 43(3):313-317.

64. Jiang X, Islam M, Morgan J, Doyle MP. (1992). Fate of *Listeria monocytogenes* in Bovine. J Food Prot, 67(8):1676-1681.
65. Kalender H. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Faeces from Chickens, Sheep and Cattle in Elazığ Province. Turk J Vet Anim Sci, 27:449-451.
66. Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB. (2008). Listeria Species in Bovine Raw Milk: A large survey of Central India. Food Control, 19: 109–112.
67. Kara AA, Algur ÖF, Kaya M. (1999). Erzurum Piyasasından Temin Edilen Beyaz ve Civil Peynirlerden, Listeria Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Turk J Biol, 23: 331–337.
68. Kerouanton A, Brisabois A, Denoyer E, Dilasser F, Grout J, Salvat G, Picard B. (1998). Comparison of Five Typing Methods for the Epidemiological Study of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, 43: 61–71.
69. Leite P, Rodrigues R, Ferreira M, Ribeiro G, Jacquet, C, Martin P, Brito L. (2006). Comparative Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from Portuguese Farmhouse ewe's Cheese and from Humans. Int J Food Microbiol, 106: 111- 121.
70. Li X, Boudjellab N, Zhao X. (2000). Combined PCR and Slot Blot Assay for Detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, 56: 167–177.
71. Liu D. (2006). Identification, Subtyping and Virulence Determination of *Listeria monocytogenes*, An Important Foodborne Pathogen. J Med Microbiol, 55: 645–659.
72. Loessner MJ, Busse M. (1990). Bacteriophage Typing of Listeria Species. Appl Environ Microbiol, 56: 1912–1918.
73. Loessner MJ. (1991). Improved Procedure for Bacteriophage Typing of Listeria Strains and Evaluation of New Phages. Appl Environ Microbiol, 57: 882–884.
74. Lorber B. (2007). Listeriosis. Editor: Goldfine H, Shen H. Springer. USA.
75. Low JC, Donachie W. (1997). A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Vet J, 153: 9–29.
76. Macpherson JM, Eckstein PE, Scoles GJ, Gajadhar AA. (1993). Variability of the Random Amplified Polymorphic DNA Assay Among Thermal Cyclers, and Effects of Primer and DNA Concentration. Mol Cell Probes, 7:293-299.
77. Martinez I, Rørvik LM, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, Fønnesbech-Vogel B. (2003). Genetic Variability among Isolates of *Listeria monocytogenes* from Food Products, Clinical Samples and Processing Environments, Estimated by RAPD Typing. Int J Food Microbiol, 1(84):285-297.
78. Mazurier SI, Audurier A, Marquet-Van der Mee N, Notermans S, Wernars K. (1992) A Comparative Study of Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Conventional

- Phage Typing for Epidemiological Studies of *Listeria monocytogenes* Isolates. Res Microbiol, 143; 507–512.
79. Miettinen MK, Siitonen A, Heiskanen P, Haajanen H, Bjorkroth KJ, Korkeala HJ. (1999) Molecular Epidemiology of An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout. J Clin Microbiol, 37: 2358-2360.
 80. Monfort P, Minet J, Rocourt J, Piclet G, Cormier M. (1998). Incidence of *Listeria* spp. in Breton Live Shelfish. Lett Appl Microbiol, 26: 205-208.
 81. Nicholson FA, Groves SJ, Chambers BJ. (2005). Pathogen Survival during Livestock Manure Storage and Following Land Application. Bioresour Technol, 96(2):135-143.
 82. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Grohn YT, Wiedmann M. (2005). Evaluation of Farm Management Practices as Risk Factors for Clinical Listeriosis and Fecal Shedding of *Listeria monocytogenes* in Ruminants. J Am Vet Med Assoc, 1(11):1808-1814.
 83. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, Mcdonough PL, Wiedmann M. (2004). Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in The Farm Environment. Appl Environ Microbiol, 70:4458–4467.
 84. Olier MF, Pierre JP, Lematre, CD, Rousset, A. Guzzo, J. (2002). Assessment of the Pathogenic Potential of Two *Listeria monocytogenes* Human Faecal Carriage Isolates. J Appl Microbiol, 148:1855–1862.
 85. Oliver HF, Wiedmann M, Boor K. (2007). Environmental Reservoir and Transmission into the Mammalian Host, *Listeria monocytogenes*: Pathogenesis and Host Response. Editors: Goldfine H, Shen H. Springer, USA.
 86. Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. (2006). Host and Bacterial Factors in Listeriosis Pathogenesis. Vet Microbiol, 114:1–15.
 87. Özmen G, Kılıç H. (2006). Gemlik Garnizonu'nda Tüketime Sunulan Tavuk Etlerinden *Listeria* spp. İzolasyonu. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 15(3) 194-197.
 88. Pauly TM, Tham WA. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* in Wilted and Additive-Treated Grass Silage. Acta Vet Scand, 44: 73-86.
 89. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maghire D. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Blackwell Publications, Great Britain.
 90. Reissbrodt R. (2004). New Chromogenic Plating Media for Detection And Enumeration of Pathogenic *Listeria* spp.-An Overview. Int J Food Microbiol, 95: 1–9.
 91. Roberts AJ, Wiedmann M. (2003). Pathogen, Host and Environmental Factors Contributing to The Pathogenesis of Listeriosis. Cell Mol Life Sci, 60:904–918.
 92. Rocourt J, Cossart P. (1997). *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, pp. 337–352.

93. Rousseaux S, Olier M, Lemaitre JP, Piveteau P, Guzzo J. (2004). Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of *inlA* for Rapid Screening of *Listeria monocytogenes* Strains Deficient in the Ability to Invade Caco-2 Cells. *Appl Environ Microbiol*, 70(4): 2180–2185.
94. Ryser ET. (1999). Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Unfermented Dairy Products. *Listeriosis and Food Safety*. 2nd ed. E.T. Ryser and E.H. Marth. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
95. Şahin M, Beytut E. (2006). Abortions in Sheep Due to *Listeria ivanovii* in the Kars Region. *Turk J Vet Anim Sci*, 30: 503-506.
96. Sancak YC, İşleyici Ö, Sagun E. (2007). Van’da Tüketime Sunulan Bazı Et Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 18(1):93-99.
97. Sauders BD, Pettit D, Currie B, Suits P, Evans A, Stellrecht K, Dryja DM, Slate D, Wiedmann M. (2006). Low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Human Stool. *J Food Prot*, 68:178-181.
98. Sauders BD. (2005). Molecular Epidemiology, Diversity, Distribution, And Ecology of *Listeria*. PhD Thesis, Cornell University, Ithaca, NY.
99. Schlech WF. (1996). Pathogenesis and Immunology of *Listeria Monocytogenes*. *Pathol Biol*, 44(9):775-782.
100. Scotter SL, Langton S, Lombard B, Schulten S, Nagelkerke N, In’T Veld PH, Rollier P, Lahellec C. (2001). Validation of ISO method 11290 Part 1 — Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Int J Food Microbiol*, 64(3) 295-306.
101. Seeliger HP, Jones D. (1986). Genus *Listeria*, in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath PH, Mair NS, Sharpe, ME, Hold JG. (Editors). Williams and Willkins, Baltimore, USA.
102. Solmaz H, Akkan HA, Tütüncü M, Karaca M, Ekin İH, Kutlu İ. (2002). Van ve Yöresinde Atlarda Listeriozisin Seroprevalansı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 13(1-2):62-63.
103. Suarez G. (1990). Revision of the Validity of CAMP Tests for *Listeria* Identification. Proposal of An Alternative Method for The Determination of Haemolytic Activity by *Listeria* Strains. *Acta Microbiol Hung*, 37; 201–206.
104. Tompkin RB. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in The Food-Processing Environment. *J Food Prot*, 65:709–725.
105. Tümbay E, Seeliger HPR, Inci R, Coşar G, Langer B. (1988). Isolation of *Listeria* from Cheese in Turkey. *Turkish J Infect*, 2(4): 593-598.
106. Ueda F, Anahara R, Yamada F, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R. (2005). Discrimination of *Listeria monocytogenes* Contaminated Commercial Japanese Meats. *Int J Food Microbiol*, 15(3):455-62.

107. Unnerstad H, Romell A, Ericsson H, Danielsson-Tham ML, Tham W. (2000). *Listeria monocytogenes* in Faeces from Clinically Healthy Dairy Cows in Sweden. *Acta Vet Scand*, 41:167–171.
108. Uraz G, Yücel N. (1998). *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ve Benzerlerinin (*Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*) Çiğ Süt Örneklerinden İzolasyonu. *Turk J Agric For*, 22: 463–468.
109. Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* 14(3):584-640.
110. Vazquez-Bolanda JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorna B, Kreft J, Goebel W. (2001). Pathogenicity Islands and Virulence Evolution in *Listeria*. *Microbes Infect*, 3: 571–584.
111. Vazquez-Boland JA, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF, Suarez G. (1992). *Listeria monocytogenes* CAMP Reaction. *Clin Microbiol Rev*. 5(3):343
112. Weber A, Pote, J, Schafer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. (1995). Studies on The Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Fecal Samples of Domestic and Companion Animals. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 198:117–123.
113. Welshimer HJ and Donker-Voet J. (1971). *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl Microbiol*, 21:516-519.
114. Wiedmann M. (2002). Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. *J. AOAC Int*, 85:524–531.
115. Yokoyama E, Saitoh T, Maruyama S, Katsube Y. (2005). The Marked Increase of *Listeria monocytogenes* Isolation from Contents of Swine Cecum. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 28:259–268.
116. Yoshida T, Takeuchi M, Sato M, Hira K. (1999). Typing *Listeria monocytogenes* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprinting. *J Vet Med. Sci*, 61(7): 857–860.

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Tekirdağ ili Malkara ilçesine bağlı Balabancık Köyünde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi doğduğum köyümde tamamladım. Daha sonra 1991 yılında Türkiye genelinde yapılan Kurumlar Liseleri Sınavı'nı kazanıp, Ankara Laborant Meslek Lisesinde öğrenim hayatıma devam ettim. Liseyi bitirdikten sonra, 1994 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne laborant olarak atandım ve bu tarihten itibaren çalışmaya başladım. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine başlayıp, 2003 yılında bitirdim. Aynı yıl F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji doktora programına başladım. 2008 yılı Mayıs ayında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne tayin oldum. Halen aynı Enstitüde çalışmaktayım. Evliyim. Son 4 yıl içerisinde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü ve TÜBİTAK tarafından desteklenen ulusal ve uluslar arası projelerde yer aldım.