



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



RUMİNANTLARDA LISTERIAL ABORTLARIN TANISI İÇİN PCR TEKNİKLERİNİN OPTİMİZASYONU

Amer TALİÇ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

2015-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RUMİNANTLARDA LISTERIAL ABORTLARIN
TANISI İÇİN PCR TEKNİKLERİNİN
OPTİMİZASYONU**

Amer TALİÇ

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU**

2015- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hastalığın Tarihçesi	2
1.2. Etiyoloji	4
1.3. Epidemiyoloji	12
1.4. Patogenez	15
1.5. Klinik Belirtiler	19
1.5.1. Ruminantlarda Listeriozis	19
1.5.1.1. Septisemik Form ve Gastroenteritis	19
1.5.1.2. Sinirsel Form	20
1.5.1.3. Abortif Form	21
1.5.1.4. Lokal İnfeksiyonlar	21
1.5.2. Diğer Hayvanlar Türlerinde Listeriozis	22
1.5.4. İnsanlarda Listeriozis	22
1.6. Teşhis	23
1.6.1. Klinik Teşhis	23
1.6.2. Nekropsi Bulguları	23
1.6.3. Laboratuvar Muayeneleri	24
1.6.4. Bakteriyoskopi	24
1.6.5. Kültür	24
1.6.6. Hayvan Deneyi	26
1.6.7. Serolojik Testler	27
1.6.8. Moleküler Testler	28
1.6.8.1. DNA Hibridizasyonu	28

1.6.8.2.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	28
1.6.8.3.	Gerçek zamanlı PCR (RTi-PCR)	29
1.7.	Tiplendirme	30
1.7.1.	Serotiplendirme	30
1.7.2.	Fajla Tiplendirme	30
1.7.3.	Moleküler Tiplendirme	30
1.7.3.1.	Multilokus Enzim Elektrofrez (MEE)	31
1.7.3.2.	Ribotiplendirme	31
1.7.3.3.	Restriksiyon Enzim Analizi (REA)	31
1.7.3.4.	Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	32
1.7.3.5.	PCR'a Dayalı Tiplendirme Metotları	32
1.7.3.6.	DNA Dizilendirmesine Dayalı Tiplendirme Metotları	32
1.8.	Sağaltım	33
1.9.	Koruma	33
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.2.	Gereç	35
2.2.1.	Bakteri Suş ve DNA'ları	35
2.2.2.	Biyolojik ve Klinik Örnekler	36
2.2.3.	Oligonükleotid Primerleri	36
2.2.4.	PCR'da Kullanılan Maddeler	37
2.2.5.	PCR'da Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	38
2.3.	Yöntem	38
2.3.1.	<i>Listeria</i> spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu	38
2.3.2.	Primerlerin Belirlenmesi	38
2.3.3.	Bakteri Suşlarından ve Doku Örneklerden DNA Ekstraksiyonu	39
2.3.4.	Singleplex-PCR ve Multiplex-PCR Optimizasyonu	40
2.3.5.	Elektrofrez ve Örneklerin Görüntülenmesi	41
2.3.6.	Doku Örneklerinin Yapay Kontaminasyonu	41
2.3.7.	Multiplex-PCR Tekniğinin Validasyonu	41
3.	BULGULAR	43
3.1.	<i>Listeria</i> spp. İzolasyonu ve İdentifikasyonu	43
3.2.	Primerlerin Belirlenmesi	43
3.3.	Singleplex-PCR ve Multiplex-PCR Optimizasyonu	45
3.4.	Multiplex-PCR Tekniğinin Validasyonu	46
4.	TARTIŞMA	52
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	57
	ÖZET	59
	SUMMARY	60

KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	70

ÖNSÖZ

Ülkemiz hayvancılığında ve kırsal kalkınmada önemli bir yeri bulunan ruminant yetiştiriciliğinin en önemli problemlerinden birisi yavru atmalardır. Sağlam verilere dayalı kesin bir bilgi olmamasına rağmen, çeşitli bilimsel çalışmalarda atık oranları göz önüne alındığında, tüm infeksiyöz etkenlerden ileri gelen atık vakaları binler ile ifade edilebilir. Buna bağlı olarak ruminat abortuslarının yol açtığı ekonomik kaybın önemli düzeylerde olduğu söylenebilir. Listerialar ülkemizde ruminantlarda yavru atmaya neden olan etkenler içerisinde en sık karşılaşılanlar arasında yer almaktadır. Hayvanlarda yavru atmaya neden olan *Listeria* türleri *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'dir. Listeriozisin rutin laboratuvar teşhisinde konvansiyonel bakteriyel izolasyon ve identifikasyon metotları kullanılmaktadır. Fakat izolasyon ve identifikasyonu olumsuz yönde etkileyecek abortun geç farkedilmesi, aborte fötusun kontamine olması, otoliz, yanlış örnekleme yapılması ve materyallerin laboratuvara uygun olmayan koşullarda gönderilmesi gibi durumlarla karşılaşılmaktadır. Konvansiyonel teşhis metotları hem fazla iş gücü gerektirmekte hem de uzun zaman almaktadır. Son yıllarda infeksiyöz hastalıkların hızlı teşhisi amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) ve PCR tabanlı diğer moleküler teşhis metotları kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen moleküler tanı tekniğinin ruminantlarda görülen Listerial kaynaklı abortusların hızlı, hassas, doğru tanısını sağlayarak hastalığın kontrolünde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na, eğitimim sürecinde katkılarından dolayı başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. K. Serdar DİKER olmak üzere tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma, tezimin her aşamasında sabrını ve desteğini esirgemeyen sevgili annem Alma TALİÇ'e, yetişmemde büyük katkısı olan rahmetli babam Elvedin TALİÇ'e ve sevgili nişanlım Beisa

CRLJENKOVIÇ'e çok teşekkür ederim. Yüksek Lisans eğitimim süresince lisansüstü programı bursiyeri olduğum Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na bizlere ve bilime verdiği katkılardan dolayı teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
(RT)-PCR	R everse T ranscription P CR
>	Büyüktür
~	Yaklaşık
≥	Büyük eşittir
μl	Mikrolitre
16SrRNA	16S ribozomal RNA gen
°C	Celsius
ABD	A merika B irleşik D evletler
ag	Attoagram
ActA	Actin Assembly-Inducing Protein
a _w	Su aktivitesi
B ₁	Vitamin B ₁ , tiamin
B ₂	Vitamin B ₂ , riboflavin
B ₇	Vitamin B ₇ , biotin
BHI	B rain H eart I nfusion
BLAST-N	N ükleotit - B asic L ocal A lignment S earch T ool
bp	Baz çifti (B ase P air)
C	Sitozin
CAMP	C hristie A tkins M unch- P etersen Test
CE	Capillary Electrophoresis
CFU	C olony F ormin U nit
cm	Santimetre
CT	C omputerized T omography
ddNTP	Dideoksinükleotid Trifosfat
ddNTP	Dideoxynucleotides (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP)
DGGE	D enaturing G radient G el E lectrophoresis
dk	Dakika
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EC	E pidemic C lone
Ecad	E-cadherin
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
Fe ³⁺	Demir (III)
fg	Femtogram
FDA	US Food and Drug Administration
G	G uanin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ S	Hidrojen sülfür
<i>hly</i>	Hemolysin O geni
i.p.	İntraperitoneal
<i>iap</i>	Invasion Associated Secreted Endopeptidase geni
InlA	Internalin A

<i>inlA</i>	Internalin A geni
InlB	Internalin B
<i>inlB</i>	Internalin B geni
<i>inlC</i>	Internalin C geni
<i>inlJ</i>	Internalin J geni
kDa	Kilodalton
LLO	Listerolysin O
LPM	L ithium C hloride P henylethanol M oxalactam P lating A gar
Mb	Megabaz
MEE	M ultilocus E nzyme E lectrophoresis
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
MLA	M cBride <i>Listeria</i> Agar
MLST	Multilocus Sequence Typing
mM	Millimolar
MOX	M odified O xford Agar
MR	M agnetic R esonance
MSS	M erkez S inir S istemi
NaCl	Sodyum klorür
NASBA	N ucleic A cid S equence- B ased A mplification
NCBI	N ational C enter for B iotchnology I nformation
ng	Nanogram
PALCAM	Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Esculin Mannitol
PBS	P hosphate B uffered S aline
PCR	P olymerase C hain R eaction
PFGE	P ulsed- F ield G el E lectrophoresis
pg	Pikogram
PI-PLC	Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C, ve Phosphatidylcholine-Dependent Phospholipase C
pmol	Pikomol
PrfA	P ositive R egulatory F actor A
<i>prfA</i>	P eptide C hain R elease F actor 1 geni
RAPD	R andom A mplified P olymorphic D N
RFLP	R estriction F ragment L ength P olymorphism
rRNA	Ribosomal RNA
RTi-PCR	Real-time-PCR
s	Saniye
SIM	Sulfide Indole Motility Medium
<i>smcL</i>	Spingomyelinase C geni;:
SSCP	S ingle S trand C onformation P olymorphism
Ta	Primerlerin bağlanma sıcaklık
Taq polymerase	Thermostable DNA polymerase
Tm	Primerlerin erime sıcaklık
TNSA	T rypaflavin N alidixic A cid S erum A gar
USA	U nited S tates of A merica
USDA–FSIS	U nited S tates S tate D eartment of A griculture – F ood S afety and I nfection S ervice

UV
UVM
VP

Morótesi
University of Vermont *Listeria* Enrichment Broth
Voges-Proskauer

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1. *Listeria* genusunun 16S ve 23S rRNA, *iap*, *prs*, *vclB* ve *ldh* genlerinin analizlerini temel alan filogenetik şema.
- Şekil 1.2. Konak hücresinde *L. monocytogenes*'in basitleştirilmiş bir illüstrasyondur.
- Şekil 3.1. Agar jel elektroforezinde Listiv2 (A) ve Lmono3 (B) primerlerinin tekli PCR ile spesifite testi.
- Şekil 3.2. *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* DNA karışımının iki farklı primer kombinasyonu (Lmono3 ve Listiv2, Lmono ve Listiv2) ile multiplex-PCR sonrası jel elektroforezi görüntüsü.
- Şekil 3.3. Multiplex-PCR'da Lmono3 ve Listiv2 primer spesifitesini gösteren jel elektroforezi görüntüsü.
- Şekil 3.4. Multiplex-PCR spesifitesinin belirlenmesi için *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* karışımının 10 katlı seri dilüsyonlarının jel elektroforezi görüntüsü.
- Şekil 3.5. *L. monocytogenes* ile yapay olarak kontamine edilen mide içeriği, kotiledon, karaciğer, dalak, süt örneklerinden yapılan multiplex-PCR'ın sensitivite validasyonunun jel elektroforezi görüntüsü.
- Şekil 3.6. *L. ivanovii* ile yapay olarak kontamine edilen mide içeriği, kotiledon, karaciğer, dalak, süt örneklerinden yapılan multiplex-PCR'ın spesifite ve sensitivite validasyonu.
- Şekil 3.7. *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* kaynaklı 4 klinik abort örneğiyle multiplex-PCR validasyonunun jel elektroforezi görüntüsü.

ÇİZELGELER

- Çizelge 1.1. *Listeria* serovarları.
- Çizelge 1.2. *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri.
- Çizelge 1.3. *Listeria* türlerinin ayırıcı özellikleri.
- Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan *Listeria* suş, izolat ve DNA'ları.
- Çizelge 2.2. Primer dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları.
- Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan singleplex ve multiplex-PCR bileşenleri ve final hacimleri.
- Çizelge 3.2. Singleplex ve multiplex-PCR protokolü.
- Çizelge 3.3. Multiplex-PCR'da kullanılan Lmono3 ve Listiv2 primerlerin spesifitesi.

1 GİRİŞ

Listerialar, tıp, veteriner ve gıda mikrobiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. *Listeria* cinsine ait 6 tür bulunmaktadır: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, ve *Listeria grayi* (Liu ve ark., 2004; Mclauchlin ve Rees, 2009; Poulsen ve Czuprynski, 2013). İnsanlardaki Listeriozisin başlıca kaynağı *L. monocytogenes*'tir. *L. monocytogenes*'in kanatlı, balık, kırmızı et, süt, peynir, meyve ve sebze gibi ürünlerden de nadiren izolasyonu yapılmaktadır. Buna bağlı olarak da insan sağlığı açısından etkenle bulaşık gıdaların tüketimi tehlike arz etmekte ve gıda kaynaklı Listerial infeksiyonları daha önemli hale getirmektedir (Liu ve ark., 2004; Mclauchlin ve Rees, 2009; Paracıkoğlu, 2006; Poulsen ve Czuprynski, 2013). Ancak diğer *Listeria* türlerinin de sporadik olarak insanlarda infeksiyona sebep olduğu bilinmektedir. Örneğin *L. innocua* ve *L. grayi*'nin bakteriyemi, *L. seeligeri*'nin meningitis, *L. ivanovii*'nin de bakteriyemi ve gastroenteritis olguları bildirilmiştir (Rocha ve ark., 2013; Rocourt ve ark., 1986; Walker ve ark., 1994).

Veteriner hekimlik açısından hayvanlarda farklı klinik formlarla seyreden infeksiyonlara neden olan 2 önemli patojenik *Listeria* türü ise *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'dir. Ayrıca *L. innocua*'nın geyik, koyun ve ineklerde meningoensefalite sebep olduğu da bildirilmiştir. *L. monocytogenes*'in doğada toprak, su ve bitkilerde (özellikle kötü kaliteli silaj) yaygın olarak bulunması başta ruminantlar olmak üzere tüm hayvan türleri için önemli infeksiyon kaynağını oluşturmaktadır (Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011).

Türkiye'deki hayvan yetiştiriciliğinde ruminantların önemli bir rolü bulunmaktadır. Ruminant yetiştiriciliğinde abort en önemli problemlerden birisidir. Hayvanlarda yavru atmaya neden olan *Listeria* türleri *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'dir. Listeriozisin rutin laboratuvar teşhisinde konvansiyonel bakteriyel izolasyon ve identifikasyon metotları kullanılmaktadır. Fakat izolasyon ve identifikasyonu olumsuz yönde etkileyecek abortun geç farkedilmesi, aborte fötusun

kontamine olması, otoliz, yanlış örnekleme yapılması ve materyallerin laboratuvara uygun olmayan koşullarda gönderilmesi gibi durumlarla karşılaşmaktadır.

Konvansiyonel teşhis metotları hem fazla iş gücü gerektirmekte hem de uzun zaman almaktadır. Kültürel metotlarla *Listeria*'nın negatif olarak belirlenmesi örneklemeden itibaren üç gün; pozitif olarak belirlenmesi ise 5-7 gün almaktadır (Gasnov ve ark., 2005; Norton, 2002).

Son yıllarda infeksiyöz hastalıkların hızlı teşhisi amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) ve PCR tabanlı diğer moleküler teşhis metotları kullanılmaktadır.

1.1. Hastalığın Tarihçesi

Fransa'da 1891 yılında Hayem ile Almanya'da 1893 yılında Henle ölen hayvanlardan alınan doku kesitlerinde Gram-pozitif çomak şekilli mikroorganizmalara rastlamışlardır. İsveçli bir bilim adamı tarafından 1911 yılında tavşan karaciğerindeki nekrotik bir odakta bir bakteri izole etmiştir. Bu izolatla birlikte önceki iki vakanın da etkeninin *Listeria* spp. olduğu düşünülmüştür (Gray ve Killinger, 1966). Murray 1924 yılında yaptığı bir çalışmada kobay ve tavşanlardan alınan lenf düğümlerinden bir bakteri izole etmiştir. İzole ettiği bakteriyi sağlıklı hayvanlara aşılamanın Murray, kobay ve tavşanların kanında monositlerin arttığını görmüştür. Bu doğrultuda Murray bulduğu bakteriye *Bacillus monocytogenes* ismini vermiştir (Murray ve ark., 1926). Bir sonraki sene, Güney Afrika Cumhuriyeti'nden Pirie, kobay karaciğerinden bir bakteri izole etmiş ve adını cerrah Lord Joseph Lister anısına *Listerella hepatolytica* koymuştur (Witts ve Webb, 1927). Bu arada Pirie'nin bulduğu *Listerella hepatolytica* ile Murray'ın *Bacillus monocytogenes*'in aynı olduğu görülmüş, dolayısıyla Pirie 1940 yılından bakterinin ismini *Listeria monocytogenes* olarak değiştirmiştir (Pirie, 1940). Sonraki yıllarda, evcil ve vahşi hayvanların çoğunda fazla sayıda *Listeria* etkenlerine septisemi vakalarında sıklıkla rastlandığı rapor edilmiştir. Bundan kısa bir süre sonra, at, domuz, kümes, evcil ve vahşi hayvanların neredeyse hepsinde meningoensefalit ve abort vakalarına rastlanmaya başlanmıştır (Farber ve Peterkin, 1991). Danimarka'da Nyfeldt 1929 yılında, ilk defa monositoz hastası olan üç insandan *Listeria* spp. izole etmiş ve bu vakadan sonra zoonotik bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Gray ve

Killinger, 1966). Reiss 1950'li yıllarda Heinz Seeliger ile birlikte ilk defa insanlarda Listeriosis hakkında bir kitap yayınlamıştır. Bu sırada, bilinmeyen bir bakteri hayvanların büyük bir kısmında klinik hastalıklara neden olan önemli bir patojen haline gelmiştir. Fakat aslında hastalıkların başlangıcı 1980'li yıllarda meydana gelen gıda kaynaklı patojene bağlı Listeriosis'in neden olduğu salgınların baş göstermesi ile gelişmiştir (Farber ve Peterkin, 1991). Prevot 1948 yılında kandan bir bakteri izole etmiş ve adını *L. denitrificans* koymuştur. Bu yüzden 1961 yılına kadar, *L. monocytogenes* türüne *L. denitrificans* türünün eklenmesi ile birlikte sadece bu türler bilinmiştir. *L. denitrificans*'ın ismi 1987 yılında *Jonesia denitrificans* olarak değiştirilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991). Kısa bir süre sonra, 1966 yılında Larsen ve Seeliger, *L. grayi*'yı yeni bir tür olarak tanıtmışlardır (Skerman ve ark., 1980). *L. murray* 1971 yılında, Welshimera ve Meredith tarafından izole edilmiş (Farber ve Peterkin, 1991; Skerman ve ark., 1980), ve ismi *L. grayi* olarak değiştirilmiştir (Mclauchlin ve Rees, 2009). *L. innocua* 1981 yılında etten izole edilmiş, 1983 yılında *L. seeligeri* bitkilerden izole edilmiş, 1983 yılında *L. welshimeri* Rocourt ve Grimont tarafından çürüyen bitkilerden izole edilmiş ve 1984 yılında *L. ivanovii* I. Ivanov tarafından koyun dışkılarından izole edilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991; Mclauchlin ve Rees, 2009). Geçen birkaç yıl içerisinde, *Listeria*'nın yeni türleri bildirilmiştir. Toprak ve sudan 2010 yılında *L. marthii* ve maruldan *L. recourtie* izole edilmiştir; ek olarak 2013 yılında peynirden *L. fleishmannii*, su tarlasından *L. weihenstephanensis* izole edilmiştir. *L. aquatic* 2014 yılında ile doğal su kaynaklarından, *L. cornellensis*, *L. floridensis*, *L. grandensis* ve *L. riparia* izole edilmiştir (Parte, 2014).

1.2. Etiyoloji

Alem 'BACTERIA'

Bölüm XIII. *Firmicutes*

Sınıf I. "Bacilli"

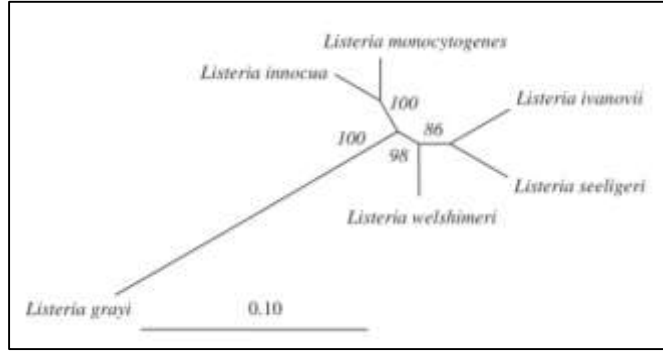
Takım I. Bacillales

Aile III. "Listeriaceae"

Cins I. *Listeria*

Bergey'in 2009 yılında yayınladığı Sistematik Bakteriyoloji açıklamasına göre, Bacillales takımı toplamda *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Listeriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Thermoactinomycetaceae* familyasından oluşan 16S dizisi ile bilinmeyen üç aile türünün birleşiminden oluşmaktadır. *Listeria* ile *Brochothrix* cinslerinin ise *Listeriaceae* ailesinden geldiği ileri sürülmektedir (Mclauchlin ve Rees, 2009). *Listeria* ailesine ait altı tür; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*'dir. (Liu ve ark., 2004; Mclauchlin ve Rees, 2009; Poulsen ve Czuprynski, 2013).

Listeria'lar 16S ile 23S-rRNA kod genetiği ile *prs*, *ldh*, *vclA*, *vclB* ve *iap* genlerine bağlı filogenetik analizine göre birbirleri ile ilişkili iki farklı kökeni olan gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri *L. monocytogenes* ve *L. innocua* türlerini içerirken diğer grup *L. welshimeri*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* türlerini içermektedir. İkinci grupta yer alan *L. welshimeri* en uzak tür olarak görülse de *L. grayi* en uzak tür olma özelliğine sahiptir (Şekil 1.1) (Schmid ve ark., 2005).



Şekil 1.1. *Listeria* genusunun 16S ve 23S rRNA, *iap*, *prs*, *vclB* ve *ldh* genlerinin analizlerini temel alan filogenetik şema (Buchrieser, 2007).

L. monocytogenes serotiplendirmesi, *L. monocytogenes* somatik (O) ile flagellar (H) antijenlerinden oluşmaktadır ve *L. monocytogenes* kendi içerisinde 13 farklı (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7) serotipe ayrılmaktadır. *L. ivanovii* 5 serovardan ve *L. innocua*, 6a ve 6b olmak üzere iki serotipten oluşmaktadır (Allerberger, 2003; Gasanov ve ark., 2005). *Listeria* türüne ait serovarlar Çizelge 1.1’de listelenmiştir.

Çizelge 1.1. *Listeria* serovarları (Allerberger, 2003).

<i>Listeria</i> türleri	Serovarlar	O-antijen	H-antijen
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	I, II, (III)	A, B
	1/2b	I, II, (III)	A, B, C
	1/2c	I, II, (III)	B, D
	3a	II, (III), IV	A, B
	3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	A, B, C
	3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	B, D
	4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C
	4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	A, B, C
	4b	(III), V, VI	A, B, C
	4c	(III), V, VI	A, B, C
	4d	(III), (V), VI, VIII	A, B, C
	4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
	7	(III), XII, XIII	A, B, C
<i>L. ivanovii</i>	5	(III), (V), VI, (VIII), X	A, B, C
<i>L. innocua</i>	6a	(III), V, VI, (VII), (IX), XV	A, B, C
	6b	(III), (V), VI, (VII), (IX), X, XV	A, B, C
<i>L. grayi</i>		(III), XII, XIV	E

Ribotiplendirme uygulaması ile gen polimorfizmi virülens analizi, *L. monocytogenes* türünün oluşmasında üç genin (ya da ayrımının) etkili olduğunu göstermektedir. Soy 1’de 1/2b, 3b, 4b, 4d ve 4e serotiplerini, Soy 2’de 1/2a, 1/2c, 3a

ve 3c serotiplerini; Soy 3'te ise 4a ve 4c serotiplerini içerisinde barındırmaktadır (Liu ve ark., 2006; Poulsen ve Czuprynski, 2013).

Moleküler tiplendirme ile *L. monocytogenes* suşları insan salgınlarında görülen epidemik klon (EC) gruplarından izole edilmiştir (Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013).

Listeria türleri fakültatif anaerobik, sporsuz ve kapsülsüz bir yapıya sahip olup, $0,4-0,5 \times 1-2 \mu\text{m}$ ölçülerinde Gram-pozitif bakterilerdir. *Listeria* türleri taze kültürlerde Gram-pozitif olmasına rağmen, eski kültürlerde kokoid ve uzun filamentli Gram-negatif görülebilmektedir. *Listeria* türleri fakültatif anaerobtur ve %5-10 CO₂ varlığında üreme özelliğine sahiptir (Allerberger, 2003; Gray ve Killinger, 1966; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999). Kanlı agarda 24-48 saat aralığında 37°C'lik inkübasyondan sonra, *Listeria* türlerinin koloni büyüklükleri 0,5-1 mm çapları arasında (inkübasyon süresi ve koloni sayısının mesafesine bağlı olarak), gri beyaz renğinde, saydam, düz, duruma göre sulu bir yapı göstermektedir. *Listeria*'ların 5 ile 10 gün sonra birbirinden iyi ayrılan çapları 3 ile 5 mm arasında değişen kolonilerinin şemsiye şeklinde ve rough varyantlar gözlemlenmektedir. Düz ve pürüzlü L formu kolonilerde ise uzunluğu $\geq 20\mu\text{m}$ olan filamentlere rastlanmaktadır (Allerberger, 2003; Gray ve Killinger, 1966; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999).

Listeria türlerinden *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* β -hemolitik özellikte iken, *L. welshimeri*, *L. gray* ve *L. innocua* hemolitik değildir. Listeriolizin O (LLO), memeli hayvanların çoğunda kırmızı kan hücrelerinin lizisinden sorumludur ve bu lizis en iyi at ya da koyun kanından yapılan kanlı agarda gözlemlenmektedir. *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* türleri ise agarda tek koloni oluşturduklarında dar bir β -hemolitik zon oluşturmaktadır. *L. ivanovii* ise geniş bir β -hemolitik zon ve hatta birden fazla zon oluşturabilmektedir. Hemolitik aktivite ve CAMP (Christie Atkins Munch-Petersen test) testleri *Listeria* türlerinin identifikasyonunda oldukça önemlidir (Allerberger, 2003; Gray ve Killinger, 1966; Markey ve ark., 2013; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999).

Listeria türleri aerobik, mikroaerofilik, fakültatif anaerobik, katalaz pozitif ve bazı durumlarda katalaz negatif, oksidaz negatif mikroorganizmalardır (Gasanov ve

ark., 2005). *Listeria* türlerini tanımlamak ve farklılıklarını ortaya koymak için başlıca şeker fermentasyon testleri; riboz, L-rhamnose, mannitol ve D-xylose'dur. Dört şeker testinden *L. monocytogenes* sadece L-rhamnose pozitif, *L. ivanovii* L-Rhamnose negatif ile riboz ve D-xylose pozitif, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* ise, sadece D-xylose pozitifdir. *Listeria*'nın metabolizma ve biyokimyasal özellikleri çok yönlü olup, Çizelge 1.3 ve Çizelge 1.2'te verilmiştir. Glukoz fermentasyonları L(+) laktik aside, asetik asidin diğer sonlu ürünlerle girdiği üretim sonucunda meydana gelmektedir. Asit, aynı zamanda amigdalin, sellobioz, fruktoz, manoz, salisin, maltoz, dekstrin, a-metil-D-glukosid ve gliserol ile elde edilebilmektedir. Galaktoz, laktoz, meleziyo, sorbitol, nişasta, sukroz ve trehalozdan meydana gelen asit üretimi değişkendir (Mclauchlin ve Rees, 2009). Asit hiçbir zaman adonitol, arabinoz, dulcitol, eritritol, glikojen, inositol, inulin, melibiyoz, rafinoz veya sorboz tarafından üretilmemektedir. Fenilalanin-deaminaz, ornitin, lisin ve arginin dekarboksilaz üretilmemektedir (Gray ve Killinger, 1966; Mclauchlin ve Rees, 2009). *Listeria* türlerinde meydana gelen şeker fermentasyonunun anaerobik koşullar altında gerçekleşmesi sonucu tüm türler homofermantatif olmakta, diğer bir deyişle laktik asit formu kazanmaktadır. Anaerobik koşullar altında sadece hektoz ve pentozlar gözlenebilmekte, diğer yandan maltoz ve laktoz nadiren gözlenirken, sükroz hiç gözlenmemektedir. *L. grayi* ve *L. murray* laktozun sadece galaktoz ve glukoz kullanırken, *L. monocytogenes* ve *L. innocua* sadece glukozu kullanmaktadır (Pine ve ark., 1989). Hemen hemen tüm suşlar metil kırmızısı ile Vouges-Proskauer (VP) pozitif reaksiyon göstermektedir. *Listeria* türleri H₂S (hidrojen sülfür) ve indol'un yanısıra üre, eskülin ve sodyum hipurati hidrolize etmemektedir. Jelatin, kazein ve sütü hidrolize edememekte ve eksojen sitrat kullanmamaktadır (Mclauchlin ve Rees, 2009).

Çizelge 1.2. *Listeria* türlerinin biyokimyasal özellikleri (Mclauchlin ve Rees, 2009).

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Asit oluşumu:						
5-Ketoglukonat	V	+	V	+	+	+
Arabinoz	-	V	-	-	-	-
Dekstrin	V	-	-			+
Galaktoz	V	V	-	-	-	+
Glukonat	-	-	-	-	-	V
Glukoz	+	+	+	+	+	+
Glukoz I-fosfat	-	+	-	-	-	-
Gliserin	+	+	+	+	+	+
Glikojen	-	-	-	-	-	-
Laktöz	+	+	+	+	+	+
Liksoz	V	-	V	-	V	V
Melezitoz	+	+	V	+	+	-
Melibioz	-	-	-	-	-	V
Eriyebilir nişasta	-	-	-	V	+	-
Sorbitol	V	-	-			-
Sukroz	-	+	+	+	+	-
Tagatoz	V	-	V	-	-	-
Trehaloz	+	+	+	+	+	+
Turanoz	+	+	+	+	+	+
Ksilitol	+	+	+	+	+	V
α-Metil-D-glukozid	+	+	+	+	+	+
α-Metil-D-mannozid	+	-	+	-	+	+
Hidroliz oluşumu :						
Eskülin	+	+	+	+	+	+
Selüloz	-	-	-			-
Hippurate	+	+	+			-
Nişasta	V	V	V	V	V	+
Amino asit peptidaz:						
Alanin	-	+	+	+	+	+
Lizin	-	+	+	+	+	+
Asit fosfataz	+	+	+	+	+	-
Kimotripsin	+	V	+	+	+	+
Sistin arilamidaz	-	-	-	-	-	+
%10 NaCl içeren pepton su üreme	V	V	+	V	+	+
10µg/ml tryptaflavin içerisinde üreme	+	+	+	+	+	-
Lösin esteraz	V	V	+	+	+	+
Metil kırmızısı	+	+	+	+	+	+
N-Asetil-β- glukozaminidaz (NAG)	V	V	V	+	+	+
Nitratin nitrite indirgenmesi	-	-	-	-	-	-
Fosfoamidaz	+	+	+	+	+	-
Tween 80 esteraz	+	V	+	V	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+	+	+
α-Glucozidaz	V	+	+	V	-	+
β-Glucozidaz	+	+	+	-	+	+
Patojenite (fare)	+	+	-	-	-	-
Mol % G+	37-39	37-38	36-38	36	36	41-42
Hücre duvar tipi	A1γ	A1γ	A1γ	A1γ	A1γ	A1γ
Başlıca peptidoglikan diamino asit	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP	meso-DAP
Başlıca menakinon	MK-7	MK-7	MK-7			MK-7
+ = pozitif, - = negatif, D= değişken						

Hemolitik aktiviteler ve CAMP testi ile *Listeria* türleri arasındaki farklılıklar gözlemlenmektedir. *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* *S. aureus* ile hemoliz oluştururken, *L. ivanovii*, *R. equi* ile hemoliz oluşturmaktadır (Çizelge 1.3). Bununla birlikte, *L. monocytogenes* ile *R. equi*'nin pozitif reaksiyon gösterdikleri CAMP testleri de mevcuttur, bu sebeple yapılan CAMP testlerinin reaksiyonları dikkatli yorumlanmalıdır (Allerberger, 2003; Gray ve Killinger, 1966; Quinn ve ark., 1999).

Çizelge 1.3. *Listeria* türlerinin ayırıcı özellikleri. (Mclauchlin ve Rees, 2009).

<i>Listeria</i> türleri	Testleri			Şekerlerden asit üretimi			
	Agarda β-hemoliz	CAMP testi		Riboz	Ramnoz	Mannitol	Ksiloz
		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>				
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	D	-	+	-	-
<i>L. ivanovii</i>	++ ^a	-	+	+	-	-	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	++	-	+	-	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	D	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	D	-	+
<i>L. grayi</i>	-	-	-	D	D	+	-

+ = pozitif, - = negatif, D= değişken, ++^a daha geniş yada birkaç hemoliz zonu oluşturabilmektedir.

Sıvı kültürde 25°C'de 2-4 saat süreyle inkübe edilen bakteriler karakteristik bir 'tumbling motility'denilen takla atma, yuvarlanma hareketi göstermektedir. Peritrik flagella 20-25°C'de aktif olmakta ve karakteristik yapıdaki "yuvarlanma hareketi" göstermektedir. *Listeria* türleri oda sıcaklığında 1-5 adet arasında peritrik flagellaya sahipken, 37°C'de sürekli dönme özelliği kazanmaktadır. *Listeria* türleri genellikle yarıkatı besiyerinin yüzeyinde şemsiye benzeri üreme göstermektedir. %0,2-0,4 agar içeren yarıkatı besiyeri yüzeyinden 1 cm alta ekim yapılan *Listeria* suşları 20-25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bir süre sonrasında belirgin bir bulanıklık gözlemlenmiştir. Agar yüzeyinin 0,5 cm aşağısında şemsiye şeklinde oldukça büyük bir katman görülmüş ve bu sayede oksijeni azaltılmış bu alanda *Listeria* üremesinin, aerobik ve anaerobik ortamda gösterdiği üremeye karşın çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. (Allerberger, 2003; Farber ve Peterkin, 1991; Gray ve Killinger, 1966; Mclauchlin ve Rees, 2009; Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999).

Listeria türleri için en iyi üreme sıcaklığı 30-37°C arasında iken, 0'dan 45°C'ye kadar üreme gözlenmektedir. Bununla birlikte *Listeria* türleri psikrofilik mikroorganizmalar grubundadır (Mclauchlin ve Rees, 2009). *L. monocytogenes* genellikle ısıtıldığı ya da pastörize olduğu zaman canlılığını yitirmektedir; 69°C'de yaşayamayan bu tür, sütün içerisinde 16,2 dk'dan fazla kalamamakta ve 70°C'de pişen etin içerisinde ise 2 dk'da inaktif hale gelmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Gray ve Killinger, 1966; Paracıkoğlu). 37°C'de üretilen *Listeria*'ların tekrarlanan donma ya da erime reaksiyonlarına karşı dayanıklılıkları 25°C'nin altında üretilenlere göre çok daha fazladır. Diğer mikroorganizmalarda, soğuk ortama alıştırmamanın bakterilerin tekrar donma ve erimeye karşı gösterdiği toleransın artırdığını göstermiştir (Azizoglu ve ark., 2009). Bir saat boyunca 45°C'de uygulanan ısı şoku sonucunda *L. monocytogenes*'in NaCl (sodyum klorür), etanol ve kristal violet (Gram-pozitif bakterilerin gelişimini inhibe etmek için kullanılan reaksiyon) toleranslarının arttığı görülmüştür. Diğer bir taraftan, 10 dk boyunca 48°C'de uygulanan ısı şokunun ise *L. monocytogenes*'in NaCl'e olan direncini artırdığı, buna karşın H₂O₂ (hidrojen peroksit) ve kristal violete olan direncinin azalttığı gözlemlenmiştir (Lin ve Chou, 2004). Isı işlemi uygulanmış olan bakteri hücreleri herhangi bir işlem görmemiş bir bakteri hücresiyle aynı derecede patojeniktir. Diğer bir yandan ise, ısı işlemi uygulanan *L. monocytogenes* hücreleri diğer hücrelere nispeten daha az risk teşkil etmektedir (McCarthy, 1991). *Hly* ve *actA* gibi temel virülens genler için en uygun sıcaklık 37°C iken, 30°C'de ise bu genlerin baskılandıkları bilinmektedir. Flagellin, motilite ve kemotaksis gibi özelliklerin ise 37°C'de baskılanırken, 25°C ve altı sıcakların bu özellikler için ideal olduğu gözlenmiştir (Leimeisterwachter ve ark., 1992).

Listeria türleri optimal olarak nötral pH (pH 7,0)'da ürerlerken, pH5,5 - 9,6'da da üreme göstermektedirler. *Listeria* türlerinin çoğu ozmotik basınca dayanıklılık göstermekte ve %10'luk NaCl ortamında üreme üreyebilmektedirler. *Listeria* türleri 0,900 ve 0,945 arasında su aktivitesine (a_w) dayanıklıdır ve üreme hızı sıcaklığın düşüşüne bağlıdır (Allerberger, 2003; Farber ve Peterkin, 1991; Gray ve Killinger, 1966; Koutsoumanis ve ark., 2004; Mclauchlin ve Rees, 2009; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999).

L. monocytogenes sefalosporin (sefazolin, seftiofur, sefpirom), kinolonlar, fosfomisine ve klindamisin'e dirençlidir. Birçok tür, penisilin G, amoksisilin, aminoglikozidler (gentamisin), tetrasiklinler, fenikoller, trimetoprim ve sülfonamidler, rifampin, glikopeptid (vankomisin)'e karşı duyarlıdır (Granier ve ark., 2011; Troxler ve ark., 2000). Tetrasikline direnç gösteren suşlar çok az olmakla beraber bazı et türlerinden (biftek, koyun eti ve domuz) ve bitkilerden izole edilmiştir. Eritromisine karşı direnç gösteren suşlar ise çevresel kaynaklardan ve gıda örneklerinden saptanmışken, penisiline karşı direnç tespit edilmemiştir (Granier ve ark., 2011). *L. ivanovii* fosfomisine karşı duyarlılık gösterirken, *L. innocua* ve *L. monocytogenes* ise direnç göstermektedir. *L. ivanovii*, fusidik aside en duyarlı türdür ve kinolonların çoğuna karşı direnç göstermektedir (Troxler ve ark., 2000).

Listeria türlerinin büyüme faktörleri 6 amino asit grubundan oluşmaktadır: lösin, izolösin, arginin, metiyonin, valin, sistein ile 3 tane suda çözünür vitamin olan: tiamin (B1), riboflavin (B2) ve biyotin (B7); ve tiotik asittir. Üreme, Fe³⁺ ile fenilalanin tarafından gerçekleştirilmektedir. Glikoz ve glutamin, karbon ve azotun birincil kaynağı olarak gösterilmektedir. Früktoz, manoz, sellobiyoz, trehaloz, maltoz, gliserol ve amino grup şekerler olan glukosamin, N-asetilglukosamin ve N-asetilmuramik gibi şeker glükozunun olmaması üremeyi desteklemektedir. *L. monocytogenes* üremesi için gerekli kimyasalları içeren özel besi yerleri geliştirilmiştir (Premaratne ve ark., 1991; Tsai ve Hodgson, 2003).

Günümüze kadar 4 *L. monocytogenes* (1/2b: F6854 ve Egede; 4b: F2365 ve H7858) 1 *L. welshimeri* ve 1 *L. ivanovii* (PAM 55) suşunun gen dizileri saptanmıştır (Buchrieser, 2007; Buchrieser ve ark., 2011). Günümüzde sekanslanan bütün Listerial genomlar 2,7 ve 3,0 milyon bp (baz çifti) arasındadır. *L. monocytogenes* suşları ortalama %38 G+C içeriğine sahip ve genom uzunluğu 2 893 921 ile 2 953 211 bp arasındadır. Yaklaşık 2900 protein kodlayan gene sahiptir. *L. innocua* CLIP11626 kromozomu ortalama %37 G+C içeriğine sahip olup 3 011 209 bp uzunluğunda olup ve yaklaşık 2973 protein kodlayan gene sahiptir (Glaser ve ark., 2001; Nelson ve ark., 2004). *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* PAM 55, *L. monocytogenes* suşlar olup ortalama %37,1 G+C içeriğine sahip ve genom uzunluğu 2 928 879 bp uzunluğundadır. Yaklaşık 2782 protein kodlayan gene sahiptir. (Buchrieser ve ark., 2011). *L.*

welshimeri genomu daha küçük olup %36,4 G+C içeriğine sahip olup 2.814.130 bp uzunluğunda olup ve yaklaşık 2780 protein kodlayan gene sahiptir (Buchrieser, 2007). *Listeria* genomlarının en ilginç özelliği genom organizasyonunda geniş ve güçlü korunan bir bölgeye sahip olmalarıdır. Bu korunan genom organizasyonunun düşük IS (insertion sequence) elementinin varlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Buchrieser, 2007).

Listeria genomunun tanımlanması, o suşun patojenitesini belirlemekte ve türler arasındaki ortak özellikleri ve türe spesifik karakteristikleri ortaya koymada yarar sağlamaktadır. *L. monocytogenes*'in genom yapısı toplamda 133 yüzey proteinlerden oluşmaktadır. Genom'un kodlama kapasitesinin %5'lik kısmını yüzey proteinleri oluşturmaktadır. Buna ek olarak, hücre yüzeyi proteinlerini kodlayan genlerin %22'lik kısmı *L. innocua*'da bulunmamaktadır. Dolayısıyla, bu iki tür arasındaki temel farklılığın yüzey protein bileşenlerinden kaynaklandığı ortaya konmuştur (Buchrieser, 2007; Cabanes ve ark., 2002). *L. monocytogenes*'in virülens faktörü geninin ekspresyonu bir transkripsiyonel aktivatör, *prfA* (peptide chain release factor 1) geni tarafından regüle edilmektedir (Cabanes ve ark., 2002; Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013). *PrfA* aynı zamanda internalin ve LLO'nun transkripsiyonu artırıp *prfA* geninde bulunan hızlandırıcıları düzenlemektedir (Gray ve ark., 2006). *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin kümelediği virülens genleri aynı zamanda sırasıyla, phosphatidylinositol-specific phospholipase C ve the phosphatidylcholine-dependent phospholipase C (PI-PLC)'yi kodlayan *plcA* ve *plcB* genlerini barındırmaktadır. *ActA* geni aktinin yapısına katılmaktadır (Schmid ve ark., 2005).

1.3. Epidemiyoloji

Listeria spp.'ye doğada yaygın olarak rastlanılmasına rağmen inek ve koyunlardaki Listerial infeksiyonlar tamamen kötü kaliteli silaj tüketimine bağlı olmaktadır. Silaj pH'sı 5,0'dan daha fazlaysa, silaj asiditesini kaybetmeye başlamakta ve bu ortam *L. monocytogenes* için mükemmel bir yaşama ve çoğalma alanı oluşturmaktadır (Durmaz ve ark., 2015; Farber ve Peterkin, 1991). Silajdaki bakteriyel yük

10^7 CFU/kg'a kadar çıkabilmektedir (Quinn ve ark., 2011). Silajın toprakla karıştırılması kontaminasyon riskini arttırmaktadır (Brugère-Picoux, 2008). Listerial infeksiyonlara, hayvanların saman yerine daha çok silaj yemeyi tercih ettikleri kış ve ilkbaharın başında daha çok rastlanılmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Farber ve Peterkin, 1991; Low ve Donachie, 1997; Paracıkoğlu, 2006). Ruminantlardaki Listerial infeksiyonun silaj tüketimine bağlı olması sebebiyle bu tip infeksiyonlar "silaj hastalığı" olarak da tanımlanmaktadır (Gray ve Killinger, 1966; Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006).

L. monocytogenes doğada oldukça yaygın olup insanlar dışında 50 farklı türden izole edilmiştir. Ruminantlar gibi gıda kaynağı olan hayvanlarda infeksiyon kaynağı olarak görülen toprakta ve saprofit olarak sebzelerde de saptanmıştır (Czuprynski ve ark., 2010; Farber ve Peterkin, 1991; Gray ve Killinger, 1966; Paracıkoğlu, 2006). Kümes hayvanlarında ve balık, kırmızı et, süt, peynir gibi hayvanlardan elde edilen gıdaların çoğunda da *L. monocytogenes* ile karşılaşmaktadır (Farber ve Peterkin, 1991; Low ve Donachie, 1997; Poulsen ve Czuprynski, 2013). Standart sanitasyon sonrasında bile atık sudan ve gıda işleme sırasındaki diğer yüzeylerden izole edilebilmektedir (Czuprynski ve ark., 2010; Farber ve Peterkin, 1991). Gübre atılan ya da süt sağılan bir ortamda *L. monocytogenes* haftalar boyunca canlı kalabilmektedir. Tarımsal bölgelerde yaşayan vahşi kuşların dışkıları yüksek derecede *L. monocytogenes*'i çevreye bulaştırabilmektedir (Brugère-Picoux, 2008). Çoğu sağlıklı hayvan *Listeria* bakımından taşıyıcı olabilmektedir.

Kontamine silajlar infeksiyonun en temel kaynağıdır. Hayvanlarda *Listeria* infeksiyonları kışın ile baharın ilk aylarında gözlenmektedir. Bu dönemde hayvanların saman yerine silaj ile beslenmelerinin bu sonucu doğurmuş olabileceği düşünülmektedir (Czuprynski ve ark., 2010; Farber ve Peterkin, 1991; Low ve Donachie, 1997; Paracıkoğlu, 2006). Bazı durumlarda aynı *L. monocytogenes* ribotipi hem infekte hayvandan hem de kontamine silajdan izole edilmiştir (Czuprynski ve ark., 2010). Bu nedenle mevsim değişiklikleri mera hayvanları için önemli olsa da çiftlik hayvanları için önemli bir faktör değildir (Czuprynski ve ark., 2010). Sıcak mevsimlerde hastalıkların yaygınlaştığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Brugère-Picoux, 2008). Beslenme yetersizliklerine bağlı stres faktörleri, çevre

koşulları, diğer immunsupresif hastalıklar ve hamilelik gibi stres içerikli durumlar klinik hastalık olarak değerlendirilmektedir. İnsanlarda meydana gelen vakaların ise yaz aylarında ve kentsel bölgelerde meydana geldiği rapor edilmiştir (Narayanan, 2013).

Klinik hastalıklar genelde ruminantlarda görülmektedir (Poulsen ve Czuprynski, 2013). İneklere oranla *Listeria* infeksiyonları koyunlarda daha sık gözlenmektedir (Campero ve ark., 2002; Wagner ve ark., 2005). Amerika Birleşik Devletler (ABD)'de infeksiyonlar için en çok günlük süt ve etin üzerinde durulurken dünyanın çoğu ülkesinde bu önem koyun ve keçilerin üzerinde toplanmıştır (Czuprynski ve ark., 2010; Gray ve Killinger, 1966; Low ve Donachie, 1997). İnfeksiyon kapmış hayvanlar yalnızca bir klinik form göstermektedir. Koyun sürülerinde meydana gelen silaja bağlı tek bir abort, ensefalit veya septisemi Listeriozisin varlığını göstermektedir (Wagner ve ark., 2005). Veterinerler ve çiftçiler *Listeria* abortları ile içiçe olduklarından deri lezyonları taşımaktadırlar ve bu deri lezyonları *Listeria*'nın en yaygın zoonotik klinik tablosudur (Czuprynski ve ark., 2010; Gray ve Killinger, 1966; Low ve Donachie, 1997; Paracıkoğlu, 2006).

L. monocytogenes ile mücadelede süt aracılığıyla bulaşmanın tehlikeli olduğu düşünülenerek büyük ve küçük ruminantlar daha çok önem teşkil etmektedir. Çevre faktörleri ile de birlikte *L. monocytogenes* mastitiste ve sütle bulaşmada etkili rol oynamaktadır. Dolayısıyla pastörize edilmeden piyasaya sürülen günlük süt ürünleri insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013). Bununla birlikte *L. monocytogenes*, pastörize olan ürünlerde de ortaya çıkabilmektedir çünkü daha önce bahsedildiği gibi hücre içine yerleştikleri için yüksek ısıya tolerans gösterebilen mikroorganizmalardır. (Quinn ve ark., 2011). Kontaminasyon kaynakları insan hayvan veya çevreyle ilişkili olabilmektedir. (Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013; Wagner ve ark., 2005). Ruminantlarda abort oranı düşük gözlenmiş olsa da, koyunlarda %10, ineklerde ise %5 civarında olduğu rapor edilmiştir (Narayanan, 2013). *L. monocytogenes*'den ileri gelen hastalık ve ölüm oranının çoğu bakteriyel gıda orijinli hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Listeriozis, rapor edilen insan hastalıklarında diğer gıda kaynaklı hastalıklara (*Campylobacter* ve *Salmonella*) oranla daha az rastlanılmakta fakat

Listeriozis kaynaklı insan ölümleri diğer gıda kaynaklı hastalıklara göre çok daha fazladır (ABD’de %20) (Czuprynski ve ark., 2010).

Kobaylarda %50 fetal infeksiyonlarının dozu 10^7 CFU’dur (Williams ve ark., 2007). Bir Listeriozis salgınında, abort olan 20 fötusun içorganlardan alınan 55 örnekten 5’inde *L. monocytogenes* izole edilmiştir. İzole edilen *L. monocytogenes* sayısının (üç hayvanda yapılan araştırma) fetal karaciğer, dalak, kalp, akciğer ve beyinde log 3,1 - 5,6 CFU/g arasında olduğu saptanmıştır. *L. monocytogenes*, aynı zamanda fötusun mekonyumundan da bulunabilmektedir. İki yetişkinde beyin hariç tüm duyu organlarında log $>5,5$ CFU/g değerinde *L. monocytogenes*’a rastlanmıştır.

İnsan ve hayvan Listeriozislerin çoğunluğunda 4b, 1/2b ve 1/2a serotipleri etkilidir (Farber ve Peterkin, 1991; Liu ve ark., 2006). Türkiye’de evcil hayvanlar üzerinde Listeriozisin seroprevalansını inceleyen araştırmalar bulunmaktadır (Arda ve ark., 1987; Erdoğan ve ark., 1999; Gazyağcı ve ark., 2009; İnci ve ark., 2002; Öcal ve ark., 2008; Solmaz ve ark., 2002; Yıldız ve ark., 2009). Epidemik insan Listeriozisin serotiplerinin genellikle Soy I suşu ile bağlantılı olduğu söylenmektedir. Soy I suşu epidemik olarak insanlarda %92 oranında, sporadik olarak %62 oranında ve hayvanlarda %42 oranında bulunmaktadır. Soy II suşu serotipleride aynı zamanda insan ve hayvan hastalıkları ile bağlantılı olup, epidemik olarak insanlarda %7 oranında, sporadik olarak %36 oranında ve hayvanlarda %47 oranında meydana gelmektedir. Soy III suşu ise insanlarda %1 oranında, hayvanlarda %10 oranında görülmektedir. Sonuç olarak insan ve hayvan izolatlarından çok Soy I ve II suşları gözlenmektedir (Jeffers ve ark., 2001).

1.4. Patogenez

Hücre içi patojen modeli olarak üzerinde en çok çalışmaların yapıldığı bakterilerden biri *L. monocytogenes*’dir. Etken, fagositik (makrofajlar, dentritik hücreler) ve fagositik olmayan hücreler (parankimal hücrelerin çeşitli tipleri) gibi çok çeşitli hücrelere invaze olmakta ve bu hücrelerde çoğalmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013). *L. monocytogenes*, çok sayıda virülens faktöre sahiptir. Virülens faktörleri arasındaki karmaşık mekanizmalar sayesinde etken, konak hücreye

tutunma, hücre içine girme, hayatta kalma ve hücre içinde çoğalma gibi özellikler kazanmaktadır. Bu virülens faktörleri, kendi içerisinde Internalin A (InlA) ve Internalin B (InlB) proteinleri, iki fosfolipaz C (PI-PLC) ve Actin assembly-inducing protein (ActA)'dan oluşmaktadır (Poulsen ve Czuprynski, 2013). Listerial infeksiyonların patogenezi üzerine fare modelleri ve hücre kültürlerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu durum, araştırmacıları insan ve ruminantlarda da *L. monocytogenes* üzerine çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir (Czuprynski ve ark., 2010).

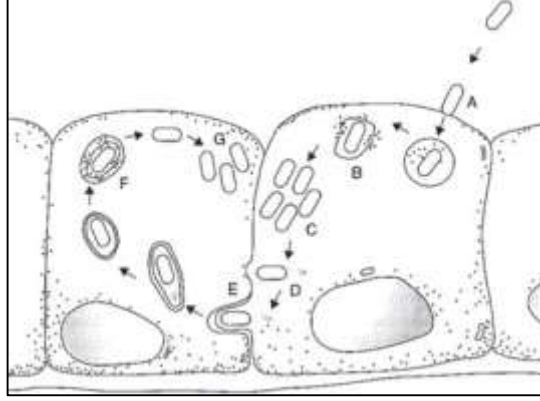
L. monocytogenes, genellikle kontamine silajların tüketilmesi yoluyla vücuda alınmaktadır. Ağız yoluyla alınan *L. monocytogenes*'in çoğu, düşük pH'ya sahip mideden geçememekte ve mide asidinde ölmektedir. Mide asidinden etkilenmeyenler ise bağırsağa ilerlemektedirler. Bağırsak translokasyonu, bağırsak epitel hücreleri ile peyer plaklarında bulunan M hücrelerini kapsayan pasif süreci ifade etmektedir. Etken bağırsak bariyerini aştıktan sonra lamina propriadaki fagositik hücrelere invaze olmaktadır. Etken buradan kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılmaktadır. Gebe hayvanlarda plasentaya geçiş (transplasental) söz konusu olmaktadır (Narayanan, 2013; Poulsen ve Czuprynski, 2013). Etkenin oral, nazal ve oküler mukoza yüzeyindeki lezyonlardan geçebildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. *L. monocytogenes*'in koyunlarda diş dökülmesi (kaybı) ya da diş kırıkları olduğunda, diş kökü yoluyla penetre olduğu düşünülmektedir. Etken bu yolla vücuda girdikten sonra kranial sinirler yoluyla (özellikle de trigeminal sinir) beyine ulaşmakta ve merkez sinir sistemi (MSS) infeksiyonuna sebep olmaktadır (Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011). Meme bezinin infeksiyonu ise kan ya da çevresel yolla olabilmektedir (Brugère-Picoux, 2008).

L. monocytogenes hücre yüzeyinde internalin adı verilen proteinleri taşımaktadır. Internalin A (InlA) ve Internalin B (InlB) sırasıyla, konak hücre yüzeyinde bulunan E-cadherin (Ecad) ve c-Met tirozin kinaz ile etkileşime geçerek etkenin hücreye penetre olmasını sağlamaktadır (Lecuit ve ark., 2001). Plasental villus üzerindeki InlA ve Ecad etkileşimi *L. monocytogenes*'in trofoblastlara girişini sağlamaktadır (Lecuit ve ark., 1999). InlB, hepatosit büyüme faktörü reseptörü ile etkileşime girmektedir (Narayanan, 2013). *L. monocytogenes* birçok internalin proteinine sahiptir ancak fonksiyonları net olarak bilinmemektedir. InlA, 80 - kDa

ağırlığa sahip bir yüzey proteinidir ve gastrointestinal sistem epitel hücrelerine girişte önemli bir rol oynamaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013). *InlA* geninde mutasyon oluşturulmuş *L. monocytogenes* ile yapılan bir çalışmada; mutant bakterinin, kobay epitel hücrelerine girişte, mutasyon oluşturulmamış bir suşla karşılaştırıldığında, 200 kat azalma olduğu ortaya konmuştur (Lecuit ve ark., 2001). Ek olarak, apatojen olan *L. innocua* InlB yüzey proteini ve *L. monocytogenes* genomu tarafından kodlanan yüzey proteinlerinin %20'sinden fazlasını da taşımamaktadır (Cabanès ve ark., 2002).

Listeria fagositik olmayan hücrelere vakuoller (fagozom) içerisinde alınmaktadır (Narayanan, 2013). Bakteri hücre içerisine alındığında, lizozomal aktivite başlamadan önce, fagozomlardan kaçarak konak hücre sitoplazmasına çıkmaktadırlar. *Listeria* bu kaçışı, LLO proteini ve phosphatidylinositol-specific phospholipase C sayesinde yapmaktadır. Fagozomdan kaçışı sağlayan LLO proteininin konak hücre için toksik etkisi bulunmamaktadır (Decatur ve Portnoy, 2000). LLO, asidik ortamlarda (fagozom) aktiftir (Czuprynski ve ark., 2010). LLO, *Listeria*'nın plasenta ve fötusa invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Le Monnier ve ark., 2007). İvanolizin, *L. ivanovii*'nin LLO proteinidir ve LLO ile aynı fonksiyonel görevi yürütmektedir (Narayanan, 2013). Hücre sitoplazmasında bulunan *L. monocytogenes*'in 37°C'de bölünme zamanının yaklaşık 1 saat olduğu tahmin edilmektedir (Czuprynski ve ark., 2010; Decatur ve Portnoy, 2000; Poulsen ve Czuprynski, 2013). Hücre içerisinde bölünen *Listeria*'lar; hareketi sağlayan ActA yüzey proteini sayesinde, infekte hücrenin periferine hareket etmektedirler. Ayrıca ActA, konak hücrenin aktin filamentlerinin polimerizasyonunu da sağlamaktadır. Yeni bir hücreye girmeye çalışan bakteri, çift hücre membranını (infekte hücre ve yeni hücre membranı) geçmek zorundadır ve böylece yeni bir enfeksiyon siklusu başlamaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Narayanan, 2013; Poulsen ve Czuprynski, 2013). ActA'nın ekspresyonu, konak hücre içi ortamı ya da hücre lizatlarına bağlı olarak artmaktadır. ActA mutantları, hücre içerisinde çoğalabilmekte ancak komşu hücrelere invaze olamamaktadırlar (Czuprynski ve ark., 2010). Örneğin, apatojen *L. innocua*, ActA proteinine sahip değildir (Cabanès ve ark., 2002). Ek olarak ActA, *L. monocytogenes*'in fetoplasental bariyeri aşmasını ve hücreden hücreye geçişini sağlamaktadır (Le Monnier ve ark., 2007). Çift katlı membrandan oluşan fagozomdan

kaçmak için; yeniden LLO, farklı bir fosfolipaz C ve phosphatidylcholine-dependent phospholipase C kullanılmaktadır. Ve yukarıda bahsedilen hücre içi hareketlilik ile hücreden hücreye geçiş gerçekleşmektedir (Decatur ve Portnoy, 2000). *Listeria* 'lar bu yolla; ekstraselüler sıvılara, konak hücrenin savunma mekanizmalarına ve konak hücreye direkt olarak maruz kalmaktan kaçınarak hücreden hücreye yayılmaktadırlar (Czuprynski ve ark., 2010; Narayanan, 2013; Poulsen ve Czuprynski, 2013).



Şekil 1.2. Konak hücrelerinde *L. monocytogenes*'in basitleştirilmiş bir illüstrasyonudur. A -Internalizasyon, B -Fagozomal kaçış, C - Çoğalma, D - Hücre içi hareket, E- Hücreden hücreye yayılma, F - Çift membranlı kofuldan kaçış G – Çoğalma (Poulsen ve Czuprynski, 2013).

Hly (LLO ve ActA'yı kodlar) gibi önemli virülens genlerinin ekspresyonunun, 37°C'de optimal düzeyde olduğu; ancak 30°C'den düşük sıcaklıklarda önemli derecede baskılandığı bilinmektedir (Leimeisterwachter ve ark., 1992). Bu genlerin ekspresyonu da sıcaklık ve pH'dan etkilenmektedir. *PrfA*; 25°C'den düşük sıcaklıklarda eksprese olmamakta ancak *L. monocytogenes* yine de bu sıcaklıklarda üreyebilmektedir. Bu durum, klinik *L. monocytogenes* izolatlarının, klinik olmayan izolatlara (çevresel, bitki, donmuş gıda izolatları) oranla daha patojen olduğunu göstermektedir. *PrfA* aktivitesi, fagozom ya da mide gibi düşük pH'ya (pH 4,5–5,5) sahip ortamlarda artmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Poulsen ve Czuprynski, 2013). Bunlara ek olarak, apatojen olan *L. innocua*'da *prfA* bulunmamaktadır (Cabanés ve ark., 2002).

1.5. Klinik Belirtiler

Listerialar doğada yaygın olarak bulunmakta ve insan dışında 50'den fazla hayvan türünden izole edilmektedir. *Listeria* cinsine ait türlerden yalnızca *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* patojen karakterdedir. *L. ivanovii* başta ruminantlar olmak üzere hayvanlarda infeksiyon yaparken; *L. monocytogenes*, hem insanlar hem de hayvanlarda infeksiyon yapmaktadır (Farber ve Peterkin, 1991; Gray ve Killinger, 1966; Low ve Donachie, 1997; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011). Ancak, son yıllarda insanlarda *L. ivanovii* infeksiyonlarına yönelik bildirimler de bulunmaktadır (Low ve Donachie, 1997; Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006; Poulsen ve Czuprynski, 2013).

1.5.1. Ruminantlarda Listeriozis

Listeriozis nadir görülen bir hastalıktır ancak evcil hayvanlar arasında en çok ruminantlarda görülmektedir (Gray ve Killinger, 1966). Listeriozise ABD'de en çok ineklerde, Dünya'nın diğer ülkelerindeyse koyun ve keçilerde rastlanmaktadır. *Listeria* türleri hayvanlarda MSS infeksiyonu, abort, septisemi, nadiren gastroenterit ve mastit, keratokonjonktivit gibi lokal infeksiyonlara sebep olmaktadır. *Listeria* spp. ile infekte hayvanlar yukarıda bahsedilen klinik formlardan yalnızca birini göstermektedir (Vazquez-Boland ve ark., 2001). Abortif ve MSS infeksiyonları ruminantlarda en sık rastlanılan formlar iken; septisemiler genellikle yenidoğan ve kümes hayvanları arasında gözlemlenmektedir (Czuprynski ve ark., 2010; Quinn ve ark., 2011).

1.5.1.1. Septisemik Form ve Gastroenteritis

Listeriozisin septisemik formuna genellikle tek mideli, geniş getiren ve yeni doğanlarda, nadiren de gebe koyunlarda rastlanılmaktadır. İnkübasyon periyodu 2 ile 3 gün arasında değişmektedir (Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011).

Klinik belirtiler depresyon, ateş, iştahsızlık ve ölümdür. Uterusta ölen fötüs, annede septisemiye yol açabilmektedir. Gastroenterit formu nadiren görülmekle birlikte; abomazum ve bağırsak mukozasında ülserasyon ve ağır bir ishalle seyretmektedir. İnkübasyon periyodu 1 ile 2 gün arasında değişmektedir. Ayağa kalkamama ve ani ölüm gözlenmektedir (Brugère-Picoux, 2008).

1.5.1.2. Ensefalitik Form

Ruminantlarda *L. monocytogenes*'in sebep olduğu en yaygın klinik form MSS infeksiyonudur. Meningoensefalit yetişkinlerde görülürken, meningit ise fonksiyonel olarak aktif rumeni olmayan ya da rumeni tam gelişmemiş genç hayvanlarda gözlenmektedir (Gray ve Killinger, 1966). *L. monocytogenes* ağız, burun ya da göz mukozasındaki yaralardan vücuda girmektedir. Bu durumun koyun kırkım zamanlarında ya da diş düşmesi-çekilmesi sırasında oluşan açık yaralar yoluyla olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kötü kaliteli silajla besleme de etkenin vücut içine alımında rol oynamaktadır. Etken vücut içine alındıktan sonra kranial sinirler boyunca ilerleyerek MSS infeksiyonunu oluşturmaktadır (Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011; Vazquez-Boland ve ark., 2001). Listeriozisin ensefalit formunda inkübasyon periyodunun 14 ile 40 gün arasında olduğu belirtilmektedir (Wagner ve ark., 2005) (Vazquez-Boland ve ark., 2001). Bu form, ineklerde kronik bir seyir izlemektedir. Klinik belirtiler, depresyon ve iştahsızlık ile başlamaktadır (Low ve Donachie, 1997). Bazı vakalarda klinik belirtiler değişkenlik gösterse de; genellikle başın bir tarafa dönmesi, çift taraflı yüz kaslarında felç görülmesi (göz kapakları ve kulakların sarkması), dilin dışarı çıkması ve ağızdan salya akması gibi belirtiler gözlemlenmektedir. Bazı durumlarda keratit de meydana gelmektedir. İnfeksiyonun başlangıcında vücut ısısı oldukça yüksektir. Klinik belirtilerin ortaya çıkışını takip eden birkaç gün içerisinde koyun ve keçilerde ayağa kalkamama ve sonrasında ölüm görülmektedir. Hastalık, ineklerde daha uzun sürmekte; koyun ve keçilerde ise akut bir seyir izlemekte ve çoğunlukla ölümlerle sonlanmaktadır. Etken sinir sisteminde lezyonlara sebep olduğundan infekte hayvanlar, kendi etraflarında dönme hareketi yaparlar. Bu hareketten dolayı Listeriozise “dönme hastalığı” da denmektedir. İnfeksiyonun son aşamasındaki koyun ve keçiler oldukları yere düşmekte ve 2-3 gün içerisinde ölmektedirler. İnfeksiyonun daha uzun bir seyir izlediği ineklerde yaygın

olarak tremorlar da görülmektedir (Czuprynski ve ark., 2010; Low ve Donachie, 1997; Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011).

1.5.1.3. Abortif Form

Koyun ve ineklerde görülen sporadik abortlara *L. monocytogenes*'ten ziyade *L. ivanovii* sebep olmaktadır (Quinn ve ark., 2011). Koyun ve inek Listeriozisinin, kötü kaliteli silaj tüketimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Farber ve Peterkin, 1991). Yem tüketimini takiben *Listeria* spp. bağırsak mukozasına penetre olmakta, buradan lenf ve kan yoluyla yayılmakta ve gebe hayvanlarda plasental yolla yavruya geçmektedir (Quinn ve ark., 2011). Listerial abortlarda inkübasyon periyodunun 18 ± 2 gün olduğu bildirilmiştir (Wagner ve ark., 2005). Hiçbir klinik belirti göstermeden gerçekleşen abortlar, etkenin alımını takiben yaklaşık 12 gün içerisinde gerçekleşmektedir. Gebelik sırasında meydana gelen Listeriozis iki döneme ayrılmıştır; gebeliğin ilk dönemlerinde Listeriozis, gebeliğin ileri dönemlerinde Listeriozis (Poulsen ve Czuprynski, 2013). Gebeliğin ilk dönemlerindeki Listeriozis, abort ya da fötusun emilimi ile sonuçlanmaktadır. Gebeliğin ileri dönemlerindeki Listeriozis ise daha sık görülmekte ve genellikle gebeliğin üçüncü üç aylık döneminde meydana gelmektedir. Bu dönemde meydana gelen Listeriozis vakalarında gebelik; abort, ölü doğum ya da erken doğum ile sonuçlanmaktadır (Poulsen ve Czuprynski, 2013). Bu durum ineklerde 7 ay, koyunlarda ise 12 hafta sonra meydana gelmektedir. Aborte fötuslar zayıf, agoni ve masere halde çıkartılmaktadırlar. Ayrıca metrit ve plasentanın tam olarak atılamaması durumları da rapor edilmektedir. Fötal septisemi durumlarında fötusta, sistemik infeksiyon belirtileri de görülmektedir (Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011).

1.5.1.4. Lokal İnfeksiyonlar

İnek ve koyunlarda keratokonjunktivit ile karakterize olan göz formu genellikle tek taraflı seyretmekte ve kötü kaliteli silaj ile direkt temas etmeye bağlı olduğu bildirilmektedir (Quinn ve ark., 2011). Mastit, akut ya da kronik olabilmekte ve genellikle subklinik gelişmektedir (Narayanan, 2013). Belirti olarak sadece etkilenen bezin atrofisi görülebilmektedir (Brugère-Picoux, 2008).

1.5.2. Diğer Hayvanlar Türlerinde Listeriozis

At, köpek, kedi ve domuzlarda klinik listeriozis oldukça nadir meydana gelmektedir. Kedi ve köpeklerde listerial septisemi seyrek olarak görülmekte; köpeklerde meningit formu sporadik vakalar halinde gerçekleşmektedir. Atlarda ise en çok yenidoğanların septisemisine rastlanılmaktadır (Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011).

1.5.3. İnsanlarda Listeriozis

İnsanlarda meydana gelen Listeriozis *L. monocytogenes*'a bağlı olup, hayvanlardaki form ile iki ortak klinik sonucu bulunmaktadır; abort ve yenidoğan septisemisi. İkincisi genellikle yenidoğan meningitine sebep olmaktadır. İmmun sistemi baskılanmış hastalar, hamile kadınlar, bebekler ve yaşlılar bu hastalık için riskteki popülasyonu oluşturmaktadır (Low ve Donachie, 1997; Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006; Poulsen ve Czuprynski, 2013). İnfeksiyon genellikle bozulmuş gıdaların tüketilmesi sonucu oluşmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010). İnsanlarda en yaygın görülen listerial form meningit ya da meningoensefalittir. Hamile kadınların enfeksiyona yakalanması durumunda düşük, ölü ya da erken doğum ve yenidoğan bebeklerde septisemi olguları tespit edilmiştir. Hayvanlara benzer şekilde yenidoğan bebekler, listerial enfeksiyonlara karşı çok duyarlıdır. Yenidoğan bebeklerde listerial meningit, hidrosefali ile sonuçlanabilmektedir. Hidrosefali dışında enfeksiyöz endokardit, oküler hastalık, gastroenterit ve dermatitin de görüldüğü bildirilmiştir (Narayanan, 2013). Veteriner Hekimlerin ve çiftçilerin listerial abortlardan sonra oluşan yaralardan enfekte olma ihtimalleri bulunduğundan, enfeksiyonun zoonotik önemi de bulunmaktadır (Gray ve Killinger, 1966; Low ve Donachie, 1997; Paracıkoğlu, 2006; Zelenik ve ark., 2014).

1.6. Teşhis

1.6.1. Klinik Teşhis

Karakteristik sinirsel semptomlar ve abort; özellikle silajla beslenen hayvanlarda, Listeriozis tanısında oldukça önemli iki ipucudur. Listeriozis; enterotoksemi, beyin apseleri, bruselloz, vibrioz, ketoz, bradzot hastalığı, infeksiyöz koyun ensefalomiyeliti, akut gastroenterit, zehirlenme, kuduz, viral ensefalit, avitarninoz, coenurus cerebralis gibi hastalıklarla karışabilmektedir. Kesin teşhis laboratuvar muayeneleri ile konulmaktadır (Brugère-Picoux, 2008; Paracıkoğlu, 2006).

1.6.2. Nekropsi Bulguları

MSS infeksiyonlarında beyinde ara sıra mikroapseler ve kanama görülmekte, fakat çoğunlukla beyin dokusu normal olarak gözlenmektedir. %10 formalinle tespit edilen beyin dokusundan yapılan direkt mikroskopi muhtemel sonucu verebilmektedir. Beyinde makroskopik lezyonlar baskın olarak tek taraflı olan ve daima medulla oblongata ve ponsta daha ciddi seyreden patognomonik histolojik lezyonlar bulunmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010; Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011). Abort vakalarında, patolojik lezyonlar ayırıcı olmamaktadır. Plasental lezyonlar kırmızı, kahverengi eksudat ile kaplanmış bir fokal veya diffuz interkotidenal plasentit ile birlikte kotidenal villusların uçlarını içeren noktasal, sarımsı nekrotik odaklardır. Fötüs genellikle otolitiktir; karaciğer ve dalakta bazen milier nekrotik odaklar görülür. Septisemik listerioziste en sık görülen lezyon karaciğer boyunca iğne ucu şeklinde grimsi beyaz nodüllerden oluşan fokal hepatik nekrozlardır. Lezyonlar dalakta da bulunur fakat diğer dokularda nadirdir. Yetişkin koyunlarda abomazal kıvrımları etkileyen yoğun kanamalı belirgin bir enterit, abomazal ve intestinal mukozanın ülserasyonu ve payer plaklarının apseleşmesi tanımlanmıştır (Paracıkoğlu, 2006).

1.6.3. Laboratuvar Muayeneleri

Abort olgularının incelenmesinde, doku ya da sıvı örnekleri ile birlikte mutlaka fötal abomasum içeriği veya mekonyum, fötal karaciğer, fötal dalak, kotiledonların örnekler arasında olması gerekmektedir. Sinir sistemi belirtileri sırasında omurilik sıvısı, medulla ile pons parçaları ve kan örneklerinin alınması gerekmektedir. Karaciğer, dalak ve kan rnekleri Listeriozisin septisemik olarak belirlenmesi için yardımcı olacaktır (Narayanan, 2013; Paracıkğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011).

1.6.4. Bakteriyoskopi

Kotiledonlardan veya karaciğer lezyonlarından hazırlanan preparatlarda Gram pozitif kokobasil bakteriler görülebilir (Paracıkğlu, 2006). Beyin dokuları ve prevasküler kesitlerde çok az sayıda bakteriye rastlanmıştır (Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011).

1.6.5. Kültür

L. monocytogenes; triptik soy brot (TSA), nutrient agar ve kanlı agar gibi yaygın bakteriyolojik besiyerlerinde üremeyen bir mikroorganizmadır. Direkt ekim, soğuk zenginleştirme, selektif zenginleştirme gibi yöntemler *L. monocytogenes* izolasyonunda kullanılan yöntemlerden bazılarısıdır. Klinik (kan ve omurilik sıvısı), gıda ve çevresel örnekler genellikle saf kültürde bulunurlar fakat kontaminasyon olduğu durumlarda *L. monocytogenes*'in üremesi zorlaşmaktadır. Bununla birlikte, kontaminant bakterilerin bulunma olasılığının yüksek olduğu materyallerde *Listeria* türlerinin selektif besiyerleri kullanarak izole edilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (Gasnov ve ark., 2005).

Soğuk zengileştirme metodu; alınan tüm örneklerin 4°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılıp, 3 ay boyunca her hafta ya da haftada iki kere tripton brot ile homojenize edildikten sonra besiyerlerine ekimlerin gerçekleştirildiği bir prosedürdür. Normalde, soğuk zenginleştirme metodunun 2 ya da 3 haftasında *Listeria*'nın saptanabileceği

bildirilmektedir. Bu metot, diğer organizmaların düşük derecelerde çoğalamadığı stratejisi üzerine kurulmuştur (Gray ve Killinger, 1966). Ancak selektif besiyerlerinin tercihi, bakterilerin bu besiyerlerindeki üreme hızı ve besiyerlerinin ulaşılabilirliğinin kolay olması sebebiyle daha avantajlıdır (Hayes ve ark., 1991).

Selektif ajanların (kimyasallar, antimikrobik maddeler ve boyalar) kullanım amacı bakteriyel florayı inhibe ederek *Listeria*'nın baskın olmasını sağlamaktır. *Listeria* için potasyum tellürit selektif ve ayırıcıdır, tellüritlerin *Listeria* türleri tarafından kullanılmasıyla tellüriyum oluşmakta ve *Listeria* kolonileri siyah renkte gözükmeye başlamaktadır. Diğer Gram pozitifler siyah-sarı ile gri koloni renkleri halinde gözükmektedirler (Gray ve Killinger, 1966). *Listeria* %0,04 potasyum tellürite dayanıklılık göstermektedir (Narayanan, 2013). McBride *Listeria* agarda (MLA) bulunan lityum klorür/feniletanol de *Listeria* için selektiftir ve Gram negatif bakterilerin varlığı ile üreme göstermektedir. (Farber ve Peterkin, 1991; Snyder ve Ronald, 2006). Nalidiksik asit selektif ajanların en önemlisidir ve genellikle kendi başına hareket eden bu ajan, izolasyonda diğer ajanlarla etkileşime girmekte ve Gram negatif bakterileri inhibe etmektedir (Farber ve Peterkin, 1991; Gasanov ve ark., 2005). Akriflavin/tripaflavin Gram pozitif kokların üremesini engelleyen toksik bir boyadır. Bu iki ajan, gıda ve çevreden alınan örnekler ile Trypaflavin Nalidixic Acid Serum Agar (TNSA) içerisinde *Listeria*'nın izole edildiği tüm standart metodlarla kullanılmaktadır (Gasanov ve ark., 2005; Jantzen ve ark., 2006; Snyder ve Ronald, 2006). Polimiksin B, Gram negatiflerin ve *Streptococcus*'ların üremesini engellemektedir. Moksalaktam, *Staphylococcus*, *Proteus*, and *Pseudomonas* dahil çoğu Gram pozitif ve negatif kontaminant bakterilerin üremesini engelleyen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Seftazidim, *Listeria* 'nın seçici besiyeri ile izole edildiği zamanlarda kullanılan geniş spektrumlu sefalosporin grubu bir antibiyotiktir (Farber ve Peterkin, 1991). *Listeria* aynı zamanda besiyerinde %0,025 oranında talyum asetata, %3,75 oranında potasyum tiosiyanata, %10 oranında NaCl'ye ve %40 oranında safraya direnç göstermektedir (Hayes ve ark., 1991; Narayanan, 2013).

Bazen örnekler az sayıda *Listeria* kolonisi ve bu türlerin hızlı gelişmesini engelleyen çok sayıda temel mikroflorayı içlerinde barındırmaktadırlar. Bu, ön zenginleştirme ile selektif zenginleştirme yöntemleri *Listeria* türlerinin çoğalmasını

sağlayan ve diğer mikroorganizmaların büyümelerini engelleyen bir stratejidir. Bunlar zengin ve/veya seçici ajanlardan meydana gelmektedir. En çok kullanılanlar ise University of Vermont *Listeria* Enrichment Broth (UVM), Fraser brot ve FDA (US Food and Drug Administration) zenginleştirme brottur (Gasnov ve ark., 2005; Jantzen ve ark., 2006). Selektif besiyerleri seçici ajanlara bağlı olarak geliştirilmektedir. Örneğin; *Listeria* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için Oxford agar, Modified Oxford Agar (MOX), McBride *Listeria* agar (MLA), Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam Plating Agar (LPM), Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Esculin Mannitol (PALCAM) agar kullanılmaktadır (Gasnov ve ark., 2005; Jantzen ve ark., 2006).

Septisemi ve abortlarda alınan örneklerden herhangi bir zenginleştirme sürecine ihtiyaç duyulmadan direkt olarak besiyerlerine ekim yapılmak suretiyle etkenler izole edilebilmektedir (Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999).

Listeria türlerini tanımlamak ve birbirinden ayırt edebilmek için Gram boyamalarının, hemolitik aktivitelerinin, katalaz testinin, *S. aureus* ve *R. equi* ile birlikte CAMP testinin, 25°C’de hareketliliğinin, riboz, ramnoz, mannitol, ksiloz’den asit jenerasyonlarının Çizelge 1.3’te gösterildiği gibi test edilmesi gerekmektedir (Narayanan, 2013; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011). Negatif sonuç alınan kültürler önceden uygulanan antibiyotik tedavisinden kaynaklanabilmektedir (Brugère-Picoux, 2008). Günümüzde API *Listeria* (10- biyolojik test metni) gibi 24 saat içerisinde hangi *Listeria* türü olduğunu tanımlayan hızlı testler ortaya çıkmıştır (Bille ve ark., 1992). *Listeria* türleri, eğik ışıktaki triptik soya agarda (TSA) tipik olarak mavi-yeşil gözükmektedir (Gray ve Killinger, 1966; Henry, 1933; Lachica, 1990).

1.6.6. Hayvan Deneyi

L. monocytogenes kültürü tavşanların ve kobay, fare gibi daha birçok laboratuvar hayvanının konjunktiva kesesine enjekte edildiğinde 24-36 saat içinde bir keratokonjunktivit tablosu gelişmektedir. Uygulanan bu testin ismi Anton testidir. İltihaplı reaksiyon kendini genellikle uygulamadan yaklaşık 3 gün sonra

göstermektedir. Birkaç gün sonra eksudat miktarı azalıp geride belirgin bir şekilde iltihaplanmış konjunktiva ve opak kornea kalmaktadır. İltihaplanma ve opaklık birkaç gün boyunca devam etmekte ve tam iyileşme genellikle 1 ay sonra görülmektedir (Gray ve Killinger, 1966; Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 1999). Fare üzerinde 24 saat boyunca *L. monocytogenes* veya *L. ivanovii*'nin karışım kültürünün uygulandığı periton içi (i.p.) uygulama sonrasında 5 gün içerisinde karaciğerde meydana gelen nekrotik lezyonlar sonucunda ölmektedirler (Quinn ve ark., 1999).

Civciv embriyosunun uygulaması da de *Listeria*'nın patojenite testlerinden biridir. Korioallantoik membranının kan damarlı yüzeyine embriyolu tavuk yumurtasının Brain heart infusion brot (BHI) kültürü 0,1 ml ile inoküle edilir. Kontroller dahilinde inoküle edilen yumurtalar (inoküle edilmemiş BHI ya da fiziolojik tuzlu su) eritilmiş parafin ile kapatılır, ardından 37°C sıcaklıkta 7 gün boyunca kuluçkaya yatırılır ve günde iki kez embriyonun ovoskopide canlılığını yitirmesi gözlemlenir. Bir gün (24 saat) geçtikten sonra embriyo ölümü gözlenirse etken patojen kabul edilmektedir (Rawool ve ark., 2007).

1.6.7. Serolojik Testler

Serolojik testler antijen-antikor reaksiyonlarına dayanan hassas ve hızlı bağışıklık testlerini içermektedir (Gasnov ve ark., 2005). Immuno-capture, mikroflora ve inhibitör gıda bileşenlerini *Listeria*'dan ayırmak için özel antikorlar ile kaplanmış manyetik boncuk veya daldırma çubuklarının kullanıldığı bir tekniktir. Bunun gibi özel teşhis metodları hedeflenen organizmaya odaklanmakta ve diğer bakterileri inhibe etmektedir (Gasnov ve ark., 2005). Monoklonal ve poliklonal antikor testleri *L. monocytogenes*'in virülens faktörlerine ilişkin testler değildir (Bhunja, 1997). Bunun sebebi ise virülens faktörlerinin sıcaklık derecesi, pH değeri gibi çevresel faktörlere duyarlı olmasıdır. (Cabanés ve ark., 2002; Leimeisterwachter ve ark., 1992; Sheehan ve ark., 1995).

1.6.8. Moleküler Testler

Moleküler teknikler (PCR ya da DNA hibridizasyonu) doğru, duyarlı ve spesifiktir. Bunlar nükleik asit (DNA ya da RNA) amplifikasyonuna bağlıdır. PCR teknikleri standart nükleik asit problemleri ya da immunolojik yöntemler ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek sensitivite göstermektedirler.

1.6.8.1. DNA Hibridizasyonu

DNA hibridizasyonu, gıdalarda *L. monocytogenes* deteksiyonu için kullanılan en basit moleküler metottur. Test, belirli (etiketli floresan veya radyoaktif olarak) oligonükleotitler ile komplementer hedef zincirinin hibridizasyonuna dayanmaktadır (Cocolin ve ark., 1997). DNA hibridizasyon yöntemi, virülens faktör genlerini kullanarak *L. monocytogenes* ile diğer *Listeria* türlerini birbirinden ayırmayı amaçlamaktadır (Gasnov ve ark., 2005). Saf kültür, gıda ve çevre örneklerinin test edildiği çok sayıda farklı kolay erişilebilir kitler oluşturulmuştur. The GeneTrak ve GeneQuench *L. monocytogenes* Test Kitleri (Neojen), in situ hedeflerin RNA olduğu floresan odaklı oligonükleotidin hibridizasyonudur. AccuProbe (Gen-Probe), belirlenmiş DNA'ların, mRNA virülens faktöründe hibridizasyonun yapıldığı bir testtir, ve sonunda sadece canlı hücreler tespit edilir. Belirlenen hibritler luminometre ile ölçülmektedir (Gasnov ve ark., 2005; Jantzen ve ark., 2006).

1.6.8.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR, *L. monocytogenes* ile klinik, çevresel ve gıda kaynaklı *Listeria* türlerini birbirinden ayıran ve tespit eden en hızlı metod olarak tanımlanmıştır (Gasnov ve ark., 2005). PCR, bir örnekte mevcut olan belirli bir DNA dizisinin artan amplifikasyonuna bağlıdır. Tamponlu PCR reaksiyonunun temel bileşenleri; iki oligonükleotid primerleri dNTP, enzim kofaktörleri, DNA şablonu ve ısıya dayanıklı DNA polimerazı (Taq)'dır. PCR reaksiyonları 3 derece odaklı aşama olarak tanımlanmıştır: (1) tek şeritler halinde DNA denatürasyonu şablonu; (2) DNA şablonunda tamamlayıcı bölge primerlerinin hibridizasyonu, bağlanması ve (3) primernlerin siteden tespit edildiği (polimerizasyon sürecinin aralarında bölgeler arası olduğu) DNA sentez ya da uzantısıdır. DNA fragmentleri her döngüde

sentezlediklerini sonraki aşamalarda şablon olarak kullanılmaktadır. Her 3 aşamalı döngü her şablonu ikiye katlar. DNA hedefinin tek kopyası sadece 30-40 döngüde 106 kopya ile güçlenip 1-3 saat arasında tamamlanmaktadır (Norton, 2002). PCR primerleri hedef genlerine (*hly*, *iap*, *inA*, *inB*, *ActA*, *mpl*, *fbp*, *dth*, *plcA*, *plcB*, *prfA*, *sigA* and *sigB*), virülens genleri ya da belirli ribozomal RNA dizilerine göre oluşmaktadır (Gasnov ve ark., 2005; Norton, 2002). PCR ile yapılan tespit ya hemen örneklerden alınan DNA arıtmalarına göre ya da seçilen örneklerin 24-48 saat zenginleştirmenin ardından yapılmaktadır. *Listeria* genleri ve türlerini hedefleyen çeşitli PCR metodları mevcuttur. Çoklu primer aşamalarının kullanıldığı çoklu PCR, aynı örnekte birden çok patojen araştırılmasını sağlamaktadır; örneğin *Listeria* ve *Salmonella* ya da *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri gibi (Gasnov ve ark., 2005). Geleneksel PCR metodunun kullanılması değer ve örneğin seviyesini sınırlayabilmektedir. Çoklu PCR bu sınırlamaların ortadan kalkması ve teşhisi yükseltmek adına en iyi çözümlerden birisidir (Elnifro ve ark., 2000). Bu teknik zaman ve iş yükü açısından da avantajlıdır. PCR metodunun uyarlandığı ve yine çoklu primer aşamalarının kullanıldığı metod iç içe geçmiş bir PCR'dır (Gasnov ve ark., 2005).

1.6.8.3. Gerçek zamanlı PCR (RTi-PCR)

Gerçek zamanda PCR'ın güçlendirilmiş DNA'sı bir araya eklenen boyanın veya bir floresan hibridizasyon probu bağlanması ile ilgili floresanın bağlanmasıyla görüntülenmektedir. Floresanın yükselmesi, DNA ve RNA'nın hedef zincirlerinin büyüklüğüne göre dizilerin doğru yansıtılmasıyla gerçek zamanda görüntülenebilmektedir. Sonuçlar, geleneksel PCR'a oranla bir saatten daha az bir sürede çıkabilmektedir (Jantzen ve ark., 2006; Norton, 2002).

Tespit, tanımlama ve *Listeria*'nın epidemiyolojik araştırmaları için geliştirilen moleküler metodlar RNA hedefli (RT-PCR, Gerçek zaman PCR ve NASBA) ile DNA dizisi (PCR odaklı dizi metodu ile oligonükleotid odaklı mikrodiziler) şeklinde belirtilmiştir (Gasnov ve ark., 2005).

1.7. Tiplendirme

L. monocytogenes tiplendirmesi fenotipik ve genotipik olarak ayrılabilir. Epidemiyolojik çalışmalar, salgınların ayırımı ve kökenini, epidemik suşların rezervuarlarının izlenmesi, belirlenmesini ve ayırt edilmesini sağlamaktadır.

1.7.1. Serotiplendirme

L. monocytogenes serotiplendirmesi, somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerinden 13 farklı serotip Çizelge 1.1'de listelendiği gibi tanımlanmıştır (Allerberger, 2003). *Listeria* türlerinin serotiplenmesi konusunda ise ticari kitler mevcuttur.

1.7.2. Fajla Tiplendirme

Fajla tiplendirme metodunda *Listeria*'nın konak ile belirli bakteriyofajın özel bir etkileşime girmesi sonucunda konakçıda hücre lizisine neden olmaktadır (McLauchlin ve ark., 1986). Tekrarlanabilir ve ayırt edici olan bu metodun en büyük dezavantajı *L. monocytogenes* suşlarının tümünün tiplendirilememesidir. Ayırt edicidir, fakat bunun tanısal uygulamaları sınırlıdır (Paracıkoğlu, 2006; Quinn ve ark., 2011).

1.7.3. Moleküler Tiplendirme

Genelde moleküler tiplendirme metodu fenotipik metotlara oranla daha duyarlı ve spesifiktir. DNA hibridizasyonuna dayalı olarak, PCR, restriksiyon enzim analizlerini ya da direkt DNA dizilimeyi barındırmaktadır. Restriksiyon kesimleri veya PCR sayesinde DNA fragment uzunlukları allelik varyasyonlar olarak ölçülebilir ve konformasyonel polimorfizm şeklinde tespit edilmektedir. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ve CE (Capillary Electrophoresis) gibi DNA fragment boyutlarına dayalı olarak geliştirilmiş elektroforetik teknikler daha doğru yorumlamayı sağlamaktadır. Ribotiplendirme, makrorestriksiyon kesimleri, PFGE ya da Random amplified polymorphic DNA (RAPD) gibi önemli moleküler metotlar, *L. monocytogenes* tiplendirilmesinde

kullanılmaktadır. Single strand conformation polymorphism (SSCP) ya da Multilocus sequence typing (MLTS) gibi diğer teknikler ise *L. monocytogenes*'in tiplendirilmesinde oldukça sık kullanılmaktadır (Gasnov ve ark., 2005).

1.7.3.1. Multilokus Enzim Elektrofrez (MEE)

Multilokus Enzim Elektrofrez (MEE), proteindeki aminoasitlerin çeşitliliğiyle oluşan farklı elektrostatik yüke dayalı elektroforetik hareket farklılığına dayalı bir metottur. Dolayısıyla bu varyasyonlar bu enzimleri kodlayan genlerin allelik varyasyonlarıyla ilişkilidir. Elektroforetik harekete bağlı olarak, izolatlar elektroforetik tipler şeklinde düzenlenebilmektedir (Selander ve ark., 1986).

1.7.3.2. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme, ribozomal genlerdeki veya proteinlerdeki varyasyonlara dayanmaktadır. Evrimsel filogenetik ilişkilerde için en kullanışlı gen, rRNA genidir. Çünkü tüm organizmaların genomunda ribozomal genler çoklu kopyalar halinde mevcuttur. Bir rRNA gen probu kullanılarak yapılan DNA hibridizasyonu ile kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimi kesimi sayesinde *Listeria* izolatları ribotiplendirilmektedir. Elde edilen fragmentler, *Listeria* ribotipleri ve yakın izolatların düzenlenmesinde kullanılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda ve rutin analizlerde ribotiplendirme yoğun olarak kullanılmaktadır (De Cesare ve ark., 2001; Gasnov ve ark., 2005; Sauders ve ark., 2003).

1.7.3.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

Bu teknik, DNA moleküllerinin belli dizilerini saptayan ve kesen restriksiyon enzimleri (endonükleaz) kullanımıyla ilişkilidir. Sonuç olarak, sayı ve büyüklük bakımından değişkenlik gösteren fragmentler elde edilmektedir. Jel elektrofrezinde bu fragmentlerin karşılaştırılmasıyla genetik yakınlık belirlenmektedir. Kromozomal bakteri DNA'sının makrorestriksiyon analizi ve PFGE kombinasyonu bu tekniğin performansı önemli derecede artırılmaktadır (Gasnov ve ark., 2005; Gerner-Smidt ve ark., 1996; Manzano ve ark., 1998).

1.7.3.4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Bu tür elektroforezlerde, DNA moleküllerin agaroz jel içeren elektrik alanda periyodik olarak yön ve/veya yoğunluk değiştirilmektedir. Büyük DNA molekülleri (12Mb'ye kadar) elektrik alan değişikliklerine cevaben agaroz matriksde (zikzaklar şeklinde) göç edebilme özelliğine sahiptir ve böylece direkt olarak görülebilmektedir (Gasanov ve ark., 2005; Maule, 2000). PFGE ile makrorestriksiyon kesime kombinasyonu en iyi tiplendirme metodudur. Çünkü kolay, zaman ve maliyetten tasarruflu, ayırıcı en iyi *L. monocytogenes* tiplendirmeyi sağlamaktadır (Norrung ve Gerner-Smidt, 1993).

1.7.3.5. PCR'a Dayalı Tiplendirme Metotları

RAPD veya genomik DNA parmakizi (fingerprinting) teknikleri, primer kullanımı ile çoğaltılmış DNA fragmentleri sayısı ve büyüklüğüne dayalı tekniklerdir. Çoğaltılmış fragmentlerin büyüklük sayısındaki küçük değişikliklerle analiz sonuçlanmaktadır. Basit ve hızlı bu test, çok sayıda *Listeria* türünün alt türlere kadar tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (Boerlin ve ark., 1995; Gasanov ve ark., 2005).

PCR-RFLP (PCR-Restriction fragment length polymorphism), PCR ürünlerinin bir restriksiyon enzimi ile kesimi ve hedef gen çoğalmasını kapsamaktadır. Kesilmiş fragmentler büyüklük ve sayıları bileşiminin genetik yakınlığına göre elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmaktadır (Gasanov ve ark., 2005).

SSCP analizi, PCR ürünlerinin tek zincir konformasyonundaki değişikliğe dayanan bir analizdir. Bu konformasyonel değişiklik elektroforez ile saptanmaktadır. SSCP-CE, yalnızca bir nükleotidlik değişimleri ayırabilmektedir (Gasanov ve ark., 2005).

1.7.3.6. DNA Dizilendirmesine Dayalı Tiplendirme Metotları

Organizmalar arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede en doğru metod direkt DNA dizisi belirlemeye dayalı metodlardır. DNA iplikçiklerinin çoğalması sırasında ddNTP'nin (dideoxynucleotides) yapıya girmesi ile DNA sentezinin kontrollü olarak kesilmesine 16S-RNA geni en sık kullanılan RNA genidir (Sallen ve ark., 1996). Bu metod oldukça pahalı ve zaman gerektiren bir metottur (Gasanov ve ark., 2005).

MEE'nin bir uzantısı olan MLST, virülens faktörleri kodlayan genlerin veya housekeeping genlerin internal fragmentlerin dizilerini karakterize eden bir metot olarak kullanılmaktadır (Cai ve ark., 2002). Yaklaşık 450bp büyüklünde fragmentler çoğaltılır (Spratt, 1999). Ayırt edici gücü ve doğruluğu yüksektir.

Listeria türlerinin tüm genom dizileri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) gibi tamamlanmış veri tabanlarından bulunabilmektedir (Anon).

1.8. Sağaltım

Listeria enfeksiyonu tedavileri için penisilin G ya da ampisilin ile aminoglikozid önerilmektedir (Davis ve Jackson, 2009). Bununla birlikte, trimetoprim olan direnç β -laktamaza karşı alerji durumlarında kotrimoksazol-laktamazların ikincil tedavi olması önemli bir sorun haline gelmiştir (Granier ve ark., 2011). Göz Listeriozisi, kombinasyonel olarak antibiyotik ve subkonjonktival olarak uygulanan kortikosteroidler ile tedavi edilmelidir (Quinn ve ark., 2011). Günümüzde insan Listeriozisi için en iyi tedavi yöntemi gentasimin ile birlikte kullanılan penisilindir. Sulfametoksazol-trimetoprim, eritromisin ve tetrasiklinlerin de insan Listeriozis tedavisinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Sefalosporinler hayvan ve insan Listeriozisi tedavisinde diğer antimikrobiyellerle birlikte kullanıldığında bile etkisiz olarak tanımlanmıştır (Czuprynski ve ark., 2010; Farber ve Peterkin, 1991). Ağır hastalıkların tedavisi nadiren başarı göstermiştir. Antibiyotikler ise uzun dönem kullanılmalıdır. Tedavi süreci bir aydan daha uzun sürebilmektedir (Brugère-Picoux, 2008).

1.9. Koruma

Listeriozisten korunmanın en iyi yolu silajı iyi yapılmış yemleri tercih etmektir. Silajı kötü yapılmış yemlerin gebe hayvanlara kesinlikle verilmemesi gerekmektedir. Oluşan herhangi bir listeral salgın karşısında silaj yemi verilmesi kesilmelidir. Yüksek yem bölmeleri gibi gıda ile göze teması ve bu yolla bulaşmayı en aza indirgeyen yem teknikleri kullanılmalıdır (Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011). Avrupa'nın bazı

kesimlerinde, zayıflatılmış suşlar ile aşılama (1/2a, 1/2b serotipleri, ve 4b) hastalıktan korunmada en etkili yöntem olarak rapor edilmiştir (Gudding ve ark., 1989; Vagsholm ve ark., 1991). *L. monocytogenes* etkenin hücreiçi patogenezi düşünüldüğünde hastalıktan korunmada hücrel bağışıklığın önemi ortaya çıkmaktadır (Czuprynski ve ark., 2010). İnaktif aşılar hücrel bağışıklığı uyaramadığı için koruyucu değildir. Bunun dışında etken antijenlerine karşı şekillenen antikorlar fagositozu arttırmasına rağmen infeksiyonu önlemek için yeterli olamamaktadırlar. Aşılama yönteminin en doğru yöntem olduğuna dair bir çalışma yoktur ve hastalığın sporadik doğası gereği tedavi kesin sonuç veremeyebilmektedir. Yavru attıktan sonra hayvanlar subklinik taşıyıcılar haline gelebilmekte ve sürüden çıkartılmaları gerekmektedir. Mastitis ile yapılan erken teşhis ve tedavi ise süttten geçen transmisyonu engellemek adına önemli bir yöntemdir (Narayanan, 2013; Quinn ve ark., 2011).

Bu tezde ruminantlarda aborta sebep olan patojen *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) türlerinin moleküler tanısında PCR tabanlı tanı tekniklerinin (PCR, multiplex-PCR) optimizasyonu amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.2. Gereç

2.2.1. Bakteri Suş ve DNA'ları

Bu tez çalışmasında kullanılan *Listeria* suşları Çizelge 2.1'te verilmiştir. *L. monocytogenes* suşlarından 4'ü Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1'i Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan sağlandı. *L. ivanovii* referans suşlarından 1'i yurt dışındaki ticari bir firmadan (Microbiologics, ABD) temin edilirken, 3'ü İspanya Kordoba Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü'nden, 1'i ise Bosna Hersek Saraybosna Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni Bölümü'nden sağlandı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen ve sahada yavru atan hayvanlara ait fotal doku örneklerinden ekstrakte edilen *Listeria* DNA'ları da çalışmaya dahil edildi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan *Listeria* suş, izolat ve DNA'ları.

No.	Tür	Suş/Örnek No	Kaynak
1	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115	Koleksiyon ^A
2	<i>L. monocytogenes</i>	S1	Koleksiyon ^B
3	<i>L. monocytogenes</i>	L8	Koleksiyon ^B
4	<i>L. monocytogenes</i>	4K7	Koleksiyon ^B
5	<i>L. monocytogenes</i>	L34	Koleksiyon ^B
6	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC 19117	Koleksiyon ^C
7	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC 19117	Koleksiyon ^E
8	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC 19117	Koleksiyon ^D
9	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	PAM 55	Koleksiyon ^D
10	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	CECT 5374	CECT ^D
11	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	11	Koyun abort DNA ^F
12	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	20	Koyun abort DNA ^F
13	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	62	Koyun abort DNA ^F
14	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	110	Koyun abort DNA ^F

^A Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu.
^B Kesimhane örnekleri *L. monocytogenes* izolatları.
^C Microbiologics, ABD.
^D İspanya Kordoba Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü
^E Saraybosna Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni Bölümü
^F Fötal doku örneklerinden ekstrakte edilen *Listeria* DNA'ları.

2.2.2. Biyolojik ve Klinik Örnekler

Tez çalışmasında kullanılan abort materyelleri (kotiledon, fötal mide içeriği, fötal karaciğer ve fötal dalak) ve süt örneği Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı rutin laboratuvarına gelen numunelerden alındı. Tüm materyeller *Listeria* yönünden konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle incelendi. *Listeria* yönünden negatif olduğu saptanan örnekler yapay kontaminasyon çalışmalarında doku örnekleri olarak kullanıldı.

2.2.3. Oligonükleotid Primerleri

Listeria türlerinin moleküler tanısında kullanılan primerler Çizelge 2.2'te gösterilmiştir (Sareyyüpoğlu ve ark., 2008).

Çizelge 2.2. Primer dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları (Sareyyüpoğlu ve ark., 2008).

No.	Primer adı	Hedef gen	Oligonukleotid dizisi	Ürün uzunluğu (bp)	Spesifik türü
P1	LivanF2	<i>smcL</i>	CCACCATCTTCCAAAGCAAATTG	148	<i>L. ivanovii</i>
P2	LivanR2		ACGAAGCCTTTGATACAAGTGC		
69	Listiv	<i>hly</i>	CACACAGCACCAGAGTGAAG	128	<i>L. ivanovii</i>
70	Listiv		GGCTGAACCACCATAAATCA		
71	Listiv2	<i>prfA</i>	TTCCCTTGATACAGGAAAACCA	119	<i>L. ivanovii</i>
72	Listiv2		GCGTGATATCTGAGCTAACCAA		
73	Lmono	<i>hly</i>	TAGTCTACCAATTGCGCAACAACT	151	<i>L. monocytogenes</i>
74	Lmono		ATACTTATCGATTTTCATCCGCGTGT		
75	Lmono2	<i>iap</i>	TAGTGCGCTGGTGTGATA	221	<i>L. monocytogenes</i>
76	Lmono2		CAGGTGCAGCTTGTTGAGTAG		
77	Lmono3	<i>inlB</i>	GATGGCGATTATGAAAAACC	175	<i>L. monocytogenes</i>
78	Lmono3		CCGTTCCATCAACATCATAACT		
79	Lmono4	<i>hly</i>	AGAAGGAGAGTGAAACCCATGAA	167	<i>L. monocytogenes</i>
80	Lmono4		TTAGGACTTGCAGGCGGAGA		
81	Listgen	16SrRNA	GCCTGTAAGTTGGGGATAA	300	<i>Listeria</i> spp.
82	Listgen		CCGAAAACCTTCTTCATACA		
83	Listgen2	16SrRNA	ACGAAGCCTTTGATACAAGTGC	132	<i>Listeria</i> spp.
84	Listgen2		CGTGCGCCCTTTCTAACT		

smcL: spingomyelinase C geni; *hly*: hemolysin O geni; *prfA*: peptide chain release factor 1 geni; *iap*: invasion associated secreted endopeptidase geni; *inlB*: internalin B geni; 16SrRNA: 16S ribozomal RNA geni

2.2.4. PCR’da Kullanılan Maddeler

PCR’da Etanol (%95’lik) (Merck), Tris Borik asit EDTA (TBE) (AppliChem), 10xPCR Buffer (Fermentas), 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 10 mM dNTP karışımı (Fermentas), Taq DNA polimeraz (Fermentas), Primerler (Operon), DNA marker (100 bp) (Fermentas), Agarose (Prona), Ethidium Bromide (Fermantas), 6xLoading Dye (Fermentas) kullanıldı.

2.2.5. PCR’da Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Bu çalışmada, hassas terazi (Scaltec sbc41), santrifüj (Hettich), steril kabin (laminar flow) (Bioair Instruments, Aura 2000, Mac), vorteks (Fine Vortex), DNA Thermal Cyclers (Biometra), Jel elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Wealtec elite 3000 plus), Primerler (Operon), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Gene Genius, Syngene, Bio Imaging System), Termal printer (Sony) kullanıldı.

2.3. Yöntem

2.3.1. *Listeria* suşlarının üretilmesi ve doğrulanması

Abort materyallerinden *Listeria* izolasyonu için kanlı agar ile *Listeria* selektif agar (Brilliant *Listeria* Agar) kullanılırken, *Listeria* suşlarının aktivasyonunda ise kanlı agara ekim yapılarak 37°C’de 24-48 saat aerobik koşullarda inkübasyon gerçekleştirildi. Üreyen kolonilerden *Listeria* identifikasyonu ve konfirmasyonu için Gram boyama, 25°C’de hareket muayenesi, katalaz ve oksidaz, CAMP testleri yapıldı. Ramnoz, ksiloz ve ribozdan asit oluşumu izlendi (Paracıkoğlu, 2006). İdentifiye edilen suşlar %20 gliserinli nutrient brot içeren kriyotüplerde -20°C’de saklandı (Rodriguez-Lazaro, 2010).

2.3.2. Primerlerin Belirlenmesi

Çalışmada multiplex-PCR tekniğinin geliştirilmesi amacıyla *Listerialarda* virulens genlerine (*hlyA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *actA*, *iap*) yönelik tasarlanmış primerler değerlendirildi.

Tez çalışması kapsamında kullanılan primerler (Çizelge 2.2) iki şekilde kontrol edildi: Bilgisayar ortamında gerçekleştirilen *in-silico* analiz ve laboratuvar ortamında gerçekleştirilen *in-vitro* PCR testleri ile. *In-silico* analizde, primer çiftleri BLAST-N (nükleotit - basic local alignment search tool) tarama motorunda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) incelenerek spesifiteleri belirlendi. Primerler,

Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, pozitif ve negatif kontrol bakteri suşlarına ait DNA'ların kullanıldığı PCR testleri ile kontrol edildi.

Multiplex-PCR (duplex-PCR) analizinin geliştirilmesi için en sensitif *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* primerleri seçildi. Seçim yapılırken hedef genlerden çoğaltılan PCR ürünleri arasındaki uzunluk aralığının minimum 50 bp olmasına dikkat edildi.

2.3.3. Bakteri Suşlarından ve Doku Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için spin kolon teknolojisine dayalı ticari bir kit (Thermo Scientific GeneJet PCR Purifikasyon Kiti) kullanıldı. Bu amaçla, 24 saat 37°C'de inkübe edilen kanlı agardan bir koloni steril öze ile alınarak içerisinde 180 µl nükleaz enziminden arı su olan ependorfta süspanse edilerek vortekslendi. Daha sonra süspanسیون 10 dk 5000 x g'de santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Kalan pelet 180 µl Gram-pozitif bakteriler için lizis tamponu (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, %1,2 Triton X-100, lizozim 20 mg/ml) ile süspanse edildi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Sonra 200 µl lizis solüsyonu ve 20 µl proteinaz K solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Lizis için 56°C'de 30 dk inkübe edildi. 20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve vortekslenerek 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 400 µl %50'lik etanol eklendi ve tekrar vortekslendi. Hazırlanan lizat, koleksiyon tüpü takılmış olan spin kolon tüpe aktarıldı. 6000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpü takıldı. 500 µl etanol eklenmiş yıkama tamponu I (wash buffer 1) solüsyonu eklendi. 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü takıldı. 500 µl etanol eklenmiş yıkama tamponu II (wash buffer II) solüsyonu eklendi. 12000 x g'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda koleksiyon tüpü atılarak, spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi, 200 µl elüsyon tamponu eklendi ve 2 dk oda ısısında inkübasyon takiben 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon atılarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde 200 µl'lik DNA elde edildi. Ekstraksiyonu yapılan DNA örnekleri NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) ile ölçüldü ve amplifikasyon işlemi yapılana kadar -20°C'de template DNA olarak kullanılmak üzere saklandı.

Dokudan DNA ekstraksiyonunda da spin kolon teknolojisi kullanan aynı purifikasyon kiti kullanıldı. 25 mg doku örneği çift bistüri kullanılarak küçük parçalara ayrıldı ve 2 ml mikrosantriftüj tüpüne alındı. İçlerine steril metal boncuk atılarak 30 000 rpm'de 15 dk TissueLyser II (Qiagen) ile homojenize edildi. Homojenize edilen dokulara 180 µl parçalama solüsyonu (digestion buffer) eklendi. Üzerine 20 µl proteinaz K solüsyonu eklendi ve vorteksledi. Lizis tamamlanana kadar örnekler 56°C'de inkübe edildi. İnkübasyon periyodu boyunca (yaklaşık 4 saat, dalak için 5 saat) ependorflar vorteksledi. 20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve vorteksledikten sonra 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra 200 µl lizis solüsyonu eklendi ve tekrar vorteksledi. Sonraki işlemler Gram pozitif bakterilerden DNA ekstraksiyonu prosedürü ile aynıdır.

2.3.4. Singleplex-PCR ve Multiplex-PCR Optimizasyonu

Tez kapsamında singleplex-PCR ve multiplex-PCR tekniklerinin optimizasyonları amacıyla reaksiyona giren primerlerin bağlanma sıcaklıkları (T_a), final $MgCl_2$ yoğunlukları, 10xPCR buffer yoğunlukları, PCR etkinliğini artıran maddelere (PCR enhanserlar) ihtiyaç olup olmadığı, gibi parametreler dikkate alındı.

Multiplex-PCR tekniklerinin geliştirilmesi ve optimizasyonunda bu konuda daha önceden yapılan çalışmalar dikkate alındı (Markoulatos ve ark., 2002; Probert ve ark., 2004; Saunders ve ark., 2007). Multiplex-PCR tekniğinde aynı anda reaksiyona girecek olan primer çiftlerinin birbirleriyle komplementer nukleotid dizileri içermemesine, oluşturdukları PCR ürün büyüklüklerinin aynı olmamasına, primerlerin erime sıcaklık (T_m) değerlerinin birbirine yakın olmasına dikkat edildi. Multiplex-PCR tekniğinde kullanılacak primerler, PCR ürün büyüklükleri arasında en az 50 bp olacak şekilde seçildi.

2.3.5. Elektroforez ve Örneklerin Görüntülenmesi

Amplifiye edilen her bir örnekten 10 µl alınıp, 2 µl 6xLoading Dye solüsyonu ile karıştırılarak; ethidium bromide ile boyanmış %1,5'lük 50 ve 200 ml'lik agaroz jelde yüklendi. Jeldeki birinci göze 5 µl DNA Marker (Gene Ruler 100bp DNA Ladder plus) konularak 90 ve 180 V'ta 45 ve 60 dk elektroforeze edildi (Soni ve Dubey, 2014). Elektroforez sonrası agaroz jeller UV transilluminatörde incelenerek Gene Genius Bio Imaging System (Syngene Synoptics, UK)'da jel fotoğrafları çekildi ve görüntüler kaydedildi.

2.3.6. Doku Örneklerinin Yapay Kontaminasyonu

Aborte fötlürlara ait doku örneklerinin yapay kontaminasyonu *L. monocytogenes* (ATCC 19115) ve *L. ivanovii* (ATCC 19117) standart suşları ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, her iki suşun bir gecelik kültüründen inokulum densitesi 0,5 McFarland standardına (1×10^8 CFU/ml) göre steril PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2,7 mM KCl, pH 7,4) karşılık gelecek bakteri süspansiyonları hazırlandı. Daha sonra bu süspansiyonlardan ayrı ayrı 10 katlı bakteri sulandırılmaları (1×10^8 CFU/ml'den 0,1 CFU/ml'ye le kadar) yapıldı (Arda, 1997).

Yapay kontaminasyon için doku örnekleri (aborte fötustan alınan kotiledon, fötal mide içeriği, fötal karaciğer ve fötal dalak) 1/10 oranında steril PBS içerisinde homojenize edilerek eşit hacimde (22,5 µl) hazırlandı ve mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi. Yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlanan 10 katlı bakteri dilusyonlarından 2,5 µl alınarak doku örneklerine eklendi. Daha sonra doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi (Sareyyüpoğlu ve ark., 2008).

2.3.7. Multiplex-PCR Tekniğinin Validasyonu

Bu çalışmada multiplex-PCR spesifitesi standart *Listeria* suşları ve diğer izolatlar ile test edildi. Geliştirilen multiplex-PCR tekniğinin sensitivitesine yönelik validasyonu için ise standart *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* suşlarının 10 katlı dilusyonları ve bu

dilasyonlar ile yapay kontaminasyonu gerçekleştirilen kotiledon, f3tal mide içeriği, karaciğer ve dalak 3rnekleri ile gerçekleştirildi. Tekniğin etkinliğinin ortaya konması amacıyla yavru atan hayvanlara ait saha 3rneklerinden ekstrakte edilen DNA 3rnekleri de kullanıldı.

Standart bakteri suşlarının bir gecelik k3lt3r3nden ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonları UV-spektrofotometre (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) ile 3l3ld3 ve bu stok DNA sol3syonlarının 10 katlı sulandırılmaları yapıldı.

3. BULGULAR

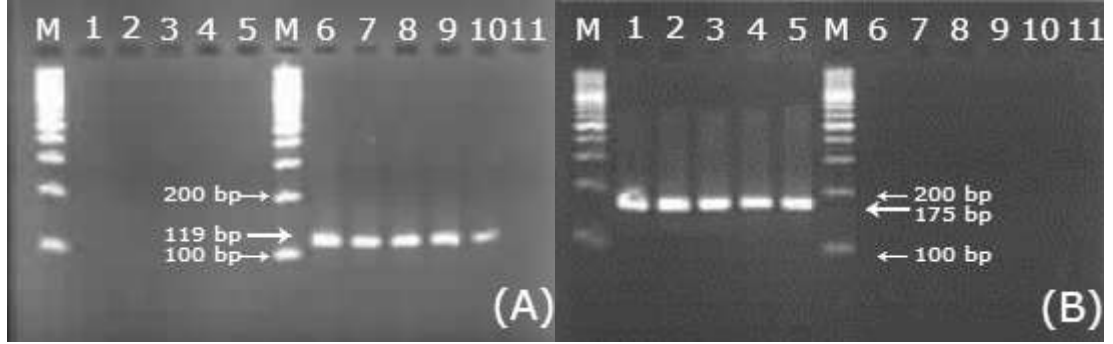
3.1. *Listeria* suşlarının üretilmesi ve doğrulanması

Bütün suşların kanlı agara yapılan ekimlerinden 24 saat sonra, beta hemolitik özellikte, S karakterli, küçük koloniler üremiştir. Aynı şekilde Brilliant *Listeria* Agar’da da mavi renkli tipik koloniler görülmüştür. Üreyen kolonilerden yapılan mikroskopik preparatlarda Gram pozitif ince çomaklar görülmüştür ve diğer testler için nutriyent brota ekim yapılmıştır. 25°C’de hareketli, 37°C’de hareketsiz olan bütün suşların katalaz pozitif ve oksidaz negatif olduğu tespit edilmiştir. Ramnoz pozitif ve *Staphylococcus aureus*’la CAMP pozitif sonuç veren koloniler *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Ksiloz ve riboz pozitif ve *R. equi* ile kürek şeklinde hemoliz yapan koloniler (CAMP pozitif) *L. ivanovii* olarak tanımlanmıştır.

3.2. Primerlerin Belirlenmesi

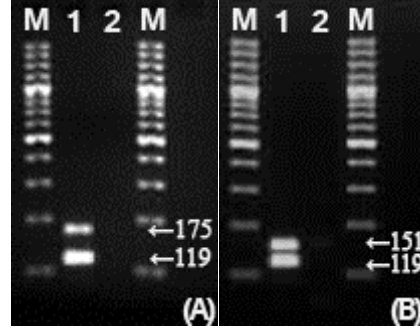
Tezin gereç kısmında Çizelge 2.2’de gösterilen primerlerin BLAST-N tarama motoru kullanılarak yapılan *in-silico* analizleri sonucunda primerlerin tamamının çizelgede gösterilen hedef etkenlerin ilgili genlerine spesifik olduğu belirlendi. Bununla birlikte, laboratuvarında standart suşlar ve saha izolatlarına ilişkin DNA’larla gerçekleştirilen *in-vitro* PCR test sonuçlarına göre çizelgedeki primer çiftlerinden *L. monocytogenes*’in *iap* geninin 221 bp’lik fragmentine spesifik olduğu düşünülen 75 ve 76 numaralı Lmono2F ve Lmono2R kodlu primer çifti ile aynı bakterinin *prfA* geninin 167 bp’lik fragmentine spesifik olduğu düşünülen 79 ve 80 numaralı Lmono4F ve Lmono4R kodlu primer çiftinin aynı zamanda *L. ivanovii* suşlarında da aynı büyüklükte (non-spesifik) ürün amplifikasyonuna neden olduğu gözlemlendi. Bu nedenle bu primer çiftleri çalışmadan çıkarılarak çalışmaya diğer primer çiftleriyle devam edildi.

Çalışmada kullanılan diğer primer çiftlerinin tamamının kontrol suşlarıyla gerçekleştirilen PCR testleri sonucunda çizelgede gösterilen hedef *Listeria* türünün ilgili hedef genlerini spesifik olarak çoğalttığı ortaya kondu (Çizelge 2.2, Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Agar jel elektroforezinde Listiv2 (A) ve Lmono3 (B) primerlerinin tekli PCR ile spesifite testi. Sütunler şekil A ve B’de: 1-5, *L. monocytogenes*; 6-9, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*; 10, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*; ve 11, negatif kontrol. Sütun negatif kontrol. M sütununda moleküler ağırlık marker bulunmaktadır.

Multiplex-PCR tekniği geliştirilmesinde kullanılacak primer çiftinin belirlenmesinde primerlerin çoğalttığı ürün büyüklükleri arasında en az 50 bp’lik bir fark olması kuralı dikkate alınarak, *L. ivanovii*’nin *prfA* geninin 119 bp’lik fragmentine spesifik 71 ve 72 numaralı Listiv2F ve Listiv2R kodlu primer çifti ile *L. monocytogenes*’in *inlB* (internalin B) geninin 175 bp’lik fragmentine spesifik 77 ve 78 numaralı Lmono3F ve Lmono3R kodlu primer çifti tercih edildi. Multiplex-PCR için alternatif olarak düşünülen diğer primer kombinasyonu olan *L. monocytogenes*’in *hlyA* (hemolizin A) geninin 151 bp’lik fragmentine spesifik 73 ve 74 numaralı LmonoF ve LmonoR kodlu primer çifti ile *L. ivanovii*’nin *prfA* geninin 119 bp’lik fragmentine spesifik 71 ve 72 numaralı Listiv2F ve Listiv2R kodlu primer çiftini içeren multiplex-PCR tekniği başarılı sonuç vermesine karşın hedef gen büyüklükleri arasındaki fark 50 bp’den düşük (32 bp) olması nedeniyle izleyen çalışmalarda kullanılmadı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* DNA karışımının iki farklı primer kombinasyonu [Lmono3 ve Listiv2 (A), Lmono ve Listiv2 (B)] ile multiplex-PCR sonrası jel elektroforezi görüntüsü. Sütun 1, sütun 2, negative kontroller. M sütununda moleküler ağırlık için marker bulunmaktadır.

3.3. Singleplex-PCR ve Multiplex-PCR Optimizasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında PCR (singleplex-PCR) karışımı; 14.1 μ l nükleaz ari su, 2.5 μ l 10x *Taq* buffer ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 μ l MgCl_2 (25 mM), 0.5 μ l dNTP (10 mM'lık stok), primer başına 1 μ l (10 μ M'lık final konsantrasyon), 0.2 μ l *Taq* DNA polimeraz enziminden hazırlanan 23 μ l'lik hacimden oluştu. Bu karışım üzerine 2 μ l örneğe ait template DNA eklenerek toplam 25 μ l'lik final hacim elde edildi.

Multiplex-PCR karışımı ise 21 μ l'lik final hacimde, her bir örnek için 10.1 μ l nükleaz ari suya, 4 μ l 10x *Taq* buffer ile ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 μ l MgCl_2 (25 mM), 0.5 μ l dNTP (10 mM'lık stok), primer başına 1 μ l (10 μ M'lık final konsantrasyon), primer başına 1 μ l (10 μ M'lık final konsantrasyon) olacak şekilde Listiv2F, Listiv2R ve Lmono3F, Lmono3R primerleri, 0.2 μ l *Taq* DNA polimeraz eklenerek hazırlandı. Bu karışım üzerine 4 μ l template DNA eklenerek her bir örnek başına toplam 25 μ l'lik final hacim elde edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan singleplex ve multiplex-PCR bileşenleri ve final hacimleri.

Karışım bileşenleri	Singleplex PCR hacimleri (µl)	Multiplex-PCR hacimleri (µl)
Nükleaz ari su	14.1	10.1
10 X PCR Tamponu	2.5	4
MgCl ₂ (25 mM)	3	2
dNTP (10 mM stok sol.)	0.5	0.5
Primer1 F (10 pmol)	1	1
Primer1 R (10 pmol)	1	1
Primer2 F (10 pmol)	-	1
Primer2 R (10 pmol)	-	1
Taq polimeraz enzimi	0.2	0.2
Ekstrakte edilen DNA örneği	2	4
Toplam karışım	25	25

PCR yöntemleri için amplifikasyon sıcaklık ve süreleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Singleplex ve multiplex-PCR protokolü.

	Singlplex PCR protokolü				Multiplex-PCR protokolü			
	Sıcaklık	Zaman		Siklus sayısı	Sıcaklık	Zaman		Siklus sayısı
Ön denatürasyon	94 °C	03:00			94 °C	04:00		
Amplifikasyon	94 °C	01:00	}	X 30	94 °C	00:30	}	X 32
	54 °C	01:00			54 °C	00:30		
	72 °C	01:00			65 °C	02:00		
	72 °C	07:00			65 °C	03:00		
Final ekstensiyon	72 °C	07:00			65 °C	03:00		

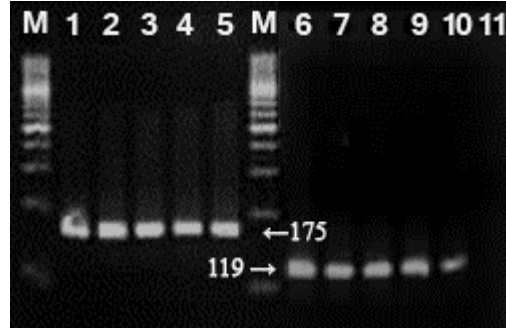
3.4. Multiplex-PCR Tekniğinin Validasyonu

Multiplex-PCR tekniğinin spesifitesinin belirlenmesi amacıyla *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* suşları ile yapılan testler sonucunda geliştirilen tekniğin sadece ilgili bakterileri çoğalttığı belirlendi (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.3). Bu verilere göre multiplex-PCR tekniğinin *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* için spesifik olduğu görüldü.

Çizelge 3.3. Multiplex-PCR’da kullanılan Lmono3 ve Listiv2 primerlerinin spesifitesi.

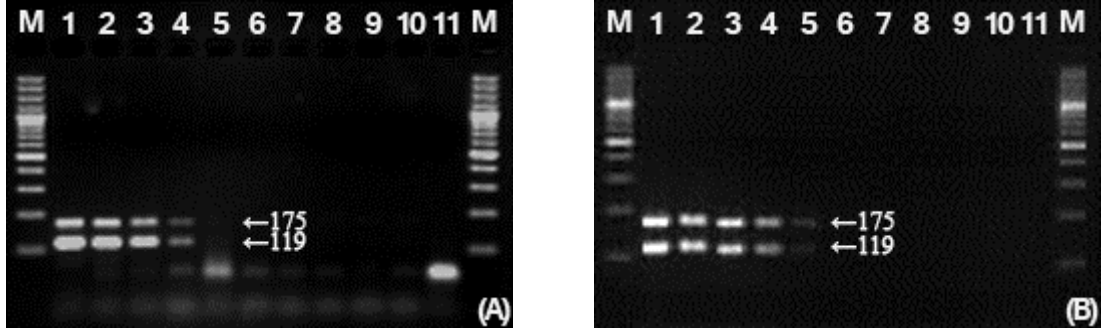
Tür	Suşlar	PCR sonuçları	
		Lmono3 (<i>inlB</i>)	Listiv2 (<i>prfA</i>)
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	S1*	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	L8*	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	4K7*	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	L34*	+	-
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC 19117	-	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC 19117	-	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	ATCC 19117	-	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	PAM 55	-	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	CECT 5374	-	+

*Kesimhaneden alınan *L. monocytogenes* suşları



Şekil 3.3. Multiplex-PCR’da Lmono3 ve Listiv2 primer spesifitesini gösteren jel elektroforezi görüntüsü. Sütunler: 1-5 arasında *L. monocytogenes*, 6-9 arasında *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, 10 Sütun *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* ve 11 Sütun negatif kontrol. M sütununda moleküler ağırlık marker bulunmaktadır.

L. monocytogenes and *L. ivanovii*’nin belirlenmesinde geliştirilen multiplex-PCR metodunun sensitivitesinin ortaya konması için hem ilgili bakteri karışımlarının ve hem de bu bakterilere ait genomik DNA karışımlarının 10 katlı dilüsyonları yapıldı ve multiplex-PCR ile test edildi. Şekil 3.4’te dilüsyonlardaki hücre sayısı/genomik DNA yoğunluğu ile elde edilen multiplex-PCR ürününün yoğunluğu arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu görülmektedir.

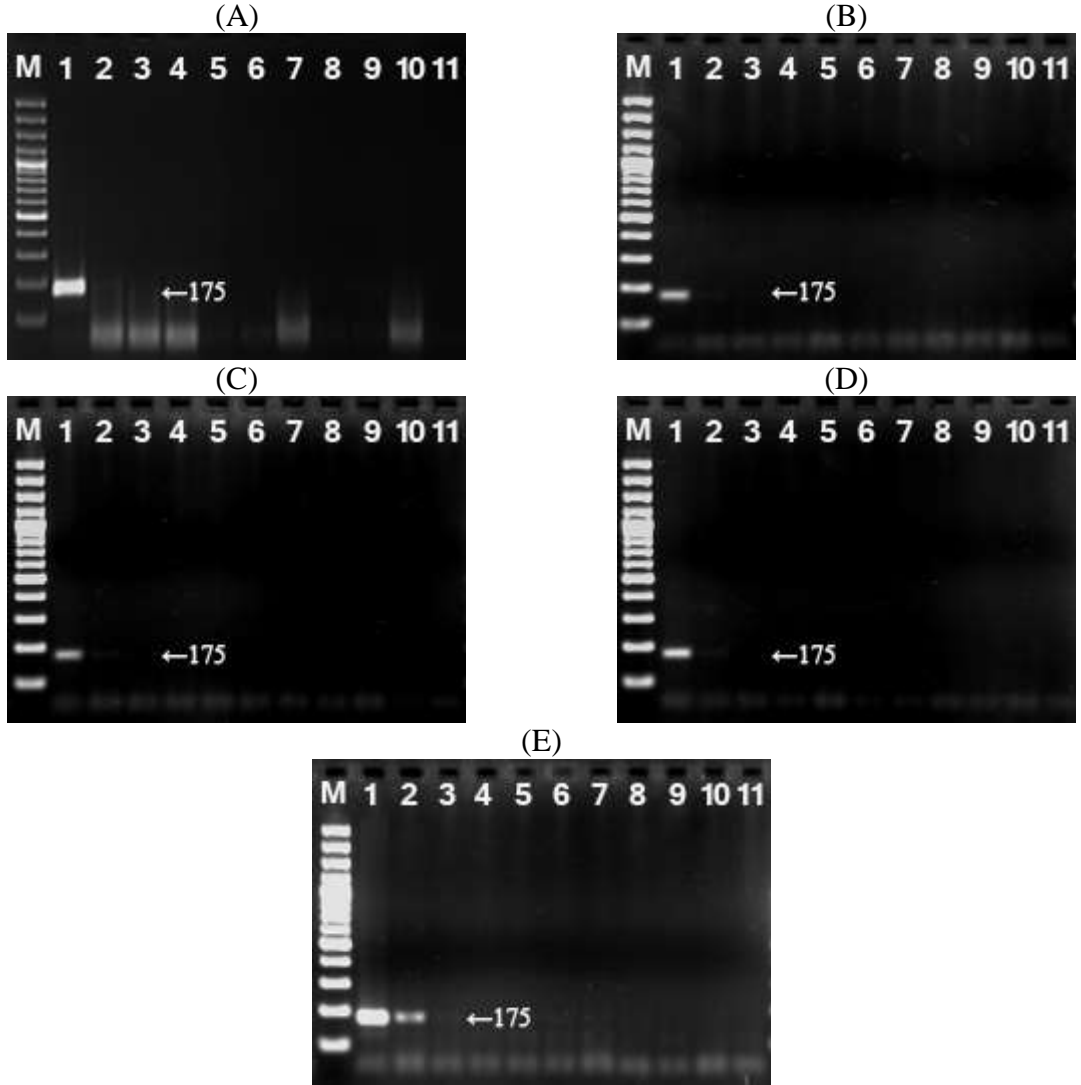


Şekil 3.4. Multiplex-PCR spesifitesinin belirlenmesi için *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* karışımının 10 katlı seri dilüsyonlarının jel elektroforezi görüntüsü. (A) 10 katlı DNA dilüsyonu: Sütun 1, 10 ng DNA; sütun 2, 1 ng DNA; sütun 3, 100 pg DNA; sütun 4, 10 pg DNA; sütun 5, 1 pg DNA; sütun 6, 100 fg DNA; sütun 7, 10 fg DNA; sütun 8, 1 fg DNA; sütun 9, 100 ag DNA; sütun 10, 10 ag DNA; sütun 11, negatif kontrol. (B) 10 katlı bakteriyel dilüsyonu: sütun 1, $1,5 \times 10^8$ CFU/ml; sütun 2, $1,5 \times 10^7$ CFU/ml; sütun 3, $1,5 \times 10^6$ CFU/ml; sütun 4, $1,5 \times 10^5$ CFU/ml; sütun 5, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml; sütun 6, 1500 CFU/ml; sütun 7, 150 CFU/ml; sütun 8, 15 CFU/ml; sütun 9, 1,5 CFU/ml; sütun 10, 0,15 CFU/ml; sütun 11, negatif kontrol. M sütununda moleküler ağırlık için marker bulunmaktadır.

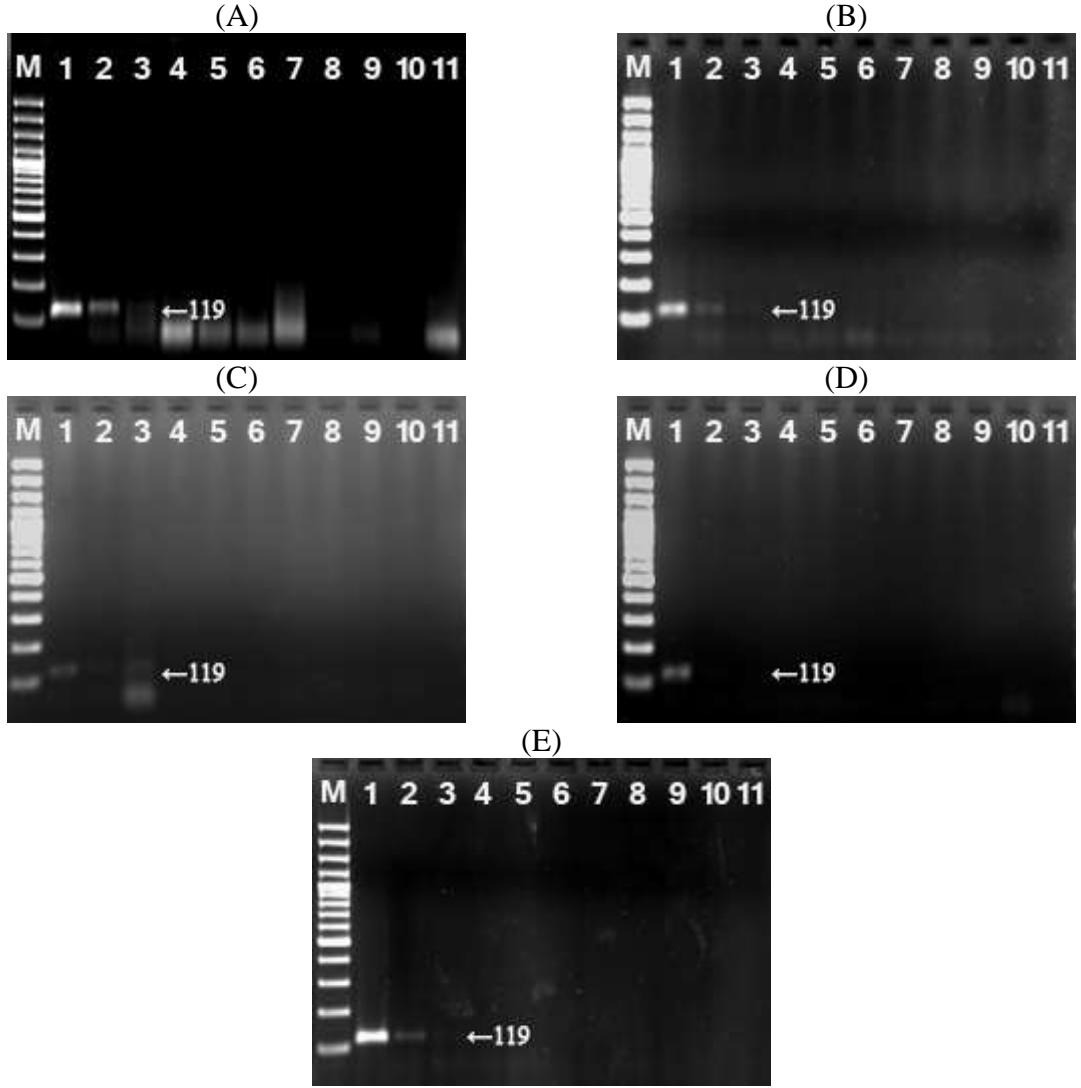
Tüm reaksiyonlar pozitif ve bakteri ile DNA dilüsyonlarının bant yoğunluğu orantılı bulundu. Çalışmada 10 katlı DNA dilüsyonları ile yapılan PCR testleri sonucunda her etken için deteksiyon limiti reaksiyon başına 10 pg DNA (10 pg DNA/25 µl) olarak belirlendi. Çalışmada 10 katlı bakteri dilüsyonları ile yapılan PCR testleri sonucunda pozitif bandın görüldüğü $1,5 \times 10^4$ CFU/ml bakteri sulandırmasından yapılan değerlendirmeler sonucunda multiplex-PCR tekniğinin deteksiyon limiti 3 CFU/25 µl olduğu belirlendi.

L. monocytogenes'nin steril PBS içerisindeki 10 katlı seri dilüsyonlarından 2.5 µl alınarak 22.5 µl'lik eşit hacimlerdeki mide içeriği, kotiledon, karaciğer, dalak ve süt örneklerinin yapay kontaminasyonu sonrasında gerçekleştirilen multiplex-PCR testlerinde süt haricindeki diğer tüm örneklerde $1,5 \times 10^7$ CFU/ml yoğunluğunda bakteri içeren dokularda pozitif bantlar gözlemlendi. Süt örneğinde ise $1,5 \times 10^6$ CFU/ml'lik bakteri yoğunluğunun olduğu örneklerde pozitiflik görüldü. Yapılan hesaplamalar sonucunda süt örneğinde reaksiyon başına 75 CFU'luk (75 CFU/25 µl) deteksiyon limiti saptandı. Diğer örneklerde ise bu değer 750 CFU/25 µl olarak belirlendi. *L. ivanovii* ile yapılan sensitivite değerlendirme çalışmasında ise dalak hariç diğer tüm dokularda $1,5 \times 10^6$ CFU/ml'lik bakteri

yoğunluğunun olduğu örneklerde pozitiflik görüldü. Dalakta ise sadece $1,5 \times 10^8$ CFU/ml yoğunluğunda bakteri içeren dokularda pozitif bantlar gözlemlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda dalak örneğinde reaksiyon başına 7500 CFU'luk (7500 CFU/25 μ l) deteksiyon limiti saptandı. Diğer örneklerde ise bu değer 75 CFU/25 μ l olarak belirlendi (Şekil 3.5 ve 3.6).

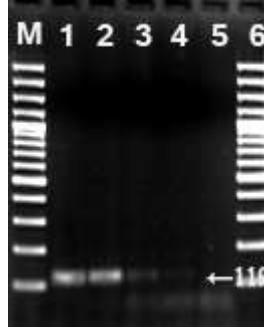


Şekil 3.5. *L. monocytogenes* ile yapay olarak kontamine edilen (A) mide içeriği, (B) kotiledon, (C) karaciğer, (D) dalak, (E) süt örneklerinden yapılan multiplex-PCR'in sensitivite validasyonunun jel elektroforezi görüntüsü. 10 katlı bakteriyel dilüsyon: sütun 1, $1,5 \times 10^8$ CFU/ml; sütun 2, $1,5 \times 10^7$ CFU/ml; sütun 3, $1,5 \times 10^6$ CFU/ml; sütun 4, $1,5 \times 10^5$ CFU/ml; sütun 5, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml; sütun 6, 1500 CFU/ml; sütun 7 150 CFU/ml; sütun 8, 15 CFU/ml sütun 9, 1,5 CFU/ml; sütun 10; 0,15 CFU/ml; sütun 11, negatif kontrol. M sütununda moleküler ağırlık için marker bulunmaktadır.



Şekil 3.6. *L. ivanovii* ile yapay olarak kontamine edilen (A) mide içeriği, (B) kotiledon, (C) karaciğer, (D) dalak, (E) süt örneklerinden yapılan multiplex-PCR'ın spesifite ve sensitivite validasyonu. 10 katlı bakteriyel dilüsyon: sütun 1, $1,5 \times 10^8$ CFU/ml; sütun 2, $1,5 \times 10^7$ CFU/ml; sütun 3, $1,5 \times 10^6$ CFU/ml; sütun 4, $1,5 \times 10^5$ CFU/ml; sütun 5, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml; sütun 6, 1500 CFU/ml; sütun 7 150 CFU/ml; sütun 8, 15 CFU/ml; sütun 9, 1,5 CFU/ml; sütun 10, 0,15 CFU/ml; sütun 11, negatif kontrol. M sütununda moleküler ağırlık için marker bulunmaktadır.

Anabilim dalında daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda PCR ile *Listeria* spp. DNA'sı içerdiği saptanan yavru atan koyunlara ait abomasum içeriklerinin multiplex-PCR tekniğiyle incelenmesi sonucunda 4 örneğin tamamının *L. ivanovii* yönünden pozitif olduğu belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* kaynaklı 4 klinik abort örneğiyle multiplex-PCR validasyonunun jel elektroforezi görüntüsü. Sütun 1-4, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* izolatları; sütun 5, negatif kontrol. M sütununda moleküler ağırlık için marker bulunmaktadır.

3. TARTIŞMA

Listeria monocytogenes ve *Listeria ivanovii* ruminantlarda yavru atma olgularından sorumlu olan iki önemli patojenik *Listeria* türüdür. Son yıllardaki yayınlar bu iki türden *L. ivanovii*'nin ruminant abortlarından daha sık izole edilen tür olduğunu rapor etmektedir. Bu çalışmada, yavru atan sürülerden toplanan ve moleküler olarak *Listeria* spp. olduğu doğrulanan saha örnekleri geliştirilen multiplex-PCR tekniği ile test edildi ve aborta neden olan tüm *Listeria* PCR pozitif örneklerin tamamının *L. ivanovii* olduğu belirlendi. Bu bulgu, ruminantlarda yavru atma olgularından sorumlu olan türün *L. ivanovii* olduğu bilgisini doğrular niteliktedir.

Listerialar tüm dünyada doğada, toprakta, suda, çevrede yaygın olarak bulunan bakterilerdendir. Ülkemizde de *Listeria* seroprevalansına ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Türkiye'de, yavru atma geçmişi bulunan ineklerin %42,85'inin *L. monocytogenes* yönünden seropozitif olduğu bildirilmiştir (Yıldız ve ark., 2009). Orta Anadolu bölgesinde atık yapan koyunlardan alınan kan örneklerinde %2.18 *L. monocytogenes*'e karşı antikor saptanmıştır (Arda ve ark., 1987). Kurbanlık için Ankara'da satılan koç ve koyunlardan toplanan serumlarla yapılan başka bir çalışmada ise incelenen hayvan serumlarının %54,6'sında *L. monocytogenes* antikorları tespit edilmiştir (Gazyacağı ve ark., 2009). Kırıkkale yöresinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise süt sığır serumlarının %37'sinde anti-O *L. monocytogenes* antikorları belirlenmiştir (Öcal ve ark., 2008). Her ne kadar bu sonuçlar hayvanlarda sadece seropozitifliği ortaya koymaya yönelik olup infeksiyon ve bunun sonucu olarak da yavru atma ile ilişkilendirilememekte ise de önemli abort etkenlerinden *L. monocytogenes*'in ülkemizde yaygın bulunduğu ve gebe hayvanlar için önemli bir risk oluşturabileceği görülmektedir.

Listerialar ruminantlardaki önemli bakteriyel abort etkenleri arasındadır. İzgür ve ark. (1990) Türkiye'de koyun atık fötuslarından izole ettikleri iki mikroorganizmayı *L. monocytogens* olarak tanımlamışlardır (İzgür ve ark., 1990). Barkallah ve ark. (2014)'nın Tunus'ta yavru atan süt ineklerinde bakteriyel abort etkenlerinin

prevalansının araştırdıkları çalışmada sığır vaginal örneklerinin %4,66'sında *Listeria* DNA'sını saptamışlardır (Barkallah ve ark., 2014). Araştırmacılar, PCR ürünlerinin dizilemesini gerçekleştirerek *L. monocytogenes* DNA'sını doğrulamışlardır. Bir diğer çalışmada, laboratuvara gönderilen koyun fötuslarının %5,3'ünden, keçi fötuslarının ise %6,4'ünden *Listeria* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışmada Listerialar koyunlarda *Campylobacter* spp. (%11,1), *Chlamydomphila abortus* (%9,7), *Toxoplasma gondii* (%8,3)'nin ardından dördüncü en sık izole edilen etken olurken, keçilerde ise *Coxiella burnetii* (%8,6)'nin ardından en sık izole edilen ikinci abort etkeni olmuştur (Van Den Brom ve ark., 2012). Türkiye'de, 2008 yılında anabilim dalımızda tamamlanan ve koyunlarda abortif bakteriyel patojenlerin moleküler tanısı için multiplex-PCR teknikleri geliştirilmesine yönelik bir proje sonuçlarına göre *Listeria* spp. aborte fetüs mide içeriklerinin %4'ünde saptanmış ve *Brucella* spp. ve *Campylobacter* spp.'nin ardından *C. burnetii* ile birlikte en sık karşılaşılan abort etkeni olduğu bildirilmiştir (Sareyyüpoğlu ve ark., 2008).

Yeni bir teknik geliştirilmesinin en önemli aşaması hedef genlerin doğru seçimi ve bu hedef genlere spesifik primerlerin tasarlanmasıdır. Moleküler tanı testleri için primer tasarımı web tabanlı ya da ticari yazılım programları ile gerçekleştirilmektedir. Primerler tasarlandıktan sonra kullanılmadan önce bilgisayar programları ya da web tabanlı programlarla *in-silico* analizler gerçekleştirilmeli, sentezlendikten sonra da *in-vitro* laboratuvar testleri ile tasarlanan primerler test edilmelidir. Bu çalışmada, *Listeria* türlerinin moleküler tanısında kullanılan primerler TÜBİTAK destekli bir araştırma projesinde dizayn edilmiştir (Sareyyüpoğlu ve ark., 2008). Bu çalışmada, kontrol suşlarına gerçekleştirilen PCR testlerinde *in-silico* analizler sonucu *L. monocytogenes*'e spesifik olduğu belirlenen primer çiftlerinden *L. monocytogenes*'in *iap* (invasion associated secreted endopeptidase) geninin 221 bp'lik fragmentine spesifik olduğu düşünülen 75 ve 76 numaralı Lmono2F ve Lmono2R kodlu primer çifti ile aynı bakterinin *prfA* geninin 167 bp'lik fragmentine spesifik olduğu düşünülen 79 ve 80 numaralı Lmono4F ve Lmono4R kodlu primer çiftinin aynı zamanda *L. ivanovii* suşlarında da aynı büyüklükte (non-spesifik) ürün amplifikasyonuna neden olduğu gözlemlendi. Bu durumun *prfA* geni ile *iap* geninin her iki *Listeria* türünde de bulunan genler olması ve bu genlerin dizilerinin belirli bir oranda benzerliğe sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *L. monocytogenes*'in *iap* ve *hly*

genlerinden tasarlanan primerlerin spesifik olarak hedefledikleri çoğalttıklarına dair çalışmalar bulunmaktadır (Kaur ve ark., 2007). Bununla birlikte, *iap* geninin her iki türde de korunan bölgeler içerdiğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Chen ve Knabel, 2007).

Listerial kaynaklı abort vakalarında etkenler hem fütusa ait organ ve mide içeriğinden hem de anneye ait örneklerden (vaginal svap, vaginal yıkantı sıvısı, vaginal akıntı, süt) tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte abort vakalarında en değerli materyalin aborte fötus olduğu bilinmektedir. Bunun nedeninin anneye ait materyallerin çevresel etkenlerle kontaminasyona daha açık olmasıdır. Bu nedenle, bu çalışmada, doğadaki abort olgularındaki senaryoyu taklit edebilmek amacıyla fötal dokular (fötal karaciğer, dalak, kotiledon, mide içeriği) 10 katlı bakteri dilusyonları ile yapay olarak kontamine edilmiş ve geliştirilen tekniklerin tanısal etkinlikleri bu örneklerle test edilmiştir. Bu çalışmada, yapay kontamine dokulardaki listeriaların deteksiyon limiti reaksiyon başına 75-750 CFU/25 µl arasında değişti. Bu incelenen örnekte $3 \times 10^3 - 3 \times 10^4$ CFU/g'lık bir etken yoğunluğuna karşılık gelmektedir. Fötal dokulardan sadece dalak örneğinde, reaksiyon başına 7500 CFU'luk (7500 CFU/25 µl, 3×10^5 CFU/g) deteksiyon limiti saptandı. Wagner ve arkadaşları *L. monocytogenes*'i kantitatif olarak fötal karaciğer, dalak, kalp, akciğer ve beyin dokularından log 3,1 ile 5,6 ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$) CFU/g arasında belirlemiştir (Wagner ve ark., 2005).

Klinik örneklerden yapılan analizlerde PCR deteksiyon sensitivitesini etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Bakteriyel hücre konsantrasyonu ve inhibitörler bunlardan bazılarıdır. Çalışmada 10 katlı bakteri dilusyonları ile yapılan PCR testleri sonucunda pozitif bandın görüldüğü $1,5 \times 10^4$ CFU/ml bakteri sulandırmasından yapılan hesaplamalar sonucunda multiplex-PCR tekniğinin deteksiyon limiti 3 CFU/25 µl olduğu belirlendi. Wernars ve ark. (1991) *L. monocytogenes*'in bakteri dilusyonlarındaki deteksiyon limitinin 1 ve 10 CFU arasında olduğunu belirtmiştir (Wernars ve ark., 1991). Çalışmada elde edilen deteksiyon limiti diğer araştırmacıların elde ettiği değerlerle benzerlik göstermektedir. Tez çalışmasında dalak örneğinde reaksiyon başına 7500 CFU'luk (7500 CFU/25 µl) deteksiyon limiti saptandı. Diğer örneklerde ise bu değer 75 CFU/25 µl olarak belirlendi. Bakteri dilusyonları ve yapay kontaminasyonu multiplex-PCR sonuçlar

karşılaştırıldığında deteksiyon limitinde 1-2 log'luk kayıp olduğu gözlemlendi. Benzer olarak Border ve ark. (1992) ve Wang ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada bakteri dilusyonları ve yapay kontaminasyonların PCR deteksiyonundaki sensitivitesini araştırılmış ve sonuç olarak hücrelerin dokulara inokulasyonu ile sensitivite de kayıp olduğu görülmüştür (Border ve ark., 1990; Wang ve ark., 1992). Görülen bu kaybın dokulardaki inhibitör maddelerden kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Backman ve ark. (1999) ve Wilde ve ark. (1990) diğer bakterilerin nükleik asitlerinin ve doku örneklerinin PCR çalışmasını inhibe edebileceğini belirtilmişlerdir. Birçok çalışmada da bu tip PCR inhibitörlerinin geçerli bir neden olarak görülebileceği kabul edilmiştir (Backman ve ark., 1999; Wilde ve ark., 1990). Barnes ve ark. (2014) sensitivite kaybının doğru ekstraksiyonu metodunun kullanılması ile ilişkili olduğunu söylemişlerdir (Barnes ve ark., 2014). Buna karşılık inhibitörler içeren klinik örneklerde bakteri saptanmasının mümkün olabileceğini düşünülmektedir.

Tekniğin *L. monocytogenes*'e oranla *L. ivanovii*'yi saptamada daha başarılı olduğu (1 logaritmik fark) görülmüştür. Bu farkın biraz da çoğalan hedef gen büyüklüğünün *L. ivanovii*'de *L. monocytogenes*'ten daha küçük olması, bunun da multiplex-PCR'da PCR dinamikleri açısından *L. ivanovii* spesifik primerlere avantaj sağlamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

L. monocytogenes ruminantlarda klinik ve subklinik mastite neden olan ve sütle saçılan bir etkidir. Sütteki listerialar gıda kaynaklı bir patojen olarak insan sağlığını tehdit ettiği gibi diğer hayvanlar içinde infeksiyon kaynağıdır. Bu çalışmada listeriaların sütle saçılmasında kullanılabilme potansiyeli nedeniyle yapay kontamine süt örnekleri de hazırlandı. Bu tez çalışmasında en iyi sonuçlar süt örneklerinden elde edildi. Deteksiyon limiti reaksiyon başına 75 CFU (75 CFU/25 µl) olarak saptandı. Bu değer 3×10^3 CFU/ml etkene karşılık gelmektedir. Bessesen ve ark. (1999), sütteki deteksiyon limitinin 10^5 CFU/ml olduğunu rapor etmiştir (Bessesen ve ark., 1999).

L. monocytogenes insanlar için oldukça patojen bir etkidir. *L. ivanovii*'nin ise insanlarda sporadik olarak hastalığa neden olduğuna dair raporlar mevcuttur. Tez çalışmasında kullanılan teknik insanlarda *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* saptanmasında kullanılabilmesi düşünülmektedir. Çalışmada geliştirilen tekniğin sensitivitesinin birtakım modifikasyonlar ve/veya stratejilerle (öncesinde selektif

zenginleştirme, immunomanyetik seperasyon, vb.) artırılabilmesi mümkündür. Bu şekilde teknik ihtiyaç duyulduğunda farklı amaçlarla (ensefalitik formda beyinden örneklenen numunelerin soğuk zenginleştirme aşamalarının tamamlanmasına gerek duyulmayacak şekilde test edilmesi, gıda örneklerinde *L. monocytogenes*'in varlığının araştırılması, insanlardan alınan örneklerin incelenmesi, vb.) kullanılabilir. Bunun dışında, çalışmadaki primerler kullanılarak proba hibridizasyon ya da prob yerine non-spesifik floresan boyaların kullanıldığı real-time PCR teknikleri ve nested-PCR teknikleri geliştirilerek daha duyarlı sonuç veren moleküler tanı tekniklerinin geliştirilmesi mümkündür.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ruminantlarda yavru atmaya neden olan iki önemli patojen *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin moleküler tanısına yönelik multiplex-PCR tekniği ilk kez geliştirilmiştir. Yapılan ulusal ve uluslararası literatür taramalarında benzer bir çalışmanın yer almaması mevcut araştırma çıktılarının ve geliştirilen tekniğin önemini ortaya koymaktadır.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ruminantlarda yavru atmaya neden olan Listerial abort etkenlerinin tanısında kullanılmak üzere hızlı, hassas, spesifik moleküler teşhis yöntemleri optimize edilmiştir. Çalışma sonucunda, gerek laboratuvar izolatlarının identifikasyonu ve/veya konfirmasyonunda gerek saha materyallerinde listerial atık etkenleri olan *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin direkt tanısına olanak sağlayan multiplex-PCR tekniği geliştirilmiştir. Tekniğin sadece 10 katlı direkt bakteri sulandırmalarıyla belirlenen deteksiyon limiti (reaksiyon başına) 3 CFU/25 µl iken, bu sulandırmalardan eşit hacimdeki dokulara aktarılarak elde edilen yapay kontamine dokulardaki deteksiyon limiti 75-750 CFU/25 µl arasında değişmiştir. Dokular söz konusu olduğunda tekniğin sensitivitesinde (1-2 log'luk) kayıp görülmüştür. Bu kaybın dokulardaki hücre ve inhibitör yoğunluğundaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tekniğin *L. monocytogenes*'e oranla *L. ivanovii*'yi saptamada daha başarılı olduğu (1 logaritmik fark) görülmüştür. Bu farkın biraz da çoğalan hedef gen büyüklüğünün *L. ivanovii*'de *L. monocytogenes*'ten daha küçük olması, bunun da multiplex-PCR'da PCR dinamikleri açısından *L. ivanovii* spesifik primerlere avantaj sağlamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada geliştirilen tekniğin sensitivitesinin birtakım modifikasyonlar ve/veya stratejilerle (öncesinde selektif zenginleştirme, immunomanyetik seperasyon, vb.) artırılabilmesi mümkündür. Bu şekilde teknik ihtiyaç duyulduğunda farklı amaçlarla (ensefalitik formda beyinden örneklenen numunelerin soğuk zenginleştirme aşamalarının tamamlanmasına gerek duyulmayacak şekilde test edilmesi, gıda örneklerinde *L. monocytogenes*'in varlığının araştırılması, insanlardan alınan örneklerin incelenmesi, vb.) kullanılabilir. Bunun dışında, çalışmadaki primerler kullanılarak proba hibridizasyon ya da prob yerine non-spesifik floresan boyaların kullanıldığı real-time PCR teknikleri ve nested-PCR teknikleri geliştirilerek daha duyarlı sonuç veren moleküler tanı tekniklerinin geliştirilmesi mümkündür.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ruminantlarda yavru atmaya neden olan iki önemli patojen *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin moleküler tanısına yönelik multiplex-PCR tekniği ilk kez geliştirilmiştir. Yapılan ulusal ve uluslararası literatür taramalarında benzer bir çalışmanın yer almaması mevcut araştırma çıktılarının ve geliştirilen tekniğin önemini ortaya koymaktadır.

ÖZET

Ülkemiz hayvancılığında ruminant yetiştiriciliğinin önemli bir yeri bulunmaktadır. Ruminant yetiştiriciliğinde görülen en önemli problemlerden birisi yavru atmadır. Ülkemizde ruminantlarda abortusa neden olan bakteriyel hastalıklar arasında en sık rastlanılardan birisi de Listeriozis'tir. Yavru atmaya neden olan başlıca patojen *Listeria* türleri *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'dir.

Bu çalışmada, ruminantlarda patojen *Listeria* türlerinin (*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*) neden olduğu yavru atmaların tanısında kullanılmak üzere bir multiplex-PCR tekniği geliştirilmiştir. Tekniğin sadece 10 katlı direkt bakteri sulandırmalarıyla belirlenen deteksiyon limiti (reaksiyon başına) 3 CFU/25 µl iken, bu sulandırmalardan eşit hacimdeki dokulara aktarılarak elde edilen yapay kontamine dokulardaki deteksiyon limiti 75-750 CFU/25 µl arasında değişmiştir. Multiplex-PCR tekniği fetal mide içeriği, fetal karaciğer ve kotiledon örneklerinde *L. ivanovii*'yi *L. monocytogenes*'e oranla daha hassas olarak saptamış, etkenlerin saçılımının araştırılmasında ideal örneklerden biri olması nedeniyle yapay kontaminasyon çalışmalarına dahil edilen süt örneklerinde ise geliştirilen teknikle her iki etken de eşit duyarlılıkla saptanmıştır.

Ruminant abortuslarına neden olan *Listeria* türlerinin moleküler tanısında multiplex-PCR tekniğinin kullanılmasına ilişkin bir literatüre rastlanmamış olması nedeniyle tez çıktılarının orijinal olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Abort, identifikasyon, *Listeria*, multiplex-PCR, teşhis.

SUMMARY

Ruminants play an important role in livestock breeding in our country. In ruminant breeding, abortion is one of the leading problems, and one of the most important abortifacient diseases in Turkey is undoubtedly listeriosis. The main pathogens among *Listeria* species that cause abortion are *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*.

In this study, development of a PCR technique for the detection of pathogenic *Listeria* species (*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*) causing listerial abortions in ruminants was described. The determined detection limit from bacterial dilutions was only 3 CFU/25 μ l, while the detection limit from the artificial contaminated tissue ranged between 75-750 CFU/25 μ l. Results obtained with the multiplex-technique from foetal abomasal fluid, fetal liver, and cotyledon samples were found to be more sensitive in case of *L. ivanovii* rather than *L. monocytogenes*. Milk is known as a source of bacterial shedding, therefore milk samples were included for artificial contamination research and the results were of equal sensitivity and ideal for both pathogens.

A multiplex-PCR technique for the detection of *Listeria* species causing abortion in ruminants was not found in the literature; therefore, this thesis is considered to be original.

Key Words: Abortion, diagnosis, identification, *Listeria*, multiplex-PCR.

KAYNAKLAR

- ALLERBERGER, F. (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**(3): 183-189.
- ANON. Erişim Tarihi 15.04.2015 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- ARDA, M. (1997). Mikrobiyal üremenin kontrolü. In: *Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi.* Ankara. 1.Baskı. s: 92-99.
- ARDA, M., BISPING, W., AYDIN, N., İSTANBULLUOĞLU, E., AKAY, O., İZGUR, M., KARAER, Z., DIKER, S., KIRPAL, G. (1987). Ätiologische untersuchungen über den abort bei schafen unter besonderer berucksichtigung des nachweises von Brucellen, Campylobacter, Salmonellen Listerien, Leptospiren und Chlamydien. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* **100**: 405-408.
- AZIZOĞLU, R. O., OSBORNE, J., WILSON, S., KATHARIOU, S. (2009). Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(16): 5315-5320.
- BACKMAN, A., LANTZ, P., RADSTROM, P., OLCEN, P. (1999). Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Mol. Cell. Probes.* **13**(1): 49-60.
- BARKALLAH, M., GHARBI, Y., HASSENA, A. B., SLIMA, A. B., MALLEK, Z., GAUTIER, M., GREUB, G., GDOURA, R., FENDRI, I. (2014). Survey of infectious etiologies of bovine abortion during mid- to late gestation in dairy herds. *PLoS One.* **9**(3): e91549.
- BARNES, H. E., LIU, G., WESTON, C. Q., KING, P., PHAM, L. K., WALTZ, S., HELZER, K. T., DAY, L., SPHAR, D., YAMAMOTO, R. T., FORSYTH, R. A. (2014). Selective microbial genomic DNA isolation using restriction endonucleases. *PLoS One.* **9**(10): e109061.
- BESSESEN, M. T., LUO, Q. A., ROTBART, H. A., BLASER, M. J., ELLISON, R. T. (1999). Detection of *Listeria monocytogenes* by Using the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(9): 2930-2932.
- BHUNIA, A. K. (1997). Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**(2): 77-107.
- BILLE, J., CATIMEL, B., BANNERMAN, E., JACQUET, C., YERSIN, M. N., CANIAUX, I., MONGET, D., ROCOURT, J. (1992). API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(6): 1857-1860.
- BOERLIN, P., BANNERMAN, E., ISCHER, F., ROCOURT, J., BILLE, J. (1995). Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. *Res. Microbiol.* **146**(1): 35-49.

- BORDER, P. M., HOWARD, J. J., PLASTOW, G. S., SIGGENS, K. W. (1990). Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**(3): 158-162.
- BRUGÈRE-PICOUX, J. (2008). Ovine listeriosis. *Small Ruminant Research.* **76**(1-2): 12-20.
- BUCHRIESER, C. (2007). Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes infection.* **9**(10): 1147-1155.
- BUCHRIESER, C., RUSNIOK, C., GARRIDO, P., HAIN, T., SCORTTI, M., LAMPIDIS, R., KARST, U., CHAKRABORTY, T., COSSART, P., KREFT, J., VAZQUEZ-BOLAND, J. A., GOEBEL, W., GLASER, P. (2011). Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. *J. Bacteriol.* **193**(23): 6787-6788.
- CABANES, D., DEHOUX, P., DUSSURGET, O., FRANGEUL, L., COSSART, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* **10**(5): 238-245.
- CAI, S., KABUKI, D. Y., KUAYE, A. Y., CARGIOLI, T. G., CHUNG, M. S., NIELSEN, R., WIEDMANN, M. (2002). Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **40**(9): 3319-3325.
- CAMPERO, C. M., ODEON, A. C., CIPOLLA, A. L., MOORE, D. P., POSO, M. A., ODRIOZOLA, E. (2002). Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **49**(8): 379-383.
- CHEN, Y., KNABEL, S. J. (2007). Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(19): 6299-6304.
- COCOLIN, L., MANZANO, M., CANTONI, C., COMI, G. (1997). A PCR-microplate capture hybridization method to detect *Listeria monocytogenes* in blood. *Mol. Cell. Probes.* **11**(6): 453-455.
- CZUPRYNSKI, C. J., KATHARIOU, S., POULSEN, K. (2010). *Listeria*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* Ed, C. L. Gyles, J. F. Prescott, G. Songer C. O. Thoen: (4 ed., pp. 167-187). Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- DAVIS, J. A., JACKSON, C. R. (2009). Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microbial drug resistance.* **15**(1): 27-32.
- DE CESARE, A., BRUCE, J. L., DAMBAUGH, T. R., GUERZONI, M. E., WIEDMANN, M. (2001). Automated ribotyping using different enzymes to improve discrimination of *Listeria monocytogenes* isolates, with a particular focus on serotype 4b strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**(8): 3002-3005.
- DECATUR, A. L., PORTNOY, D. A. (2000). A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science.* **290**(5493): 992-995.

- DURMAZ, H., AVCI, M., AYGÜN, O. (2015). Türkiye'nin güneydoğu bölgesi'nde üretilen mısır silajı ve çiğ sütlerde *Listeria* türlerinin varlığı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* **21**(1): 41-44.
- ELNIFRO, E. M., ASHSHI, A. M., COOPER, R. J., KLAPPER, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**(4): 559-570.
- ERDOĞAN, H. M., GÖKÇE, G., GÖKÇE, H. İ., KIRMIZIGÜL, A. H., GÜNEŞ, V., SURAL, E., YILMAZ, K. (1999). Kars yöresindeki sığırlarda *Listeria monocytogenes* enfeksiyonlarının ELISA yöntemi ile araştırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* **5**(1): 43-46.
- FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**(3): 476-511.
- GASANOV, U., HUGHES, D., HANSBRO, P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**(5): 851-875.
- GAZYAĞCI, S., YILDIRIM, M., BABÜR, C., KILIÇ, S. (2009). Investigation of Antibodies Against *Listeria monocytogenes* in Ram and Ewes in Ankara Province. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* **15**(6): 975-977.
- GERNER-SMIDT, P., BOERLIN, P., ISCHER, F., SCHMIDT, J. (1996). High-frequency endonuclease (REA) typing: results from the WHO collaborative study group on subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **32**(3): 313-324.
- GLASER, P., FRANGEUL, L., BUCHRIESER, C., RUSNIOK, C., AMEND, A., BAQUERO, F., BERCHE, P., BLOECKER, H., BRANDT, P., CHAKRABORTY, T., CHARBIT, A., CHETOUANI, F., COUVE, E., DE DARUVAR, A., DEHOUX, P., DOMANN, E., DOMINGUEZ-BERNAL, G., DUCHAUD, E., DURANT, L., DUSSURGET, O., ENTIAN, K. D., FSIHI, H., GARCIA-DEL PORTILLO, F., GARRIDO, P., GAUTIER, L., GOEBEL, W., GOMEZ-LOPEZ, N., HAIN, T., HAUF, J., JACKSON, D., JONES, L. M., KAERST, U., KREFT, J., KUHN, M., KUNST, F., KURAPKAT, G., MADUENO, E., MAITOURNAM, A., VICENTE, J. M., NG, E., NEDJARI, H., NORDSIEK, G., NOVELLA, S., DE PABLOS, B., PEREZ-DIAZ, J. C., PURCELL, R., REMMEL, B., ROSE, M., SCHLUETER, T., SIMOES, N., TIERREZ, A., VAZQUEZ-BOLAND, J. A., VOSS, H., WEHLAND, J., COSSART, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science.* **294**(5543): 849-852.
- GRANIER, S. A., MOUBARECK, C., COLANERI, C., LEMIRE, A., ROUSSEL, S., DAO, T. T., COURVALIN, P., BRISABOIS, A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(8): 2788-2790.
- GRAY, M. J., FREITAG, N. E., BOOR, K. J. (2006). How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect. Immun.* **74**(5): 2505-2512.
- GRAY, M. L., KILLINGER, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30**(2): 309-382.

- GUDDING, R., NESSE, L. L., GRONSTOL, H. (1989). Immunisation against infections caused by *Listeria monocytogenes* in sheep. *Vet. Rec.* **125**(5): 111-114.
- HAYES, P. S., GRAVES, L. M., AJELLO, G. W., SWAMINATHAN, B., WEAVER, R. E., WENGER, J. D., SCHUCHAT, A., BROOME, C. V. (1991). Comparison of cold enrichment and U.S. Department of Agriculture methods for isolating *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(8): 2109-2113.
- HENRY, B. S. (1933). Dissociation in the genus *Brucella*. *J. Infect. Dis.*: 374-402.
- İNCİ, A., BABÜR, C., AYDIN, N., ÇAM, Y. (2002). Kayseri yöresinde tek tırnaklılarda (at, eşek ve katır) *Toxoplasma gondii* (Nicolle ve Manceaux, 1908) ve *Listeria monocytogenes*' in seroprevalansı üzerine araştırmalar. *Fırat Üniv Sağ Bil Vet Derg.* **16**(2): 181-185.
- İZGÜR, M., ESENDAL, Ö. M., AKAY, Ö., GÜLCÜ, B. (1990). Koyunların atık fötüs'larından *Listeria monocytogenes* izolasyonu. *KÜKEM Derg.* **13**(2): 31-35.
- JANTZEN, M. M., NAVAS, J., CORUJO, A., MORENO, R., LÓPEZ, V., MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V. (2006). Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span. J. Agric. Res.* **4**(3): 235-247.
- JEFFERS, G. T., BRUCE, J. L., MCDONOUGH, P. L., SCARLETT, J., BOOR, K. J., WIEDMANN, M. (2001). Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology.* **147**(5): 1095-1104.
- KAUR, S., MALIK, S. V., VAIDYA, V. M., BARBUDDHE, S. B. (2007). *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* **103**(5): 1889-1896.
- KOUTSOUMANIS, K. P., KENDALL, P. A., SOFOS, J. N. (2004). A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food microbiol.* **21**(4): 415-422.
- LACHICA, R. V. (1990). Simplified Henry technique for initial recognition of *Listeria* colonies. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(4): 1164-1165.
- LE MONNIER, A., AUTRET, N., JOIN-LAMBERT, O. F., JAUBERT, F., CHARBIT, A., BERCHE, P., KAYAL, S. (2007). ActA is required for crossing of the fetoplacental barrier by *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **75**(2): 950-957.
- LECUIT, M., DRAMSI, S., GOTTARDI, C., FEDOR-CHAIKEN, M., GUMBINER, B., COSSART, P. (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* **18**(14): 3956-3963.
- LECUIT, M., VANDORMAEL-POURNIN, S., LEFORT, J., HUERRE, M., GOUNON, P., DUPUY, C., BABINET, C., COSSART, P. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science.* **292**(5522): 1722-1725.

- LEIMEISTERWACHTER, M., DOMANN, E., CHAKRABORTY, T. (1992). The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174**(3): 947-952.
- LIN, Y. D., CHOU, C. C. (2004). Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. *Food microbiol.* **21**(5): 605-610.
- LIU, D., AINSWORTH, A. J., AUSTIN, F. W., LAWRENCE, M. L. (2004). PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Vet. Microbiol.* **101**(2): 83-89.
- LIU, D., LAWRENCE, M. L., GORSKI, L., MANDRELL, R. E., AINSWORTH, A. J., AUSTIN, F. W. (2006). *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *J. Clin. Microbiol.* **44**(1): 214-217.
- LOW, J. C., DONACHIE, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.* **153**(1): 9-29.
- MANZANO, M., COCOLIN, L., CANTONI, C., COMI, G. (1998). A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **42**(3): 207-212.
- MARKEY, B., LEONARD, F., ARCHAMBAULT, M., CULLINANE, A., MAGUIRE, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology* (2 ed.): Elsevier Health Sciences.
- MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., MONCANY, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* **16**(1): 47-51.
- MAULE, J. (2000). Pulsed-field gel electrophoresis. In: *The Nucleic Acid Protocols Handbook* Ed., R. Rapley: (pp. 81-104): Humana Press.
- MCCARTHY, S. A. (1991). Pathogenicity of nonstressed, heat-stressed, and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(8): 2389-2391.
- MCLAUCHLIN, J., AUDURIER, A., TAYLOR, A. G. (1986). Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967-1984; the use of serotyping and phage typing. *J. Med. Microbiol.* **22**(4): 367-377.
- MCLAUCHLIN, J., REES, C. D. (2009). Genus I. *Listeria* Pirie 1940a, 383^{AL}. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* Ed, P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer W. B. Whitman: (2 ed., Vol. 3, pp. 244-256). New York: Springer.
- MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A., SWANN, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterized by large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.* **29**: 407-439.
- NARAYANAN, S. (2013). *Listeria*. In: *Vet. Microbiol.* Ed, D. S. Mcvey, M. Kennedy M. M. Chengappa: (3rd ed., pp. 223-227). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

- NELSON, K. E., FOUTS, D. E., MONGODIN, E. F., RAVEL, J., DEBOY, R. T., KOLONAY, J. F., RASKO, D. A., ANGIUOLI, S. V., GILL, S. R., PAULSEN, I. T., PETERSON, J., WHITE, O., NELSON, W. C., NIERMAN, W., BEANAN, M. J., BRINKAC, L. M., DAUGHERTY, S. C., DODSON, R. J., DURKIN, A. S., MADUPU, R., HAFT, D. H., SELENGUT, J., VAN AKEN, S., KHOURI, H., FEDOROVA, N., FORBERGER, H., TRAN, B., KATHARIOU, S., WONDERLING, L. D., UHLICH, G. A., BAYLES, D. O., LUCHANSKY, J. B., FRASER, C. M. (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* **32**(8): 2386-2395.
- NORRUNG, B., GERNER-SMIDT, P. (1993). Comparison of multilocus enzyme electrophoresis (MEE), ribotyping, restriction enzyme analysis (REA) and phage typing for typing of *Listeria monocytogenes*. *Epidemiol. Infect.* **111**(1): 71-79.
- NORTON, D. M. (2002). Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.* **85**(2): 505-515.
- ÖCAL, N., BABÜR, C., YAĞCI, B. B., MACUN, H. C., KILIÇ, S., YAĞCI, İ. P. (2008). Kırıkkale yöresinde süt sığırlarında Brusellozis, Listeriozis ve Toksoplazmozis'in Seroprevalansı ve birlikte görülme sıklığı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg.* **14**(1): 75-81.
- PARACIKOĞLU, J. (2006). *Listeria* infeksiyonları. In: *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)* Ed, N. Aydın J. Paracikoğlu: (pp. 57-63). Ankara: İlke-Emek Yayınları.
- PARTE, A. C. (2014). Genus *Listeria*. Erişim Tarihi 23.01.2014 <http://www.bacterio.net/listeria>
- PINE, L., MALCOLM, G. B., BROOKS, J. B., DANESHVAR, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.* **35**(2): 245-254.
- PIRIE, J. H. (1940). The Genus *Listerella* Pirie. *Science.* **91**(2364): 383.
- POULSEN, K. P., CZUPRYNSKI, C. J. (2013). Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Anim. Health Res. Rev.* **14**(1): 30-39.
- PREMARATNE, R. J., LIN, W. J., JOHNSON, E. A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(10): 3046-3048.
- PROBERT, W. S., SCHRADER, K. N., KHUONG, N. Y., BYSTROM, S. L., GRAVES, M. H. (2004). Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* **42**(3): 1290-1293.
- QUINN, P. J., CARTER, M. E., MAREKY, B., CARTER, G. R. (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby.
- QUINN, P. J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., HARTIGAN, P., FANNING, S., FITZPATRICK, E. S. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2 ed.): Wiley.

- RAWOOL, D. B., MALIK, S. V., SHAKUNTALA, I., SAHARE, A. M., BARBUDDHE, S. B. (2007). Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *Int. J. Food Microbiol.* **113**(2): 201-207.
- ROCHA, P. R., DALMASSO, A., GRATTAROLA, C., CASALONE, C., DEL PIERO, F., BOTTERO, M. T., CAPUCCHIO, M. T. (2013). Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Res. Vet. Sci.* **94**(1): 111-114.
- ROCOURT, J., HOF, H., SCHRETTENBRUNNER, A., MALINVERNI, R., BILLE, J. (1986). [Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **116**(8): 248-251.
- RODRIGUEZ-LAZARO, D., LOPEZ-ENRIQUEZ, L., HERNANDEZ, M. (2010). *smcL* as a novel diagnostic marker for quantitative detection of *Listeria ivanovii* in biological samples. *J. Appl. Microbiol.* **109**(3): 863-872.
- SALLEN, B., RAJOHARISON, A., DESVARENNE, S., QUINN, F., MABILAT, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(3): 669-674.
- SAREYYÜPOĞLU, B., DİKER, S., GÜNGÖRDÜ, S. (2008). Koyunlarda abortif bakteriyel infeksiyonların tanısında multiplex-PCR tekniklerinin geliştirilmesi. *TÜBİTAK TOVAG Proje 104O237*: 1-61.
- SAUDERS, B. D., FORTES, E. D., MORSE, D. L., DUMAS, N., KIEHLBAUCH, J. A., SCHUKKEN, Y., HIBBS, J. R., WIEDMANN, M. (2003). Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. *Emerg. Infect. Dis.* **9**(6): 672-680.
- SAUNDERS, V. F., REDDAKLIF, L. A., BERG, T., HORNITZKY, M. (2007). Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.* **85**(1-2): 72-77; quiz 85.
- SCHMID, M. W., NG, E. Y., LAMPIDIS, R., EMMERTH, M., WALCHER, M., KREFT, J., GOEBEL, W., WAGNER, M., SCHLEIFER, K. H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**(1): 1-18.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N., WHITTAM, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(5): 873-884.
- SHEEHAN, B., KLARSFELD, A., MSADEK, T., COSSART, P. (1995). Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J. Bacteriol.* **177**(22): 6469-6476.
- SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V., SNEATH, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Med. J. Aust.* **2**(1): 3-4.
- SNYDER, J. W., RONALD, M. (2006). *Handbook of media for clinical microbiology*: CRC Press.
- SOLMAZ, H., AKKAN, H. A., TÜTÜNCÜ, M. (2002). Van ve yöresinde atlarda Listeriozis'in seroprevalansı. *YYÜ Vet Fak Derg.* **13**: 62-63.

- SONI, D. K., DUBEY, S. K. (2014). Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes* based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes. *Mol. Biol. Rep.* **p**:1-11.
- SPRATT, B. G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**(3): 312-316.
- TROXLER, R., VON GRAEVENITZ, A., FUNKE, G., WIEDEMANN, B., STOCK, I. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**(10): 525-535.
- TSAI, H. N., HODGSON, D. A. (2003). Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6943-6945.
- VAGSHOLM, I., NESSE, L. L., GUDDING, R. (1991). Economic analysis of vaccination applied to ovine listeriosis. *Vet. Rec.* **128**(8): 183-185.
- VAN DEN BROM, R., LIEVAART-PETERSON, K., LUTTIKHOLT, S., PEPERKAMP, K., WOUDA, W., VELLEMA, P. (2012). Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011. *Tijdschr. Diergeneeskd.* **137**(7): 450-457.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZALEZ-ZORN, B., WEHLAND, J., KREFT, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**(3): 584-640.
- WAGNER, M., MELZNER, D., BAGO, Z., WINTER, P., EGERBACHER, M., SCHILCHER, F., ZANGANA, A., SCHODER, D. (2005). Outbreak of clinical listeriosis in sheep: evaluation from possible contamination routes from feed to raw produce and humans. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **52**(6): 278-283.
- WALKER, J. K., MORGAN, J. H., MCLAUCHLIN, J., GRANT, K. A., SHALLCROSS, J. A. (1994). *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Vet. Microbiol.* **42**(2-3): 245-253.
- WANG, R. F., CAO, W. W., JOHNSON, M. G. (1992). 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(9): 2827-2831.
- WERNARS, K., HEUVELMAN, C. J., CHAKRABORTY, T., NOTERMANS, S. H. W. (1991). Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **70**(2): 121-126.
- WILDE, J., EIDEN, J., YOLKEN, R. (1990). Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* **28**(6): 1300-1307.
- WILLIAMS, D., IRVIN, E. A., CHMIELEWSKI, R. A., FRANK, J. F., SMITH, M. A. (2007). Dose-response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant guinea pigs. *J. Food Prot.* **70**(5): 1122-1128.

- WITTS, L. J., WEBB, R. A. (1927). The monocytes of the rabbit in *B. monocytogenes* infection: a study of their staining reactions and histogenesis. *J Plant Pathol Microbiol.* **30**(4): 687-712.
- YILDIZ, K., KUL, O., BABÜR, C., KILIC, S., GAZYAĞCI, A. N., CELEBI, B., GURCAN, I. S. (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Vet. Parasitol.* **164**(2-4): 306-310.
- ZELENIK, K., AVBERSEK, J., PATE, M., LUSICKY, M., KRT, B., OCEPEK, M., ZDOVC, I. (2014). Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission - a case report. *Zoonoses public health.* **61**(4): 238-241.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: Amer

Soyadı: TALİÇ

Doğum yeri ve tarihi: Banja Luka - Bosna Hersek, 10.04.1985

Uyruğu: Bosna Hersek

Medeni Durumu: Bekar

İletişim adresi ve Telefonu: Banjalucka 141/A

Sanski Most / Bosna Hersek

Cep: +905532723429

Cep: +38761476194

e-posta: amertalic@gmail.com

II-Eğitimi

2011 – 2012 Gazi Üniversitesi Türkçe Öğretim, Araştırma ve Uygulama Merkezi
(TÖMER)

2004 – 2010 Saraybosna Üniversitesi Veteriner Fakültesi

2000 – 2004 Bosna Hersek, Opca Gimnazija Sanski Most Lisesi Lisesi

1992 – 2000 Bosna Hersek, Osnovna Skola Hasan Kikic İlköğretim Okulu

Yabancı Dil: Türkçe, İngilizce ve Almanca

III-Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyim

2010 – 2011 Bosna Hersek SPZ Apimed Veteriner Hekim

V- Bilimsel İlgil Alanları**Posterleri:**

1. **TALİÇ A, ŞİŞİÇ M, TERZİÇ A, AVDİÇ E.** (2008). *Reparation of femoral diaphyseal fracture in cats using steinmann pins and cerclage wire - case report. X.* International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul/Türkiye.

Seminerleri:

- Bosna Hersek'te hayvanlarda görülen infeksiyöz hastalıkları (2014).