T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARS YÖRESİ SIĞIRLARINDAN ALINAN SÜT ve VAJİNAL SIVAP ÖRNEKLERİNDEN LİSTERİA TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Vet. Hek. Doğan AKÇA
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof.Dr. Mitat ŞAHİN

2010-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARS YÖRESİ SIĞIRLARINDAN ALINAN SÜT ve VAJİNAL SIVAP ÖRNEKLERİNDEN LİSTERİA TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Vet. Hek. Doğan AKÇA
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof.Dr. Mitat ŞAHİN

Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2008-VF-013

2010-KARS

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Veteriner Hekim Doğan AKÇA tarafından hazırlanmış olan **"Kars Yöresi Sığırlarında Süt ve Vajinal Sıvap Örneklerinden Listeria Türlerinin Araştırılması"** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/03/2010

Adı Soyadı	**İmza**
Başkan: Prof.Dr. Mitat ŞAHİN	.....
Üye : Prof.Dr. Mustafa ATASEVER	.....
Üye : Prof.Dr. Hidayet Metin ERDOĞAN	.....
Üye : Doç.Dr. Ahmet ÜNVER	.....
Üye : Yrd.Doç.Dr. Leyla VATANSEVER	.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..11.../03../.2010 gün ve226../.26.. sayılı kararlarıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr. Hakan KOCAMIŞ

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No.
	Kısaltmalar	I
	Tablo Listesi	II
	Resim Listesi	III
	Önsöz	IV
1.	**GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER**	1
1.1.	Tarihçe	1
1.2.	Etiyoloji	6
1.3.	Taksonomi	11
1.4.	Epidemiyoloji	13
1.5.	Patogenesis	16
1.6.	Semptomlar	21
1.7.	Teşhis	23
1.8.	Tedavi	33
1.9.	Korunma	34
1.10.	Amaç	34
2.	**MATERYAL VE METOT**	35
2.1.	Materyal	35
2.1.1.	Süt ve vajinal sıvap örnekleri	35
2.1.2.	Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan besiyerleri	39
2.1.3.	Referans Suşlar	45
2.1.4.	İzole edilen Listeria türlerinin PCR temelli moleküler tanısı için kullanılan araç ve gereçler	46
2.2.	Metot	47
2.2.1.	Süt ve vajinal sıvap örneklerinden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu	47
2.2.2.	İzole edilen Listeria türlerinden DNA ekstraksiyonu	51

2.2.3. PCR işlemi 53

3. BULGULAR 55

3.1. Süt örneklerinden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyon bulguları 55

3.2. Vajinal sıvap örneklerinden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyon bulguları 55

3.3. PCR bulguları 55

4. TARTIŞMA ve SONUÇ 61

5. ÖZET 67

6. SUMMARY 69

7. KAYNAKLAR 71

8. ÖZGEÇMİŞ 82

EKLER 83

KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion Agar
bp	Base Pair
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
iap	Invasion Associated Protein
ISO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu
kb	Kilobase
LEB	Listeria Enrichment Broth
LLO	Listeriolysin O
LRB	Listeria Repair Broth
LSA	Listeria Selective Agar
MOX	Modifiye Oxford Agar
NGFIS	The Netherlans Government Food Inspection Service
OD	Optik Dansite
OF	Oksidasyon Fermentasyon
PCR	Polymerase Chain Reaction
prfA	Positive Regulatory Factor A
SİM	Semisolid İndol Motility Medium
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TSI	Triple Sugar Iron Agar
TSYE	Tryptic Soy-Yeast Extract
USDA	United States Department of Agriculture

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Adı	Sayfa No
Tablo 1	Listeria cinsine ait türlerin bazı özellikleri	7
Tablo 2	Listeria cinsinin identifikasyon testleri	11
Tablo 3	Listeria serotiplerinin antijenik yapıları	13
Tablo 4	Örneklerin alındığı köylerin şehir merkezine uzaklıkları	37
Tablo 5	Örneklerin alındığı hayvanlara ait bazı özellikler	38
Tablo 6	İzolatların biyokimyasal test sonuçları	56
Tablo 7	İzolatların identifikasyon sonuçları	57
Tablo 8	İzolatların elde edildiği hayvanlara ait bazı bilgiler	58

RESİM LİSTESİ

Resim No	Adı	Sayfa No
Resim 1	Örneklemelerin yapıldığı köylerin haritadaki yerleşim planı	36
Resim 2	Gram pozitif Listeria kolonilerinin mikroskobik görünümleri	59
Resim 3	β hemolitik Listeria türlerinin kanlı agarda CAMP testi görünümler	59
Resim 4	İzolatlara uygulanan *iap* gen bazlı PCR yöntemi ile saptanan Listeria DNA'sının %1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü	60

ÖNSÖZ

Listeriozis ruminantlılarda abortus, ensefalomyelitis ve septisemi ile seyrederek, ekonomik kayıplara yol açan zoonoz bir infeksiyondur. Listeria'lar 1-45°C gibi çok geniş ısı aralığında üreyebilirler. Tuza ve pH'ya toleransları çok fazladır. Listeria'ların doğal rezervuarlarının toprak ve memelilerin sindirim sistemi olması, Listeria'lar ile gıdaların kontaminasyon ihtimalini artırmaktadır. Ayrıca buzdolabı ısısında üreyebilmeleri halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Teknolojinin gelişimiyle birlikte daha hızlı bir yaşam tarzının geliştiği toplumlarda hazır gıda tüketiminin artması, buzdolabı ısısında üreyebilen Listeria'lara karşı daha dikkatli ve kontrollü tüketimi gerektirmektedir. Listerial infeksiyonlar, çoğunlukla gıda kaynaklı olması nedeniyle salgınlar şeklinde seyredebilir. İnfekte hayvanlar dışkı, süt, idrar, atık fetus ve uterus akıntıları ile çevreyi ve gıda ürünlerini kontamine ederler. İnfeksiyonlarla mücadelenin en kolay ve ekonomik yolu koruma ve kontrol yöntemidir. Gıdaların etkenlerle bulaşması önlenmeli, bunun içinde gıda üretimindeki personelin eğitimi titizlikle yapılmalı ve kontroller aksatılmamalıdır.

Kars Yöresi'nde yapılan bu çalışmanın, halk sağlığı açısından önemi her geçen gün daha fazla fark edilen listeriozisin araştırılmasına ve bölgemizdeki atık vakalarının daha objektif değerlendirilmesine katkı sağlayacağı kanısı taşımaktayız.

Tez çalışması süresince yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm danışman hocam Prof.Dr. Mitat ŞAHİN'e, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof.Dr. Salih OTLU, Prof.Dr. Hidayet Metin ERDOĞAN, Doç.Dr. Ahmet ÜNVER, ve Yrd.Doç.Dr. Atila Taner KALAYCIOĞLU'na, örneklerin alınması ve laboratuvar işlerinin yürütülmesi aşamasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Özgür ÇELEBİ, Yrd.Doç.Dr. Çiğdem SEZER, Yrd.Doç.Dr. Berna DUMAN, Arş.Gör. Fatih BÜYÜK ve Arş.Gör. Aliye GÜLMEZ ve Vet.Hek. Erdinç KOÇ'a köylere

ulaşmamızda yardımlarını esirgemeyen Hayvan Sağlığı Şube Müdürü Veteriner Hekim Sadık DOĞAN'a ve personeline, maddi destekte bulunan Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Fonu Yönetim Kurulu'na, yasal prosedürlerde yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve her zaman maddi ve manevi desteklerini gördüğüm anneme, babama ve kardeşlerime, beni her zaman anlayışla karşılayan eşime ve kızıma teşekkür ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Tarihçe

İsveçli bir araştırmacı olan Hülphers 1911 yılında tavşanlarda karaciğer nekrozuna neden olan bir bakteri tanımladı ve karaciğere olan affinitesi nedeniyle *Bacillus hepatis* olarak isimlendirdi. Ayrıca geçmiş tarihlere yönelik yaptığı araştırmalarda, 1891 yılında Fransa'da Hayem ve 1893 yılında Almanya'da Henle tarafından Gram pozitif basillerin tanımlanmış olduklarını fark etti (50). Bu bakteri 1926 yılında Murray ve arkadaşları tarafından ilk olarak tanımlanmıştır. Murray ve arkadaşları hasta tavşan ve kobayların karaciğerlerinden izole ettikleri bakteriyi *Bacterium monocytogenes* olarak isimlendirdiler (8, 13, 77). Pirie ise 1927 yılında, Güney Afrika'da gerbillerin karaciğerinden izole ettiği bakteriyi *Listerella hepatolytica* olarak isimlendirmiştir (13, 50, 82). Çiftlik hayvanlarından koyunlarda, ilk encephalitis olgularını Gill 1931, 1933 ve 1937 yıllarında Yeni Zelanda'da yaptığı çalışmalarla rapor etmiştir (48, 50, 82). Sığırlarda sporadik encephalitis salgını New Jersey'de Jones ve Little tarafından 1934'de bildirilmiştir (7, 82). Tavuklarda listeriozis ABD'de Seastone tarafından 1935 yılında ve Britanya'da Paterson tarafından 1937'de rapor edilmiştir (82).

Yeni doğan bebeklerden ve fötusta listeriozisi Almanya'da 1951'de ilk rapor eden Potel, etkene *Corynebacterium infantisepticum* ismini vermiştir (92). Avustralya'da Atkinson tarafından 1917'de, çocuklarda meningitis salgını bildirilmiştir. Nyfeldt 1929'da mononukleosisli bir hastada cerebrospinal sıvıdan Listerella izole ettiğini rapor etmiştir (82).

Dünyada sütten *Listeria monocytogenes*'i ilk izole eden Potel olmuştur. Potel 1954'te mastitisli bir ineğin sütünü içtikten sonra düşük yapan kadından ve içilen çiğ sütten aynı serotipte *Listeria monocytogenes*'i izole etmiştir (4, 49).

Listerella ismi bir grup küfe verildiği için, cins ismi 1940'ta Pirie tarafından Listeria olarak önerildi. Tür ismi ise Murray ve arkadaşlarının önerisi ile monocytogenes olarak kabul edildi (77, 86).

Listeria'lar için bu güne kadar birçok isim kullanılmıştır. Bazıları şunlardır: *Bacterium hepatis* Hülphers-1911, *Bacterium monocytogenes* Murray ve arkadaşları-1926, *Listerella hepatolytica* Pirie-1927, *Listerella monocytogenes hominis* Nyfeldt-1932, *Listerella ovis* Gill-1937, *Corynebacterium infantisepticum* Potel-1950, *Listeria infantiseptica* Potel-1952, *Listerella bovina*, *L. gallinarium, L. cuniculi, L. suis, L. gerbilli* (48, 50, 77).

Türkiye'de hayvanlarda listeriozis üzerine ilk çalışmalar 1945 yılında Özcebe ve Doğuer tarafından koyunlarda yapılmıştır. Sığırlarda ilk *L. monocytogenes* izolasyonu ise 1952 yılında İyigören tarafından yapılmıştır (4, 7, 100). Türkiye'de köpeklerden *L. monocytogenes* izolasyonu 2005 yılında Kocabıyık ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bursa ilinde yapılan bu çalışmada, sokak köpeklerinden toplanan 82 gaita örneği bakteriyolojik olarak incelenmiş ve sadece 1 örnekte (%1.22) *L. monocytogenes* izole edilmiştir (69). Konya ili Merkez İlçe'ye bağlı iki köyde toplam 8 baş sığırda listeriozis salgını tespit edilmiştir. Sığırlarda Türkiye'deki ilk listeriozis salgını olarak bildirilmiştir. Serebrospinal sıvı, idrar ve gaitadan *L. monocytogenes* izolasyonu yapılmıştır (10).

Ankara'da bir ticari işletmedeki, bazılarında sinirsel semptomlar ve abort vakaları görülen 50 keçi, 3 at, 1 köpek ve 6 hayvan bakıcısının kan örnekleri, *L. monocytogenes* antikorlarının varlığı yönünden Osebold yöntemi ile araştırılmıştır. Keçi serumlarının 23'ü (%46) seropozitif, 10'u (%20) şüpheli ve 17'si (%34) negatif olarak değerlendirilmiştir. At serumlarının hepsi, 5 hayvan bakıcısı serumları ve köpek serumu seropozitif olarak sonuç vermiştir (17). Yine Ankara Yöresi'nde Güçlü ve arkadaşları tarafından, sportif amaçla yetiştirilen sağlıklı 100 ata ait serumlar, Osebold absorbsiyon testi ile *L. monocytogenes* antikorlarının varlığı yönünden değerlendirilmiş ve 100 serum örneğinin 62'si seropozitif olarak tespit edilmiştir (52).

Taştan ve arkadaşları semptomatik olarak kuduz belirtileri ile getirilen bir inek beyninden *L. monocytogenes* izole etmişlerdir. Beynin çeşitli yerlerinden besiyerlerine yapılan ilk ekimlerde üreme olmamıştır. Daha sonra Listeria Enrichment Broth (LEB)'ta beyin homojenize edilerek 4°C'de inkube edilmiştir. Bu homojenattan birer hafta arayla 1 ml alınarak hazırlanan diğer Listeria Enrichment Broth'a aktarılmış ve 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakılmıştır. Buradan Modifiye Oxford Agar (MOX) ve kanlı agara ekimler yapılmıştır. İnkubasyonun 15. günündeki ekimler sonucunda kanlı agar ve MOX'da üremeler gözlenmiştir (102).

Kars Yöresi'nde 2004 yılı Mart ayında, 5 adet atık koyun fötusların karaciğer ve akciğerlerinden bakteriyolojik kültürlerde *Listeria ivanovii* üretildiği rapor edilmiştir (101).

Marmara Bölgesi'ndeki sağlıklı koyunların kan serumlarında Enzyme Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) ile yapılan çalışmada Listeriolysin O (LLO) antijenine %3.6, somatik ½ a'ya %11.5 ve somatik 4b'ye karşı %10.4 oranında pozitiflik bulunmuştur (55). Yine aynı çalışmada 180 koyunun rektumundan alınan dışkı örnekleri LSA besiyerlerine ekim yapılarak, ikişer örnekte *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *L. welshimeri*, birer örnekte ise *L. grayi* ve *L. murrayi* suşları izole edilmiş ve infeksiyonun zoonotik yönüne vurgu yapılmıştır (55). Bursa'da yapılan bir çalışmada ise Listeriozis şüpheli toplam 62 koyunda ELISA yöntemi ile yapılan kan serumu analizleri sonucunda 16'sında (%25.8) LLO antikoru tespit edilmiştir. Yaşları 4 ay ile 5 yaş arasında değişen encephalitis formu görülen 18 koyunun 5'inde (%27.77) antikor tespit edilmiştir (67).

Bursa bölgesinde sığırlarda *L. monocytogenes* antikor seroprevalansının belirlenmesi için, Kennerman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 209 sığır kan örneği kullanılmıştır. Aglutinasyon testi sonucunda kan örneklerinin 101'inde (%48.32) seropozitif kabul edilen 1/100 titresi ve üzeri seviyede *L. monocytogenes* antikorları belirlenmiştir. Kan örneklerinin 54'ünde (%24.8) ise hiç antikor saptanmamıştır. Dişilere ait kan örneklerinin %53.7'si (58/108), erkeklere ait kan örneklerinin %42.5'i (43/101)

seropozitif olarak belirlenmiştir. Silajla beslenen sığırlarda seropozitiflik %57.5 (92/160), silajla beslenmeyenlerden %18.3 (9/49) istatistiki olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (66).

Kars Yöresi'nde ELISA yöntemi ile yapılan bir çalışmada, Kars çevresindeki sığırların %88.7'si ve Kars merkez köylerindeki sığırların %75.3'nün anti-LLO antikorlarını taşıdığı tespit edilmiştir (36).

Elazığ ilinde mezbahada kesilen 206 tavuk, 170 koyun ve 130 sığırdan alınan dışkı örnekleri *L. monocytogenes* varlığı yönünden incelenmiş ve tavuk dışkılarının 9'undan (%4.36), koyun dışkılarının 1'inden (%0.58) ve sığır dışkılarının 2'sinden (%1.53) *L. monocytogenes* izole edilmiştir (61). Elazığ'da Arslan ve arkadaşlarının tavuk kesimhanesinden sağladıkları, tavuk gövde kısımları but, boyun, kanat, göğüs ve karkas yıkama sularının her birisinden 20'şer örnek olmak üzere, toplam 100 örnekle yaptıkları çalışma sonucunda, 8 örnekten (%8) *L. monocytogenes* izole etmişlerdir (9). Elazığ ve çevresinde koyun ve keçi atık fetusların organ örnekleri Brucella, Campylobacter, Salmonella ve Listeria yönünden bakteriyolojik ve patolojik, ayrıca atık yapan koyun ve keçilerin kanlarıda serolojik olarak incelenmiştir. Toplam 110 atık fetustan sadece 1'inden (%0.9) *L. monocytogenes* izole edilmiştir. İncelenen toplam 650 kan serumu Listeria yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir (78).

Elazığ ilinde yapılan bir çalışma, satışa sunulan kıymalarda %35, tavuk etlerinde %60 parça etlerde %28 ve sucuklarda %16,3 *Listeria* spp. kontaminasyonu olduğunu ortaya koymuştur (54). Van'da yapılan çalışmada, 100 kıyma örneğinin 73'ünde, 50 parça et örneğinin 37'sinde, 25 sucuk örneğinin 19'unda, 25 salam örneğinin 4'ünde, 25 sosis örneğinin 11'inde ve 25 pastırma örneğinin 8'inde *Listeria* spp. izole edilmiştir. Kıyma, sosis ve parça ette en sık *L. innocua*, sucuk ve pastırmada en sık *L. monocytogenes*, salamda ise en sık *L. welshimeri* ile kontaminasyonların oluştuğu tespit edilmiştir (15). Gemlik Garnizonu'ndaki askeri birliklerde tüketilen tavuk etleri ve kesimhanelerden 100'er adet tavuk karkası ve bağırsak içeriği incelenmiş, karkas örneklerinden izole edilen 76 Listeria türünün identifikasyonu sonucu

bunların, 24'ünün (%31.6) *L. monocytogenes*, 43'ünün (%56.6) *L. innocua*, 4'ünün (%5.3) *L. murrayi*, 3'ünün (%3.9) *L. grayi* ve 2'sinin (%2.6) *L. welshimeri* olduğu tespit edilmiştir. Bağırsak içeriğinden ise 12 Listeria türü izole edilmiş ve identifikasyonla bunların 5'inin (%41.6) *L. monocytogenes*, 2'sinin (%16.7) *L. murrayi*, 2'sinin (%16.7) *L. welshimeri*, 2'sinin (%16.7) *L. seeligeri*, 1'inin (%8.3) *L innocua* olduğu tespit edilmiştir (79).

İstanbul, Trakya ve Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan 271 peynir örneğinin 11'inden (%4) *L. monocytogenes*, 1'inden (%0.36) *L. grayi* ve 221 çiğ süt örneğinin 1'inden (%0.45) *L. monocytogenes*, ayrıca 8 tereyağı örneğinin 1'inden (%12) *L. monocytogenes* suşu izole edilmiştir (105). İzmir ve civarındaki işletmelerden sağlanan, klinik ve subklinik mastitisli 200 ineğe ait çiğ süt örneklerinin incelenmesi sonucu, bir örnekte *L. denitrificans*, iki örnekte ise *L. innocua* tespit edilmiştir (39). Ankara ve civarında yapılan çalışmada işletmelere ait ve sokak sütçülerinden sağlanan toplam 211 çiğ süt örneğinin ikisinde (%0.94) *L. monocytogenes* izole edilmiştir (104). Erzurum piyasasından temin edilen 34 beyaz peynir örneğinin sadece birinde (%2.94) iki farklı *L. monocytogenes* suşu ve *L. innocua* olmak üzere üç farklı Listeria türü tespit edilmiştir. 16 çivil peynir örneğinin birinde (%6.25) *L. monocytogenes* izole edilmiştir (64).

İstanbul Anadolu yakasındaki büyükbaş hayvan çiftliklerinde direkt inek memelerinden toplanan 370 çiğ süt ve marketlerden toplanan 186 sert peynir örneği incelenmiştir. ELISA ile yapılan incelemede, çiğ süt örneklerinin 15'inde (%4.1), sert peynir örneklerinin 3'ünde (%1.6) *Listeria* spp. pozitif bulunmuştur. Kültür yöntemi ile yapılan incelemede ise, çiğ süt örneklerinin 17'sinde (%4.6), sert peynir örneklerinin 5'inde (%2.7) *Listeria* spp. izole edilmiştir. Toplam 556 örnekten kültür yöntemi ile izole edilen 22 Listeria suşunun 10'u (%45.5) *L. monocytogenes*, 7'si (%31.8) *L. innocua*, 3'ü (%13.6) *L. welshimeri*, 2'si (%9.1) *L. ivanovii* olarak identifiye edilmiştir (4).

Van il merkezindeki pastanelerden temin edilen 50 kremalı pasta örneğinin, 8'inden (%16) *L. monocytogenes*, 4'ünden (%8) *L. innocua* olmak üzere toplam 12 örnekten (%24) *Listeria* spp. izole edilmiştir (94). Van ve

yöresindeki atlarda, tüp aglütinasyon yöntemiyle yapılan listeriozisin seroprevalansı çalışmasında, 203 at serumu örneği kullanılmış ve bu serumların 176'sı (%86.69) pozitif bulunmuştur (99).

1.2. Etiyoloji

Listeria'lar Gram pozitif, kapsülsüz, sporsuz, yuvarlak sonlanan, 0.4-0.5µm eninde 0.5-2µm boyunda kısa basillerdir. Yeni kültürlerde tek tek veya kısa zincirler şeklinde görüldükleri gibi, v, y şeklinde de görülebilirler. Eski ve çok yeni kültürlerde kokoid ve Gram negatifte görülebilirler. 48 saatten daha fazla oda ısısında kalan düzensiz kolonilerde uzun flamentler görülebilir (4, 8, 13, 14, 37, 41, 50, 83, 87, 92). Listerialar kapsülsüz olarak düşünülse de, Smith ve arkadaşları tarafından 1962'de immunositolojik ve immun elektron mikroskobik çalışmalarla mukopolisakkarit bir kapsüle sahip oldukları gösterilmiştir (50). Preparatlarda kokoid olabildikleri için S*treptokok*'larla karıştırılabilirler. Daha uzun olanlar ise *Corynebacterium*'lara benzeyebilirler (87, 116).

L. monocytogenes'in gıdalarda üremesini etkileyen başlıca faktörler, gıdaların doğal yapısı ve besinsel konsantrasyonu yanısıra, gıdaların su aktivitesi, ortamın pH'sı ve ısısı, ayrıca gıdalardaki inhibitör maddelerin varlığı'dır (74). Özellikle *L. monocytogenes* ısı, pH ve tuz gibi dış şartlara oldukça dayanıklıdır. %10 NaCl ile pH 6-9 aralığındaki ortamlarda üreyebilir (4, 31, 47, 73, 95, 98). Listeria'lar 1-45°C gibi, geniş üreme ısı aralığına sahiptirler ve optimal üreme ısıları 30-37°C'dir. Listeria'lar aerob, mikroaerofilik ve fakültatif anaerobiktirler (4, 13, 37, 73, 75, 83, 87, 95, 98, 110). Walker yaptığı bir çalışmada, *Listeria monocytogenes*'in farklı üç suşunun en düşük üreme ısısının, -0.1 ile -0.4°C aralığında değiştiğini göstermiştir (88, 108). Listeria türlerinin pH toleransını, inkübasyon ısısı, oksijen durumu ve tuz yoğunluğu belirler (88). Listeria türleri %40 safra, %0.25 talyum asetat, %3.75 potasyum tiyosiyonat, %0.4 potasyum tellürit varlığında ürerler (4, 98).

Listeria'lar, peritrik flagellaları ile 20-25°C oda ısısında, hareketlidirler. Yarı katı besiyerinde şemsiye ya da ters çam ağacı şeklinde bir görünüm oluşturarak ürerler. Flagella gelişimi 37°C'de çok zayıf olduğu için, bu ısıda hareket çok sınırlıdır (38, 41, 72, 73, 75, 83, 87, 92, 95, 98, 110, 116). Asılı damla yöntemiyle incelendiğinde takla ve dönme hareketleri dönüşümlü olarak izlenebilir (98).

Listeria türleri katalaz, metil-red, voges-proskauer reaksiyonları, eskulin ve hippurat hidrolizasyon testleri pozitif, oksidaz, indol, üre, jelatin, kazein ve süt hidrolizasyon testleri ise negatiftir (4, 8, 73, 75, 87, 95, 98). Bununla birlikte bu biyokimyasal özellikler suşlar arasında farklılıklar gösterebilmektedir (8, 92).

Listeria cinsine ait türlerin bazı özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Listeria Cinsine Ait Türlerin Bazı Özellikleri (73, 75, 87, 95, 98)

	L. monocytogenes	***L. ivanovii***	***L. innocua***	***L. welshimeri***	***L. seeligeri***	***L. grayi***	***L. murrayi***
Gram boyama	+	+	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-
Metil Red	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	+	-

Listeria'lar nutrient agarda 24 saat inkübasyondan sonra 0.2-0.8 mm çapında, düzenli, noktasal tarzda, mavimsi-gri, şeffaf, kenarlarından biraz kabarmış koloniler oluştururlar. Koloniler 5-10 gün sonra, 5 mm veya daha büyük çaplara ulaşabilirler. Triptoz agarda üreyen 18-24 saatlik koloniler, eğik ışık altında incelenirler ise tipik mavi-yeşil renkte yansıma yaparlar (4, 8, 13, 14, 38, 83, 87, 92, 95, 98). Listeria'ların generasyon süresi 4°C'de 29-40 saat iken, 35°C'de yaklaşık 1 saattir (38). Kanlı agarda hemoliz yapan 3 türden *L. monocytogenes* ve *L. Seeligeri* dar zonlu β hemoliz oluştururken, *L. ivanovii* daha geniş ya da çift zonlu β hemoliz oluşturur (13, 33, 38, 75, 98). Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) testinde *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ile *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri*, *Rhodococcus equi* (*R. equi*) ile *L. ivanovii* pozitif reaksiyon verir. *R. equi, L. ivanovii'*nin oluşturduğu hemoliz zonunu belirgin olarak artırırken, *S. aureus* ise *L. monocytogenes*'in hemoliz zonunu genişletir (12, 13, 22, 33, 38, 42, 45, 73, 87, 95). *S. aureus* sifingomiyelin-fosfohidrolaz enzimi ile eritrositlerin membranında bulunan sifingomyelinleri çözer fakat eritrositleri lize edemez. Beta hemolitik olan *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* hemolizinleri ile eritrositleri daha kolay parçalarlar. *L. ivanovii* ise benzer yardımı *R. equi*'den alır. Kanlı agarda oluşan β hemoliz, *L. monocytogenes'* i patojen olmayan türlerden ayırt eder. *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* hemolitik aktiviteleri tanımlanmıştır. Bir hemolysin olan LLO toksini, intraselüler demirin kullanılabilirliğini artırarak indirek olarak büyüme faktörü olarak görev yapar (46).

İlk CAMP testini Christie ve arkadaşları tanımlamıştır. Araştırmacılar hemolitik B grup streptokokları koyun kanlı agara ektiklerinde *S. aureus* kolonilerine yakın olanların hemolizlerinin arttığını gözlemlemişlerdir (24). B grup streptokoklar ile *S. aureus* arasındaki bu sinerjik etki CAMP testi olarak kullanılmaktadır. Bu test zaman içinde geliştirilerek *L. monocytogenes*'de dahil bazı patojenler içinde kullanılmaya başlanmıştır (76). *L. monocytogenes* tarafından üretilen hemolizinin *S. aureus* ve *R. equi* ile olan sinerjisi ilk olarak 1962 yılında Fraser tarafından gösterilmiştir. Fraser yaptığı detaylı çalışmalar neticesinde *L. monocytogenes*'in *S. aureus* ve *R. equi* ile koyun yada tavşan kanında hemolizi arttırdığı sonucuna varmıştır. Fakat tavşan kanında

Corynebacterium ovis yada *C. renale* ile de hemoliz artmaktadır. Bu nedenle koyun kanının CAMP testi için daha ayırıcı ve tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır (76). CAMP testinde ruminant hayvan kanı, özellikle koyun kanı tercih edilirken fare, domuz, at, kobay ve hatta insan kanının da kullanılabileceğini belirten araştırmacılar vardır. CAMP testinde ruminant kanının özelliklede koyun kanının avantajlarını gösteren ilk araştırmalar, bu testi ilk kez uygulayan Christie ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (24).

Son zamanlarda *L. monocytogenes*'in identifikasyonunda, *S. aureus* ve *R. equi* ile hemoliz oluşturmadaki sinerjiyi esas alan CAMP testini de içeren, Rosco sistem, API Coryne ve MICRO-ID gibi birçok test kiti geliştirilmiştir (76).

L. monocytogenes'in bütün virulens suşları *S. aureus* ile hemoliz oluşturur, fakat bazı avirulent suşlar zayıf hemoliz oluşturabilir. Ayrıca *S. aureus* ile yanlış negatif sonuçlarında olduğu ve değerlendirmenin çok zor olabileceğini bildiren araştırmacılarda vardır. *L. monocytogenes*'in identifikasyonu sırasında, *S. aureus* ve *R. equi*'nin birlikte kullanılmasını ve hatta *R. equi*'nin çok iyi standardize edilmesi gerektiğini bildiren araştırmacılar vardır (76).

Fernandez-Garayzabal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, CAMP testinde *R. equi* STCC 4568 suşu ile *L. monocytogenes* NCTC 8817 suşu, *L. monocytogenes* NCTC 7973 suşu ve *L. ivanovii* ATCC 19119 suşu yöntemine uygun şekilde kanlı agara ekilmiş ve 37°C'de 48 saat inkubasyondan sonra değerlendirilmiştir. Farklı hemoliz zon şekilleri oluşsa da her iki *L. monocytogenes* suşu ve *L. ivanovii*, *R.* equi ile sinerjik hemolitik aktivite göstermiştir. *L. ivanovii* tipik olarak yarı dairesel veya kürek şeklinde hemoliz oluştururken, *L. monocytogenes* dairesel veya raket şeklinde hemoliz oluşturur ve zonun genişliği test edilen suşa göre değişebilir. *L. monocytogenes*'in koleksiyonlardan sağlanan saha suşları, klinik izolatları, gıda izolatları ve çevresel izolatlar ile *R. equi* arasında yapılan CAMP testinde sadece *L. monocytogenes* NCTC 10357 suşunun 1/2a serovarı negatif sonuç göstermiş hemoliz yapmamıştır. Bu nedenle CAMP testinde *L.*

monocytogenes SA+/RE+, *L. ivanovii* SA-/RE+ olarak tanımlanmasının gerekliliği savunulmuştur (42).

İnsanlar için apatojen fakat hayvanlar için patojen olan *L. ivanovii*, ayrıca *L. innocua* ve *L. seeligeri* CAMP testi ile identifiye edilebilirler. *L. ivanovii*'nin CAMP testi karakteristik reaksiyonu *R. equi* ile pozitif, *S. aureus* ile negatiftir (98). *L. ivanovii* kanlı agarda iki halkalı hemoliz oluşturur. İç halka daha belirgin, dış halka ise tam oluşmamış ve çok yaygın hemolizden oluşur *L. ivanovii* ile *R. equi* arasında tam olmayan mızrak başı şeklinde bir hemoliz zonu oluşur. *L. monocytogenes* ve *R. equi* arasındaki hemoliz ise daha küçük ve tamamen kuşatmış bir halka şeklinde zon alanı oluşturur (76).

Yapılan araştırmalarda avirulent *L. monocytogenes* suşları insan, tavşan, domuz ve kanatlı hayvan kanını lize ederken, koyun ve at kanında liziz oluşturmadıkları görülmüştür. Avirulent *L. monocytogenes* suşlarının *S. aureus* ile zayıf bir hemoliz oluşturması, tam olarak aydınlatılmış olmasa da, bu suşların phospholipase aktivitelerindeki eksikliğe bağlanmaktadır. Virulent *L. monocytogenes* suşları ise insan, domuz ve koyun kanında hemoliz meydana getirirler (76).

CAMP testinde meydana gelen hemolizde, *L. monocytogenes, S. aureus* ve *R. equi* arasındaki sinerjik etkinin mekanizması tam olarak aydınlatılmış olmasa da, bu sinerjik etkinin, *L. monocytogenes* tarafından sentezlenen Phospholipase C (PLC) ve LLO, *S. aureus* tarafından sentezlenen sphingomyelinease ve *R. equi* tarafından sentezlenen cholesterol oxidase tarafından oluşturulduğunu savunan hipotezler mevcuttur (42, 76).

Listeria cinsine ait türlerin identifikasyonunda kullanılan testlerle ilgili bilgiler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Listeria Cinsinin İdentifikasyon Testleri (12, 45, 73, 87)

Testler		*L. monocytogenes*	*L. ivanovii*	*L. innocua*	*L. welshimeri*	*L. seeligeri*	*L. grayi*	*L. murrayi*
β-Hemoliz		+	+	-	-	+	-	-
CAMP	***S. aureus***	+	-	-	-	+	-	-
	R. equi	-	+	-	-	-	-	-
Fermentasyon	**Mannitol**	-	-	-	-	-	+	+
	Ramnoz	+	-	d	d	-	-	d
	Ksiloz	-	+	-	+	+	-	-
	Glukoz	+	+	+	+	+	+	+

d: Değişken

1.3. Taksonomi

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1986 baskısında Listeria cinsinde, *L. monocytogenes, L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri, L. ivanovii* olmak üzere kesinleşmiş 5 tür, *L. grayi, L. murrayi, L. denitrificans* olmak üzere tartışmalı 3 tür varken, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin 1994 baskısında, *L. grayi ve L. murrayi'*de kesinleşmiş türlere ilave edilmiştir. Şu an Listeria cinsinde 7 tür bulunmaktadır (4, 33, 41, 55, 95, 98). Bunlardan *L. monocytogenes* insanlar ve hayvanlar için patojendir. *L. ivanovii* özellikle koyunlar, nadir olarakta sığırlar için patojen olmasının yanı sıra, insanlarda da hastalığa sebep olduğu rapor edilmiştir. *L. seeligeri*, *L. innocua* ve *L. welshimeri* genellikle apatojen olarak düşünülmesine rağmen, birkaç insan infeksiyonundan identifiye edilmiştir (4, 33, 46, 90).

L. monocytogenes, 1961 yılında *L. denitrificans* tanımlanıncaya kadar cins içerisinde tek türdü. Daha sonra 1966 yılında *L. grayi*, 1971 yılında *L. murrayi,* 1975 yılında *L. bulgarica,* ki bu tür daha sonra Seeliger tarafından 1984 yılında Bulgar bir bilim insanı olan Ivanov'a atfen *L. ivanovii* olarak isimlendirilmiştir, 1981 yılında *L. innocua*, 1983 yılında da *L. welshimeri* ve *L. seeligeri*, Listeria cinsine ilave edilmiştir. Cinsin temel sınıflandırma kriteri, türlerin fiziksel ve biyokimyasal özellikleri temelinde yapılmıştır. Türlerin DNA sekansları farklı olmasına rağmen, biyokimyasal özellikleri benzerdir (33, 41, 98). Özellikle *L. monocytogenes, L. innocua*, *L. welshimeri, L. seeligeri ve L. ivanovii* birbirine çok benzerken diğer 3 türün, numerik sınıflandırma ve DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Bu türlerin hücre duvarlarının aminoasit dizilimleri ve mürain değişimleri incelendiğinde, *L. denitrificans'*ın murein miktarının önemli derecede farklı olduğu görülmüştür. Bu nedenle *L. denitrificans'*ın Listeria cinsinin dışında kalmasına karar verilmiştir. Ayrıca serolojik ve taksonomik diğer çalışmalar sonucunda *L. murrayi* ve *L. grayi'*nin, Listeria cinsi içinde kalmasına karar verilmiştir (4, 33, 41).

Listeria türleri uygun monoklonal ve poliklonal antikorlarla immünolojik identifikasyon ve serotiplendirmede kullanılabilen, somatik ve flagella antijeni gibi çeşitli yüzey antijenlerine sahiptirler. Listeria somatik O antijeninin 15 subtipi, flageller H antijeninin de 5 subtipi vardır. O ve H antijenlerinin kombinasyonu sonucu Listeria cinsinin en az 16 serotipi tanımlanmıştır. Bunlar 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b ve 7'dir. (33, 38, 71, 73, 98). Diğer bakteri cinsleri ile kros reaksiyon vermediği için, Listeria türlerinin identifikasyonunda H antijeni kullanılmaktadır. *L. grayi* dışındaki türlerin hepsinin tespitinde H antijenik faktör A, B ve C kullanılabilir. *Listeria grayi* ise H antijenik faktör E ile identifiye olabilir (71, 73). Hastalığa neden olan serotiplerin yaygınlığının araştırıldığı bir çalışmada, 1363 vakanın %64'üne 4b'nin, %15'ine 1/2a'nın, %10'una 1/2b'nin ve %4'üne 1/2c'nin sebep olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 4b Serotipinin gebelikle ilişkili hastalıklarda çok yaygın olduğu ve gebe olmayan bireylerde ise daha sıklıkla 1/2b serotipinin şiddetli hastalıklara sebep olduğu bildirilmiştir (29).

Ayrıca 1945 yılından beri uygulanan, faj tiplendirme yönteminde kullanılan 220'den fazla Listeria fajı bulunmaktadır (38).

L. monocytogenes'in safraya karşı direncini belirleyen toplam 12 gen vardır. Bu genler *L. monocytogenes'*in gastrointestinal sistemde varlığının devamını sağlar. İnce bağırsaklardaki safra tuzlarına ve yüksek ozmolariteye rağmen, *L. monocytogenes* kolonizasyonunu ve invazyonunu gerçekleştirirler (44).

Listeria serotiplerinin antijenik yapıları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3: Listeria Serotiplerinin Antijenik Yapıları (3, 12, 45, 71, 73, 96)

Tür	Serotip	O-Antijeni	H-Antijeni
L. grayi ve *L. murrayi* hariç bütün türler	1/2a	I, II	A, B
	1/2b	I, II	A, B, C
	1/2c	I, II	B, D
	3a	II, IV	A, B
	3b	II, IV	A, B, C
	3c	II, IV	B, D
	4a	(V), VII, IX	A, B, C
	4b	V, VI	A, B, C
	4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C
	4c	V, VII	A, B, C
	4d	(V), VI, VIII	A, B, C
	4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
	5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C
	6a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
	6b	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C
	7	XII, XIII	A, B, C
L. grayi ve *L. murrayi*		XII, XIV	E

Not: ( ) içindeki antijenler her izolatta bulunmayabilir.

1.4. Epidemiyoloji

Listeria monocytogenes, 1960 yılına kadar deney hayvanları, yabani hayvanlar, kanatlı hayvanlar, evcil hayvanlar olmak üzere 50'den fazla hayvan türünden ve insanlardan izole edilmiştir (46, 49, 50, 84, 96, 97). Çevresel

kontaminant olan Listeria'lar denizlerden ve tatlı sulardan izole edildiği gibi işlenmiş su ürünlerinden de izole edilmişlerdir (68).

İnfeksiyonun bulaşmasına sebep olan gıdaların başında süt ve süt ürünleri (85), çiğ et, tavuk eti, et ürünleri, çiğ sebze ve deniz ürünleri (81) gelmektedir. Listeria cinsinde yer alan türlerin en patojeni ve önemli olanı *L. monocytogenes*'dir (46). Dünyanın birçok ülkesinde ve yurdumuzda yapılan araştırmalarda gıdalarda yüksek oranda *L. monocytogenes* bulunduğu saptanmıştır (46, 53).

Listeria'lar toprak, su, lağım, silaj, bitkisel ve hayvansal gıda ürünlerinde bulunurlar. Hasta, iyileşen ve sağlıklı insan ve hayvanların dışkı süt ve uterus salgılarından *L. monocytogenes* izole edilmiştir (12, 41, 46, 62, 83, 111, 112, 114, 115). *L. monocytogenes*'in konakçıya girişi genellikle gastrointestinal sistem yoluyla olduğu için, sporadik vakalardaki gibi epidemik infeksiyonlarda da birincil kaynak olarak kontamine besinler düşünülmektedir. Listeriozisin gelişmesi, alınan bakteri miktarına, suşun virülensine ve bireyin duyarlılığına bağlı olmasına rağmen, *L. monocytogenes*'in vücuda alınmasındaki ana yol kontamine gıda ürünlerinin yenmesidir. Hastalığın inkübasyonu birkaç gün ile birkaç hafta arasında değişebilir. Listeriozis salgınları, kontamine gıdaların yenmesinden yaklaşık 24 saat sonra gelişen, çoğunlukla gastrointestinal semptomlarla ilişkili klinik bir seyir izler (83, 84).

Sütün Listeria'lar ile kontaminasyonu 3 yolla gerçekleşir (38, 84).

a) Listeria'lar fakültatif intraselüler mikroorganizmalar olduğu için lökositler içinde çoğalabilirler ve lökositlerin içinde sütle salgılanabilirler.

b) Meme üzerindeki lezyonlardan, sağımcıların elleriyle kontaminasyon gerçekleşebilir.

c) Kontaminasyonun diğer bir yolu da, sağım sonrasında çevreden ve dışkıdan olabilir.

Listeria'lar intraselüler bakteriler olduğu için, sütte bulunan immunglobulin, lizozim, peroksidaz ve laktoferrin gibi antibakterisit maddelere karşı korunurlar. Ayrıca lökositler içerisinde bulunan Listeria'lar, uygun olarak

yapılmayan pastörizasyondan sonra canlı kalabilir ve buzdolabında üreyebilirler (38). Bunun doğal sonucu olarakta Listeria içeren sütler ve diğer gıdalar, insanlarda gıda kaynaklı infeksiyon için risk teşkil etmektedir. Hazır gıda tüketiminin yaygınlaştığı gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerdeki infeksiyon oranları her geçen gün biraz daha artmaktadır. Bu durum iş gücü kaybı ve sağlık giderlerinin artmasına neden olduğu için, Listeria'lar ile ilgili çalışmaların önemi bir kat daha artmaktadır. İnsanlarda listerial infeksiyonların abortlara sebep olabileceği ve dikkatle değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır (29, 44, 111, 112, 113, 114, 115).

Listeria enfeksiyonlarında, yeni doğan bebekler, küçük çocuklar, hamile kadınlar, yaşlılar, kortikosteroid tedavisi görenler, AIDS hastaları, şeker hastaları, kanser hastaları, böbrek hastaları ve ilaç bağımlıları gibi immunsupresif hastalar risk grubunu oluştururlar (2, 37, 72, 111, 112, 114, 115, 116). Hamile bayanlarda, enfeksiyon asemptomatik seyir izleyebilir, hamilelik abortla sonuçlanabilir, listeriozisli bir bebek doğabilir ya da bebek ölümü gerçekleşebilir (44). İntrauterin ya da servikal infeksiyonu olan hamile bayanlarda, spontane abort ya da ölü doğum gerçekleşebilir (111, 112, 114, 115). Gıda kaynaklı listeriozis vakaları nadir olsada, etkilenen bireylerde hastalığın şiddeti ve ölüm oranı yüksektir (46, 111, 112, 115).

Listeriozis bulaşıcı olmayan sporadik vakalar şeklinde meydana gelir. Fakat özellikle silaj gibi kontamine kaynaklara maruz kalan koyunlarda salgınlar oluşabilmektedir. Hastalık özellikle kış ve ilkbahar aylarında çok sık görülür. Kış aylarında sık görülme nedeni, silajla beslenmenin yanı sıra diğer patojenlerin üremesinin baskılandığı düşük ısılarda Listeria türlerinin üreyebilmeleridir (84). İngiltere'de süt sığırcılığı yapılan 1500 çiftlikte, klinik listeriozisin prevalansı ve insidensine yönelik, 1994 yılı Temmuz ayı ile 1995 yılı Haziran ayını kapsayan bir yıllık araştırma yapılmıştır. Listeriozisin en fazla, %44.2 görülme sıklığı ile kış mevsiminde meydana geldiği tespit edilmiştir. Diğer mevsimlerde görülme oranları ise, ilkbaharda %38.4, yazın %11.1 ve sonbaharda %6.3 oranında kalmıştır (34). Hindistan'da süt ineklerinden toplanan 2060 süt örneği ile yapılan çalışmada, *L.*

monocytogenes'in en yüksek izolasyon oranı %7.96 ile sonbahar aylarında görülmüştür. Diğer mevsimlerdeki izolasyon oranları, yazın %5.28, kışın %4.17 ve ilkbaharda %3.66 olarak tespit edilmiştir (63).

1.5. Patogenesis

1.5.1. *Listeria monocytogenes'*in Virülens Faktörleri

*Listeria monocytogenes'*in virülens faktörleri, etkenin hücre içine girişini, hücre içinde yaşamını sürdürmesini, çoğalmasını ve konakçı hücreleri arasında yayılmasını sağlar. *Listeria monocytogenes'*in yüzey ve enzim proteinlerini kodlayan genler vardır. İnvazyonda görevli yüzey proteinini kodlayan, bir virülens geninin, *L. innocua*'da bulunmayışı nedeniyle, bu türün patojenitesi farklılık gösterir (33, 110).

Bakterinin invazyonunda ve hücre içi siklusunda rol alan genler; positive regulatory factor A (prfA), phosphatidylinositol-specific phospholipase C (plcA), phosphatidylcholine-specific phospholipase C (plcB), LLO, zinc-dependent metallooprotease (mpl), actin-polymerizing protein (actA)'dır (33, 110).

1.5.1.1. İnternalinler

İnlAB operonu tarafından kodlanan, İnternalin A 800 aminoasitten ve İnternalin B 630 aminoasitten oluşmaktadır. İnternalin A epiteliyal hücreler gibi fagositoz yapmayan hücrelere bakterinin penetrasyonu için gerekli, ilk tanımlanan yüzey proteinidir. Bir diğer benzer protein ise, karaciğerde hepatosit hücrelerine invazyonu sağlayan internalin B proteinidir. İnternalin A, konakçı epitelyal hücrelerin yüzeyinde bulunan E-cadherin proteinine bağlanınca *L. monocytogenes*'in fagositosunu uyarır (29, 83, 107, 113). Ayrıca intestinal hücrelere yapışmada görev alan p104 yüzey proteini de bulunmaktadır (29, 113).

1.5.1.2. Listeriolysin O (LLO)

Listeriolysin O, hly geni tarafından kodlanan, patojen Listeria türlerinin hücre içi yaşamsal fonksiyonunda rol alan, vertebralı konakçılarda çeşitli rolleri olan bir toksindir. Listeria'lar fagosite edildiği zaman makrofajlarda vakuoller içerisine alınarak hemen öldürülürler. Listeriolysin O, Listeria'ları bu vakuollerde porlar açarak fagositozdan kurtarır. Makrofajlardan kurtulan Listeria'lar sitoplazmada yaşamsal sikluslarına devam ederler. Listeriolysin O vakuol içerisindeki asiditeyi artırarak görev yapmaktadır (29, 107, 113).

1.5.1.3. ActA Proteini

ActA yüzey proteini, prfA geninin kontrolünde actA genince kodlanmaktadır. Konak hücrede aktin flamentlerinin oluşmasını başlatır. Bu aktin flamentlerde bakterinin hücreden hücreye geçişinde önemlidir. Bakterinin konak hücre membranına doğru itilmesiyle, membranda listeriopodlar oluşur ve bu çıkıntılar komşu hücrenin makrofaj ve hepatositleri tarafından fagosite edilir, böylece bakteri antikorlar ya da diğer savunma faktörleri ile karşılaşmaksızın diğer hücreleri infekte ettiği ve yayıldığı düşünülmektedir (29, 107).

Konak hücre profilini, Listeria'ların aktinler aracılığı ile hareketini sağlar. Profilin aktin monomerlerini bağlar ve konfirmasyonunu sağlar. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) ve Mena proteinleri, aktin flamentlerinin bağlandığı spesifik bölgelerdeki profilin konsantrasyonunu sağlarlar. VASP ve Mena proteinleri aktinin bağlanmasında elzem olmasa da işlemlerin verimliliği için önemlidirler (107).

1.5.1.4. Fosfolipazlar

Listeria'lar tarafından sentezlenen iki farklı fosfolipaz C bulunmaktadır. Bunlardan biri, *plcA* geni tarafından kodlanan, phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), ve bir diğeri plcB geni tarafından kodlanan, phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC)'dir (29, 110, 113). Bu iki fosfolipazda bakterinin invazyonu ve yayılmasında rol alır. Deneysel

çalışma ile fosfolipazları kodlayan genlerinde mutasyon olan bakterinin virülensinin, mutasyonsuz bakteriye göre daha düşük olduğu ve PC-PLC'nin, bakterinin hücreden hücreye yayılmasında etkiliyken, PI-PLC'nin ise primer vakuolden kaçışta yardımcı olduğu ispatlanmıştır (29, 107). Fosfolipazlar, fosfor bağlı gliserolü, diasilgliserolü, lizozomları ve fosfolipidleri parçalarlar. PI-PLC sentezlendiğinde aktiftir oysa PC-PLC inaktif olarak sentezlenir (113).

1.5.1.5. Metalloproteaz

Metalloproteaz, mpl geni tarafından kodlanır ve inaktif olarak sentezlenen PC-PLC'nin aktifleşmesinde görev alır. Çinkoya ihtiyaç duyan bir protein olan metalloproteaz, Listeria'lar tarafından sentezlenen fosfolipazların ve konakçı hücreye ait sistein proteazının aktivasyonunu sağlar (29, 83).

1.5.1.6. Clp Proteaz ve ATPaz

Uygun olmayan pH, sıcaklık, ozmotik basınç gibi çevre koşullarına adaptasyonu sağlayan proteinlerin düzenlenmesinde görevli koruyucu proteinlerdir. Caseinolytic protein (clp)'ler, proteinleri korudukları gibi proteolitik enzim görevleri de vardır. Bu özellikleri ile Listeria'ların vakuol içinden çıkmasına yardımcı olurlar (29, 113).

1.5.1.7. Protein p60

Protein p60, hücre yüzeyinde bulunan murein hidrolaz enzimidir ve *L. monocytogenes*'in çoğalmasında katalizör olarak rol alır (29, 113).

1.5.2. Virülensi Etkileyen Çevresel Etkenler

1.5.2.1. Sıcaklık

L. monocytogenes'in LLO üretimi, 25°C'nin altındaki sıcaklıklarda düşmekte veya tamamen durmaktadır. Sıcaklığın 37°C'ye çıkarılması durumunda ise 2 saat içerisinde LLO üretimi normale dönmektedir. Dolayısıyla buzdolabında saklanan kontamine gıdaların yenmesi ile uygun

sıcaklığın sağlanmış olması nedeniyle infeksiyonun oluşabileceği bildirilmiştir (29, 113).

1.5.2.2. pH değeri

Asit adaptasyonu sağlanmış Listeria'ların diğer Listeria'lara göre daha fazla invazif ve makrofaj benzeri hücrelerin içinde daha fazla üreme yeteneğinde oldukları rapor edilmiştir (29, 113).

1.5.2.3. Demir iyonlarının varlığı

Besiyerlerinde demirin varlığı, internalin genlerinin etkisini artırarak *Listeria monocytogenes*'in Caco-2 hücrelerine invazyonunu artırdığı gibi actA proteininin de etkisini artırarak, hücre içi hareketliliği de artırır (22, 29, 113).

1.5.3. Dokulara İnvazyonu

Klinik olarak infeksiyonun oluşabilmesi için gereken minimum doz, konakçının bağışıklık durumu, bakterinin virülensi, tüketilen gıdadaki patojenin konsantrasyonu, tüketilen gıdanın miktarı ve türü gibi bazı değişkenler tarafından etkilenmektedir. Linnan ve arkadaşlarının çalışmalarına göre, *L. monocytogenes*'in şiddetli hastalık meydana getirebilmesi için besinlerin gramında, 10^2-10^4 bakteri kontaminasyonu gerekmektedir (83). Barber tarafından yapılan bir çalışmada Listeria'ların virulent suşlarının, 18-24 saatlik broth kültürlerinden, %0.85 lik tuzlu su ile hazırlanan dozları, farelere intraperitonal ve subkutan enjekte edilmesini takiben 12-90 saat içinde ölmüşlerdir. Dalak ve kalpteki kanda mikroorganizmalar görüldüğü ve subkuteneus enjeksiyondan sonra çok küçük çaplı lokal ödemler bazen de konjuktivitis şekillendiği bildirilmişir. Post mortem bulgularda, 12 saatten fazla yaşayan farelerde belirgin fokal karaciğer nekrozu şekillenmiştir. Karaciğere yayılmış, toplu iğne ucu büyüklüğünde, grimsi sarı odaklar görülmüştür. Çoğunlukla mononükleer hücrelerden oluşan benzer odaklar, dalak, kalp ve böbreklerde de gözlenmiştir (14).

1.5.3.1. Bağırsaklara İnvazyon

L. monocytogenes'in infeksiyon oluşturması, normal bağırsak florası, nötrofiller ve makrofajlar tarafından önlenmektedir. Ancak antibiyotik tedavisi sırasında bağırsak florasının yok edilmesi, ya da T hücresi aktivitesini azaltan ilaçların kullanımı sonucu immun sistemin baskılanması nedeniyle normalinden çok daha az sayıda *L. monocytogenes*'in infeksiyon oluşturabileceği bildirilmiştir. Yapışma proteinleri ile bağırsak epitel hücresine tutunan *L. monocytogenes* için en uygun yerler peyer plaklarıdır. *L. monocytogenes*'ler peyer plaklarında hızla çoğalır, lenfatik sistem aracılığı ile dentrik hücreler ve makrofajlar içinde mezenterik lenf yumrusuna gelirler. Kan yoluyla da karaciğere, dalağa, plasentaya ve merkezi sinir sistemine yayılır (29, 113).

1.5.3.2. Sinir Sistemine İnvazyon

Normal bakterilerin, birbirine sıkıca bağlı epitel hücrelerinden oluşan ve hemostaz ile destekli beyin ve spinal kord bariyerine penetrasyonu çok zordur. Ancak *L. monocytogenes*'ler kan yolu ile beyine gelen, infekte makrofajlar aracılığıyla beyin mikrovasküler endotel hücrelerini istila edebildikleri gibi, bu endotel hücrelerinde çoğalabilir ve komşu hücrelere de yayılabilir. *L. monocytogenes*'lerin sinir aksonları boyunca ilerleyerek veya periferden duyusal sinir hücreleri boyunca ilerleyerek, merkezi sinir sistemine gelebileceği de bildirilmiştir (29, 113).

1.5.3.3. Uterus ve Fötusa İnvazyon

Makrofajlar içerisinde plasentaya gelen *L. monocytogenes* endotel hücrelerini infekte ettiği gibi, amniyon sıvısını aşarak fötusu da infekte eder. Listerial infeksiyonun sonunda prematüre doğumlar ya da fötus ölümleri gerçekleşebilir. Doğum kanalında bulaşan infeksiyonlarda sepsis ve meningitis şekillenebilir (29, 113). Gebe farelerde yapılan çalışmalar ise, infeksiyonun gebeliğin 14. gününe kadar oluşmasının daha olası olduğu ve şiddetinin daha etkili olduğu, öyleki bu dönemlerdeki infeksiyonların, abortlara ve ensefalitisten ölümlere neden olabileceğini göstermiştir (29, 113). Gebe

koyunlarda bakteriyemiden 24 saat sonra plesentaya ve fetusa invazyon gerçekleşir. İnvazyondan 5-10 gün sonra abort şekillenir ve sonuç olarak metritis şekillenebilir (84). İnsanlarda ise gebeliğin son 3 ayındaki infeksiyonların düşükle sonuçlanmasının, ilk 6 ayındaki infeksiyonlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir, ama bunun ilk 6 aylık dönemdeki düşüklerin mikrobiyolojik analizlerinin yapılmamasına bağlı olduğu düşünülmektedir (29, 113).

1.6. Semptomlar

Listeriozis, meningoensefalitis, abort ve septisemi gibi üç temel formu bulunan zoonoz bir hastalıktır (8, 13, 60, 84, 114, 115). Hastalığa yakalanan hayvanlarda bu formlardan genellikle sadece birisi görülür. Bunlardan başka *L. monocytogenes*'le ilişkili mastitis, myelitis, iritis ve/veya keratokonjuktivtis olmak üzere üç önemli formu daha vardır (33).

1.6.1. Meningoensefalitis

Erişkin ruminantların merkezi sinir sisteminin en çok görülen bakteriyel infeksiyonu olan listeriozisin, en yaygın olarak görülen formu meningoensefalitistir. İnkubasyon periyodu 2-6 hafta kadardır (13, 84). Klinik görünüm erişkin ruminantlarda aynı olmasına rağmen, sığırlarda hastalığın süresi 1-2 haftadan daha uzun sürebilir (33). Hayvanlarda paralizler şekillenebileceği gibi hastalığın erken dönemlerinde durgunluk, hareket bozukluğu, ateşlenme, çevresine karşı ilgisizlik ve sürüden ayrılmalar gözlenebilir. Dönme hastalığı olarak isimlendirilen bu form görülen hasta hayvanlarda, yürüyüş esnasında dairesel hareketler ve sendeleme görülür (13, 33, 46). Meningoensefalit formunda ölümler solunum kolapsından şekillenir. Morbidite oranı düşük olmasına rağmen mortalite oranı genellikle yüksektir (33).

Hastalıktan etkilenmiş hayvanların beyinlerinde, genellikle göze çarpmayan lezyonlar vardır. Meninkslerde grimsi-beyaz odaklar bazen fark

edilebilir. Mikroskobik lezyonlar daima pons, medulla ve spinal kortun ön tarafında sınırlıdır. Beyin substansında ve bazen de meninkslerde, listerial ensefalitis için tipik olan fokal nekroz ile perivasküler bir kuşak göze çarpabilir. Bu alan içerisinde mononüklear hücreler, ödem, hemoraji ve nöron dejenerasyonu vardır. Perivasküler kuşakta olmasa da lezyonun içinde Listeria etkenleri görülebilir (33).

1.6.2. Abort

İnkübasyon periyodu 5-12 gündür (13, 84, 101). Etken çoğunlukla *L. monocytogenes* olmakla birlikte, *L. ivanovii*'nin de abortlara sebep olduğu bildirilmiştir (13, 101). Listerial abortlar sığırlarda genellikle sporadiktir. Listerial abort salgınları genellikle koyun ve keçilerde görülür. Abort gebeliğin her döneminde görülebilse de çoğunlukla gebeliğin son üç aylık evresinde daha yaygın görülür. Klinik belirtiler aniden ortaya çıkar. Listerial abortların insidensi %15'lere kadar çıkabilir. Canlı doğan yavruların hayatta kalma ihtimalleri çok zayıftır (33).

Abort gebeliğin son üç ayının erken döneminde meydana gelmiş ise, plasenta bakterilerce işgal edilir ve fötus septisemiden ölür. Ölü fötusun dışarı atılamaması durumunda, bakterilerin oluşturduğu lezyonları otolitik değişiklikler örter. Çoğunlukla fötal membranların atılamaması ile sonuçlanan bir metritis oluşur (33, 38, 84). Abort son döneme yakın meydana gelmiş ise, canlı doğum gerçekleşse de yaşaması çok zordur.

Atık fötusta lezyonlar çok belirgin olmasa da, karaciğerde küçük noktamsı sarı odaklar görülür. Benzer odaklar kalp, böbrek, dalak ve beyinde de mikroskobik olarak görülebilir (33).

1.6.3. Septisemi

Özellikle kuzularda ve genç hayvanlarda görülür. Ateş, iştahsızlık ve bitkinlik görülür. Bazı hayvanlarda diyarede şekillenebilir. Septisemi durumlarında mikroorganizma bütün vücuda yayılmış durumdadır (7, 8, 84). Yeni doğan kuzular intrauterin olarak infeksiyona yakalanırlar, lezyonlar

karaciğerde iğne ucu şeklinde grimsi beyaz nodüllerden oluşan fokal hepatik nekrozlardan oluşur. Bu lezyonlar dalakta da görülebilir. Septisemi durumunda hayvanlar yere yatarlar ve bunu takiben 1-7 gün içerisinde ölürler (13).

Hayvanlarda infeksiyon, aynı veya farklı cins infekte bir hayvanla direkt temasla oluşabileceği gibi enfekte hayvanların dışkı, idrar, atık fötus, uterus akıntısı ve benzeri materyallerle temasla da oluşabilir. Çoğu listeriozis vakaları kontamine yemlerin alınmasıyla, özellikle kalitesiz silajla beslenme nedeniyle meydana gelir. Özellkle kuzularda septisemik listeriozis kongenital olarak yada kontamine süt ile beslenme veya kontamine kirli memeden beslenme ile oluşur (84).

Keratokonjuktivitis ve/veya iritis genellikle tek taraflı şekillenir, kışın silajla beslenen hayvanlarda oluşur ve etkenle bulaşık silajla direk temasla ilişkili olduğu düşünülmektedir (13, 33).

İnsanlara bulaşmada mastitis vakaları önemlidir. Subklinik ve klinik mastitislerin tedavisi çok uzun bir süreci kapsar. Bu süre zarfınca hasta hayvanlar etkeni çevreye yaymaya devam ederler (13).

1.7. Teşhis

Listeriozisin teşhisinde kültürel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyon yapılabileceği gibi, serum aglütinasyon testi, komplement fikzasyon testi ve daha duyarlı olduğu bildirilen ELISA gibi serolojik testlerden de yararlanılmaktadır (33, 36, 54, 55, 60, 67). Flow Cytometric Metodu (28), Rapid Screening Test (40) ve son zamanlarda PCR tekniği de teşhis amacı ile kullanılmaktadır (18, 19, 59).

1.7.1. İzolasyon Yöntemleri

Listeria'ların izolasyonunda kullanılan 4 farklı yöntem vardır. Bunlar, soğuk zenginleştirme yöntemi, FDA (Food and Drug Administration) yöntemi, USDA (United States Department of Agriculture) yöntemi, ve ISO (Uluslararası Standartlar Organizasyonu) yöntemidir.

1.7.1.1. Soğuk Zenginleştirme Yöntemi ile Araştırılması

Bu yöntemde 25 gr/ml gıda örneği 225 ml zenginleştirme brothuna ilave edilir. Homojenize edilen süspansiyon buzdolabında +4°C'de muhafaza edilir ve besiyerlerine her gün ekimler yapılarak izolasyon sağlanmaya çalışılır (51, 60).

1.7.1.2. Food and Drug Administration (FDA) Yöntemi ile Gıdalardan *Listeria* spp.'nin Araştırılması

Bu yöntemde 25 gr/ml gıda örneği, içerisinde supplement olmayan, 225 ml Listeria Enrichment Broth içerisinde iyice homojenize edilerek 30°C'de 4 saat inkübe edilir. Daha sonra supplement katılarak, toplamda 48 saat olacak şekilde inkübasyon devam eder. İnkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde tercih edilen besiyerlerine ekimler yapılarak, 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır (71).

1.7.1.3. United States Department of Agriculture (USDA) Yöntemi ile Gıdalardan *Listeria* spp.'nin Araştırılması

Alınan 25 gr/ml gıda örneği, öncelikle 225 ml UVM I Broth'una ilave edilerek 30°C'de 24 saat inkübe edilir. Daha sonra ön zenginleştirme brothundan 0.1 ml alınarak, tam konsantre supplement içeren 10 ml Fraser Broth besiyerine ilave edilerek 30°C'de 24 saat daha inkübe edilir. Tercih edilen besiyerlerine ekimler yapılarak, 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır (60, 71, 111, 112).

1.7.1.4. Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) Tarafından Önerilen Yöntem ile Araştırılması

Alınan 25 gr/ml gıda örneği, öncelikle yarı konsantre supplement içeren 225 ml ön zenginleştirme Fraser Broth'una ilave edilerek 30°C'de 24 saat inkübe edilir. Daha sonra ön zenginleştirme brothundan 0.1 ml alınarak, tam konsantre supplement içeren 10 ml Fraser Broth besiyerine ilave edilerek 30°C'de 24 saat daha inkübe edilir. Tercih edilen besiyerlerine ekimler yapılarak, 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır (71).

Diğer mikroorganizmalar ile yoğun kontamine materyallerde ve gıdalarda Listeriozis etkenlerinin izolasyonu amacıyla zenginleştirme yöntemi tercih edilmektedir (12, 51, 57, 58, 91). Gıda maddelerinden ve çevresel örneklerden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için, hasarlı *L. monocytogenes*'leri onarıcı bir ön zenginleştirme ve selektif brothlarla desteklenmiş zenginleştirmeler gerekmektedir. Bunun içinde son zamanlarda kullanılan brothlar ve besiyerleri, selektiviteleri ve zenginleştirme özellikleri bakımından geliştirilmektedirler. İzolasyonda kullanılan besiyerleri ve zenginleştirme brothları iyi analiz edilerek en uygunları tercih edilmelidir (25). Yeni zenginleştirme yöntemleri geliştirilinceye kadar soğuk zenginleştirme (12, 51), yoğun kontamine gıdalardan *L. monocytogenes*'in izolasyonu için standart yöntem olarak kabul ediliyordu. Pini ve Gilbert yumuşak peynirlerde soğuk zenginleştirme ve modifiye FDA yöntemini karşılaştırdığı çalışmasında, iki yönteminde aynı oranda izolasyon sağladığını, fakat çiğ tavuk örnekleri ile yaptıkları çalışmada FDA yönteminin çok daha fazla izolasyon sağladığını gözlemlemişlerdir (85).

L. monocytogenes'in süt, silaj, enfekte doku örneklerinden, kontamine diğer bakterilerin aşırı üremesi nedeniyle bilinen geleneksel yöntemlerle izolasyonu oldukça zor ve zaman alıcıdır (50). Oysa Flow Cytometric Metodla, süt örneklerinden hızlı ve güvenilir bir şekilde tespiti yapılmıştır. Ayrıca diğer gıda örneklerinden ve klinik laboratuvarlarında hasta kanlarından, spinal sıvı ve başka örneklerden *L. monocytogenes*'in tespitini hızlı ve güvenli bir şekilde sağlayacağı bildirilmektedir (28).

Gıda ve çevresel örneklerden düşük sayıdaki *L. monocytogenes*'in izolasyonu için brothta zenginleştirme tercih edilmektedir. Birkaç yıl öncesine kadar Gray ve arkadaşları tarafından geliştirilen soğuk zenginleştirme (51) yöntemi uygulanan tek yöntemdi. Bu yöntemde selektif supplement ilave edilmeksizin nutrient brotha numunelerden inokulumlar yapılır ve 4°C'de uzunca bir süre tutulurdu. Bu yöntem infekte hayvan ve insan dokularından izolasyon için kullanıldı. Fakat süt ve silaj örneklerinden izolasyon için bu yöntemin uygun olmadığını gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, brothdan izolasyon için aylarca ve hatta bir yıla varabilen inkubasyon süresine ihtiyaç duyulmasıdır (25). Zenginleştirme brothlarına acriflavin, nalidixic asit, NaCl ve diğer bazı kimyasal maddeler ilave edilerek yapılan izolasyonlarla, süre sadece günlerle ifade edilebilecek kadar düşürülmüştür. Çok sayıda araştırıcı, farklı kimyasal madde kombinasyonlarını kullanarak elde ettikleri modifiye enrichment brothlar vasıtasıyla *L. monocytogenes*'in izolasyonunda avantajlar sağlamayı başarmışlardır (25). Bununla beraber selektif besiyerlerinde inhibitör kimyasal maddelerin gereksiz yere kullanılmaları, oldukça hassas bazı *Listeria* spp.'lerin üremesini yavaşlatabilir veya engelleyebilir (25). Besiyerlerinin 37°C'de inkubasyonu antibiyotiklere karşı hassasiyeti artırabileceği için, 30°C'de inkubasyon tercih edilmelidir (27).

Listeria cinsinin direkt izolasyonunda başarılı sonuçlar elde edilememiş, buda araştırmacıları yeni yöntemler geliştirmeye teşvik etmiştir. Listeria cinsi bakterilerinin 4°C'de üreme özelliğinden yararlanılan soğuk zenginleştirme yöntemi başarı ile uygulanmasının yanı sıra, 2-3 ay gibi çok uzun bir inkübasyon süreci nedeniyle daha kısa bir zaman periyodu isteyen FDA yöntemi geliştirilmiş ve araştırıcılar tarafından tercih edilmeye başlanmıştır. Soğuk zenginleştirme yönteminde, 4°C'de zenginleştirme brothundaki inkübasyon, diğer mikroorganizmaların üremelerini baskılayarak, Listeria cinsi bakterilerin üremeleri için uygun ortam sağlar (30, 51, 57). FDA yönteminde ise Listeria Enrichment Broth'a ilave edilen acriflavine HCl, nalidixic acid ve cycloheximide gibi kimyasal maddeler Listeria cinsi bakteriler dışındaki bakterilerin üremesini baskılar, böylece soğuk zenginleştirme ile

yakın oranlarda ve 5-6 gün gibi çok daha kısa sürede izolasyon sağlanmış olur (43, 91).

Hayes ve arkadaşları Listeria cinsi bakteriler ile kontamine gıda maddelerinde, yaptıkları iki farklı zenginleştirme yönteminden USDA metodunun, soğuk zenginleştirme metodundan daha duyarlı bir izolasyon sağladığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada, USDA yönteminde 19 et örneğinin 18(%95)'inde, 10 kanatlı örneğinin 9(%90)'unda, 17 sebze örneğinin 17(%100)'sinde, 4 süt ürünü örneğinin 4(%100)'ünde izolasyon başarı ile yapılırken, soğuk zenginleştirme metodunda 19 et örneğinin 11(%58)'inde, 10 kanatlı örneğinin 5(%50)'inde, 17 sebze örneğinin 9(%53)'da, 4 süt ürünü örneğinin 4(%100)'ünde izolasyon başarısı sağlanmıştır. Ayrıca süt ürünlerinin sayısının çok az olması nedeniyle istatistiki analiz açısından değerlendirilmesinin anlamsız olacağı belirtilmiştir (57). Hayes ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada FDA, USDA ve the Netherlans Government Food Inspection Service (NGFIS) zenginleştirme metodlarını karşılaştırmışlardır. Toplam 889 numunenin analiz edildiği çalışmada, numunelerin 121'inden en az bir yöntemle *L. moncytogenes* izole etmişlerdir. Bu 121 numunenin 56'sından her üç yöntemle de (%46.3), izolasyon sağlanmıştır. Üç yöntemin sensitivitesi karşılaştırıldığında, USDA'nın %74, NGFIS'ın %74 ve FDA'nın %65 sensitiviteye sahip olduğu görülmektedir. FDA yönteminin izolasyon oranı süt ürünlerinde çok az olmasına karşın, diğer gıda maddelerindeki izolasyon oranlarında çok büyük istatistiki fark yoktur. Yapılan çalışmada tek bir zenginleştirme yöntemi ile %75'in altında başarı sağlanırken iki zenginleştirme yöntemi kullanıldığında bu oran %91 olduğu ve dolayısıyla daha iyi sonuç vereceği görülmektedir (58). Çalışmada Modifiye Oxford agar ile Lithium chloride phenylethanol moxalactam agar (LPM) arasında çok belirgin bir fark olmadığı fakat LPM agarda daha fazla inhibitör madde bulunduğu için tercih edildiği belirtilmiştir (58). Lewis ve Corry gıdalardan *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* spp. türlerinin izolasyonu için kullanılan soğuk zenginleştirme ve modifiye FDA yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Süt ürünleri, et ürünleri ve sebzeden oluşan 57 hazır gıda örneği kullandıkları çalışmada, soğuk

zenginleştirme yönteminde 5 *L. monocytogenes* ve 2 *L. innocua* izole ederken, modifiye FDA yönteminde ise sadece 3 *L. monocytogenes* izole etmişlerdir. Yaptıkları başka bir çalışmada da 57 çiğ tavuk eti örneğinden soğuk zenginleştirme yöntemi ile 30 örnek Listeria pozitif bulunurken, FDA yönteminde sadece 3 örnek pozitif bulunmuştur. Bu iki çalışmada gıdalardan *L. monocytogenes* ve *L. innocua* izolasyonu için soğuk zenginleştirmenin FDA yönteminden daha başarılı olduğunu göstermektedir (70).

Otopsi materyallerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için soğuk zenginleştirme çok sık kullanılmaktadır. Ama bu yöntem çok yavaştır ve tam bir değerlendirme için en az altı haftaya ihtiyaç duyulur. The International Dairy Federation (IDF) yöntemi süt ve süt ürünlerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonu için kullanılmakta ve bir hafta gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmektedir. Yapılan çalışmada 69 otopsi örneği, *L. monocytogenes*'in izolasyonu için soğuk zenginleştirme ve IDF yöntemi ile incelenmiştir. IDF yöntemi ile bu örneklerin %27.5'inden *L. monocytogenes* izole edilirken, soğuk zenginleştirme yöntemi ile ancak %4.3 oranında izolasyon sağlanabilmiştir. Bu sonuçların ışığında IDF yönteminin soğuk zenginleştirme yönteminden daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (32).

Warburton ve arkadaşları yaptıkları çalışmada FDA yöntemi ile USDA yöntemini karşılaştırmışlar ve genel olarak USDA yönteminin daha başarılı sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada karşılaştırdığı besiyerlerinden Oxford agar ve LPM agarın, MMA agardan çok daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca FDA yönteminde 7 günlük inkubasyon yerine 2 günlük inkubasyonun tercih edilebileceğini bildirmişlerdir (109).

Chaudhari ve arkadaşları, USDA metodunda bazı modifikasyonlar yapmak suretiyle, geleneksel iki aşamalı zenginleştirme yöntemi yerine tek aşamalı zenginleştirme yöntemi kullanarak, bufalolardan aldıkları kan, et, dışkı, vajinal sıvap ve nazal sıvap örneklerinden Listeria'ların izolasyonu çalışmalarını yapmışlardır. Zenginleştirme brothu olarak, ceftazidime pentahydrate ilave edilmiş Modifiye University of Vermont-2 (MUVM-2) ve ekim yapılan besiyeri olarak Dominguez-Rodriguez izolasyon agarı (DRIA)

kullanılmıştır (23). Her bir dışkı, nazal sıvap ve vajinal sıvap örneklerinden 10 ml alınarak, 90 ml MUVM-2 zenginleştirme brothuna ilave edilmiş ve gece boyunca 37°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Gece boyunca inkubasyondan sonra, direkt olarak ekimler yapılan Dominguez-Rodriguez izolasyon agarları 37°C'de inkubasyona bırakılmış ve 48 saat sonra besiyerleri değerlendirilmeye tabi tutulmuştur (23). İdentifikasyon sonucunda, 125 vajinal sıvap örneğinden, 8'inde (%6.4) *Listeria* spp. İzole edildiği ve bunların 3'ünün (%2.4) *L. monocytogenes,* 1'inin (%0.8) *L ivanovii* olduğu tespit edilmiştir (23). Başka bir çalışmada vahşi hayvanlardan alınan 50 dışkı örneğine USDA yöntemi ile, University of Vermont Medium zenginleştirme brothunda iki aşamalı zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Besiyerlerinden Dominguez-Rodriguez izolasyon agar, PALCAM agar ve modifiye McBride Listeria agara ekimler yapılarak, dışkıların %16'sından *L. monocytogenes* izole edilmiştir (62).

Hindistan'da süt ineklerinden toplanan 2060 süt örneği ile yapılan çalışmada, Kalorey ve arkadaşları iki aşamalı USDA metodunu kullanarak Dominguez-Rodriguez izolasyon agara ve Ottaviani ve Agosti'nin Listeria Agarı'na (ALOA) ekimler yapmışlardır. İki yılı kapsayan bu çalışmada genel olarak 139 (%6.74) *Listeria* spp. izolasyonu sağlanmıştır. *L. monocytogenes* izolasyonu 105 (%5.1) olurken, *L. monocytogenes*'in en yüksek izolasyon oranı sonbahar aylarında %7.96 ve yaz aylarında %5.28 olurken, kış (%4.17) ve ilkbahar aylarında (%3.66) izolasyon oranları daha az olmuştur (63).

Mastitisli 169 inekten alınan 169 süt, 169 dışkı sıvabı, 165 kandan oluşan 503 örnek ve mastitisli 74 bufalodan alınan, 74 süt, 74 dışkı sıvabı, 74 kandan oluşan 222 örnek olmak üzere toplam 725 örnek Rawool ve arkadaşları tarafından patojenik *Listeria* spp. yönünden değerlendirilmiştir. Toplamda 243 mastitisli hayvandan alınan, 239 kan, 243 süt ve 243 dışkı sıvabı örneği değerlendirmeye alınmıştır. McClain ve Lee tarafından tanımlanmış USDA yönteminde bazı modifikasyonlar yapıldıktan sonra bu örneklere uygulanmıştır. Süt örneklerinden 10 ml alınarak direkt olarak 90 ml UVM-1 içerisine aktarılmış, kan örneklerinden 5 ml alınarak 50 ml UVM-1

içerisine aktarılmış, dışkı sıvapları ise 10 ml UVM-1 içerisinde ve 30°C'de gece boyunca inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra UVM-1'den 0.1 ml alınarak, 37.6 mg/l ceftazidime pentahydrate içeren UVM-2 içerisine ilave edilmiş ve tekrar gece boyunca 30°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Buradan Dominguez-Rodriguez izolasyon agara (DRIA) ekimler yapılarak 37°C'de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. Bu örneklerden 12 *Listeria* spp. izole edilmiş bunlarında 4'ü *L. monocytogenes* ve 1'i *L. ivanovii* olarak tespit edilmiştir. İnek dışkı sıvap örneklerinin 2'sinden ve süt örneklerinin 1'inden *L. monocytogenes* izole edilirken bufalo dışkı örneklerinin sadece 1'inden *L. ivanovii*, bufalo süt örneklerinden de sadece 1'inden *L. monocytogenes* identifiye edilmiştir. Sonuç olarak listerial infeksiyon ineklerde %0.60, bufalolarda %0.45 olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın genelindeki listerial infeksiyon oranı ise %0.55 olarak görülmektedir (89).

Evanson ve arkadaşları 'rapid screening test' dedikleri hızlı yöntemle, et ve süt ürünleri ve çevresel örneklerden toplam 935 *L. monocytogenes* pozitif örneklerin tamamında identifikasyon sağlamışlardır. Bu yöntem geleneksel sıvı medyum yerine agar temelli besiyerinin kullanıldığı özellikle *L. monocytogenes*'in identifikasyonunda hızlı ve %100 başarı sağlayan bir yöntemdir. Bu sistem 24 saat içerisinde, oksidaz, katalaz, ramnoz ve ksiloz fermentasyon ve CAMP reaksiyonun belirlenmesini sağlamaktadır. Ramnoz ve ksilozlu agar , TSAYE ve %5 koyun kanlı TSAYE'ın her biri 4 bölmeli petrinin herbir bölmesine dökülür. Ayrıca hareket muayenesini incelemek için 10 ml Brain Heart Infusion (BHI) Broth hazırlanır ve eş zamanlı ekimler yapılır. Ramnoz ve ksilozun fermentasyon testleri brothta ve katı besiyerinde benzer sonuçları vermektedir. Bu sistemde mannitol olmadığı için *L. murrayi* ve *L. grayi*'nin ayrımı yapılamamaktadır (40).

Erdoğan ve arkadaşları dışkı örneklerinden *L. monocytogenes*'i izole etmek için 4°C'de soğuk zenginleştirmeyi takiben 30°C'de selektif zenginleştirme ve katı selektif besiyerine ekimlerin yapıldığı 3 farklı aşamadan oluşan bir teknik optimize etmişlerdir. Örnekler 15 hafta boyunca Listeria Selektif Enrichment Broth (LSEB), Nutrient Broth (NB), tuzdan ibaret

brothlarda ve medyum kullanılmaksızın 4°C'de tutularak her hafta, 30°C'de 48 saat inkubasyondan sonra Listeria Selektif Agara (LSA) ekimler yapılmış ve 30°C'de 48 saat inkubasyondan sonra değerlendirilmiştir. Soğuk zenginleştirmenin 3. ve 7. haftalarında, *L. monocytogenes*'de %56 ve 61, *Listeria* spp.'de %72 ve 94 pozitiflik sağladığı belirlenmiştir. Soğuk zenginleştirmenin 3. ve 7. haftanın sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, sensitivitenin *L. monocytogenes*'de %94 ve *Listeria* spp.'de %100 olduğu görülür (35).

Busch ve Donnelly hasarlı *L. monocytogenes* ve *L. innocua*'ların canlandırılması için onarıcı bir zenginleştirme brothu geliştirmek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, magnezyum (Mg), demir (Fe), kalsiyum (Ca), mangan (Mn), yeast extract, pirüvat, katalaz, glukoz, laktoz, sükroz, eskulin, fruktoz, galaktoz ve mannozun hasarların onarılmasına katkısı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, en iyi onarıcı etkiyi Mg ve Fe elementlerinin sağladığı tespit edilmiştir. Onarım üzerine en büyük etkiyi sağlayan elementlerden oluşan Listeria Repair Broth (LRB) formüle edilmiştir. Hasarlı Listeria'ların tamamen onarılmaları için, LRB içinde 5 saat inkubasyonları yeterli olarak tespit edilmiştir. FDA enrichment broth, USDA'nın LEB, ve UVM enrichment brothların ise aynı süre içerisinde yeterince onarım sağlayamadıkları görülmüştür (20).

Araştırmacılar süt ve süt ürünlerinden Listeria türlerinin izolasyonu için çeşitli selektif besiyerlerini tercih etmişlerdir (58, 106). Gıda, çevresel ve klinik örneklerin, 1980'li yıllarla birlikte *L. monocytogenes* yönünden çok fazla incelenmeye başlanması ile teşhise yönelik hızlı sonuç veren yeni selektif besiyerlerine acil olarak ihtiyaç duyulmuş ve bu amaçla mevcut besiyerlerinin modifiye şekilleri geliştirilmiştir. Özellikle Oxoid formülasyonları olmak üzere, PALCAM agar ve Curtis ve arkadaşlarının klinik örneklerden *L. monocytogenes* izolasyonu için geliştirdikleri Oxford agarın (26), rutin kullanımlar için çok elverişli olduğu kabul görmüştür (87). Patojen Listeria'ların selektif besiyerlerinde direkt identifikasyonuna yönelik yapılan çalışmada, hemoliz zonunun Listeria Selective Medium (LSM, Oxford form.,

Oxoid, Curtis)'da diğer besiyerlerinden daha büyük ve belirgin şekillendiği ve tür düzeyinde tanımlamanın daha kolay olduğu görülmüştür (16). Gıdalardan *Listeria monocytogenes*'in izolasyonu için yapılan çalışmada, LMO (Lee Modified Oxford agar) 28 numuneden 15'inde (%54) izolasyon sağlayarak en iyi sonucu göstermiştir. Diğer besiyerleride LPM agar 55 numuneden 23'ünde (%42), modified McBride agar (MMcB) 30 numuneden 11'inde (%37), polymyxin B-acriflavin-lithium chloride-ceftazidime-aesculin-mannitol agar (PALCAM) 29 numuneden 10'unda (%34), izolasyon başarısı sağlamıştır (21). Tiwari ve Aldenrath, Oxford Agar (OA), LPM agar, Acriflavine Ceftazidime Agar (AC) ve Modifiye McBride Agarları (MMA), gıda ürünlerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonu bakımından karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Diğer besiyerleri ile karşılaştırıldığında,özellikle MMA besiyerinin çok bayağı olduğu, AC besiyerinin göreceli olarak etkili olduğu fakat bütün gıda ürünlerinde ve *L. monocytogenes*'in bütün suşlarında yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Bütün gıdalardan *L. monocytogenes* suş 286 ve serotip 4b'nin izolasyonunda LPM besiyeri ve OA besiyeri yaklaşık olarak aynı derecede etkilidir, fakat LPM besiyerinin *L. monocytogenes* serotip 3a'yı izolasyonu yetersizdir. Çalışmadaki bütün suşların izolasyonunda, OA besiyerinin devamlı olarak üstün olduğu ve daha yüksek izolasyon sağladığı tespit edilmiştir. Zenginleştirme brothundaki 1 günlük inkubasyonun yeterince başarılı olmadığı, daha iyi bir izolasyon için 2 günlük bir zenginleştirmenin zorunlu olduğu sonucuna varılmıştır (103).

Oxford Agar Besiyeri üzerinde üreyen Listeria türleri ve özellikle *Listeria monocytogenes* suşları, 24 saat sonra, siyah haleler ile çevrili 1 mm çapında siyah koloniler oluştururlar. Tipik kolonilerin çapları 24 saat sonra 2-3 mm kadar olur ve ortaları çökmüş olarak görülürler. Bazen 24 saatten önceki incelemelerde, karakteristik siyahlaşma gözlenmeyebilir. Ayrıca 24 saatten daha uzun sürelerde Staphylococcus türlerinin baskılanması artacağı gibi, bunların kolonileri sarı ve sıklıkla düzensiz şekilde gelişirler. Bazen 48 saat sonra hafif siyahlaşmalar olsa da, asla *Listeria monocytogenes* tarafından oluşturulan kadar şiddetli değildir. Difteroidler ve aerobik sporlu basiller siyah koloniler oluşturarak üreyebilirler ama bu kolonilerin ortası çökük değildir.

Oxford Agar Besiyeri'nin 1 ay uygun ortamda saklanması, selektivite ve verimliliğini çok az etkiler. Saklama 2 haftadan daha fazla olursa, besiyerindeki nem kaybı sonucunda *Listeria monocytogenes*'in büyümesinde hafif yavaşlama, biraz daha küçük kolonilerin oluşması ve daha az şiddette aesculin reaksiyonu gözlenebilir (26). Bütün Listeria türlerinde bulunan eskulinaz enzimi, PALCAM, Oxford, LPM ve MOX agarlarda bulunan eskulini demir iyonlu eskuletine parçalar. Buda koloniler etrafında siyahımsı-grimsi haleleri oluşturur (90). PALCAM, Oxford, LPM ve MOX agarlarda *L. innocua* ve diğer nonpatojen Listeria türleri, *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin üremelerini baskılamaktadır (90). *Listeria monocytogenes* ve *L. innocua*'nın Oxford Agar ve McBride Agar üzerinde üreme özellikleri benzerdir ve iyi ürerler. *L. seeligeri*'nin suşlarının çoğu bu agarlarda baskılanmaktadır. Yine az sayıdaki *L. ivanovii* ve *L. welshimeri* bu iki besiyerinde üreyemezler (26). Yapılan incelemelerde, Oxford Agar'da 194 Listeria kültüründen 192'si 24 saat içerisinde ürerken, 2 *L. monocytogenes* daha fazla sürede üremiştir (26). Oxford Agar'da sadece Staphylococcus türleri ürerken, McBride Agar'da bütün Gram-pozitif ve birkaç Gram-negatif bakteride üreyebilmektedir (26). Özellikle dışkı gibi klinik örnekler ve vajinal sıvap örneklerinden *L. monocytogenes*'in izolasyonunda, LSA ve LSEB'un birlikte kullanımının daha fazla izolasyon sağlayacağı bildirilmiştir (26). Uysal ve arkadaşları yaptığı çalışmada, LPM agar ve Oxford Selektif Agar besiyerlerini kullanmışlar ve her iki besiyerindeki izolasyon oranlarının aynı olduğunu bildirmişlerdir (105).

1.8. Tedavi

Listeriozisin tedavisi erken dönemlerde ümit vericidir, uzun periyotlu antibiyotik tedavisine cevap verir (84). Ensefalitik Listeriozis vakalarında tedavi çok zordur. Koyunlarda hastalık kısa ve şiddetli seyrettiği için, sığırlara göre tedavi daha zordur (33).

1.9. Korunma

Listerial infeksiyonlardan korunmada, en başta genel ve özel koruyucu tedbirler alınmalıdır. Hayvanların iyi bakım ve beslenmeleri sağlanmalı, sağlıklı hayvanların hastalarla olan irtibatı kesilmelidir. Hayvanlara silaj veriliyor ise, yem değişikliğine gidilmeli ve yemlerin kalitesi kontrol edilmelidir. Hayvan yemleri nem ve temizlik bakımından uygun depolarda saklanmalıdır. Yine altlık için kullanılan materyalin kalite ve uygunluğu kontrol edilmelidir (7, 8). Özellikle koyunlarda kullanılan ölü veya attenüe aşılarında hastalığın insidensini düşürebileceği bildirilmektedir (84). İnfeksiyon çıkan ahırlarda dezenfeksiyon uygulanır, atık fetus ve uterus akıntıları gömülürek veya yakılarak imha edilmelidir. İnfeksiyon kaynağı belirlenerek gerekli tedbirler alınmalı, portör olanlar sürüden ayrılarak dışarıdan kontrolsüz hayvan girişi önlenmelidir. Bunların yanı sıra çiftlik sahiplerinin, hayvan bakıcılarının, gıda ürünleri üretimi yapılan işletmelerin personelinin ve hatta veteriner hekimlerin seminerler düzenlenerek bilgilendirilmesi infeksiyondan korunma ve kontrolünde önemlidir (7, 8).

1.10. Amaç

Bu çalışma ile, Türkiye'deki mevcut 11 milyon baş sığırdan yaklaşık 400 bininin bulunduğu (65, 117) Kars Yöresi'nde, listerial infeksiyonların kültürel yöntemlerle ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmanın atık yapan sürülerden örneklemeler içermesi de abortlara sebep olan infeksiyonun, bölgedeki atıklarda durumu göstermesi açısından önemli olduğu kanaatindeyiz. Bununla birlikte 296 bin tonluk süt üretiminin, 285 bin tonunun inek sütünden sağlandığı yöremizde (117) süt, süt ürünleri ve diğer hayvansal gıdaların listerial infeksiyonlar açısından oluşturduğu risk durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

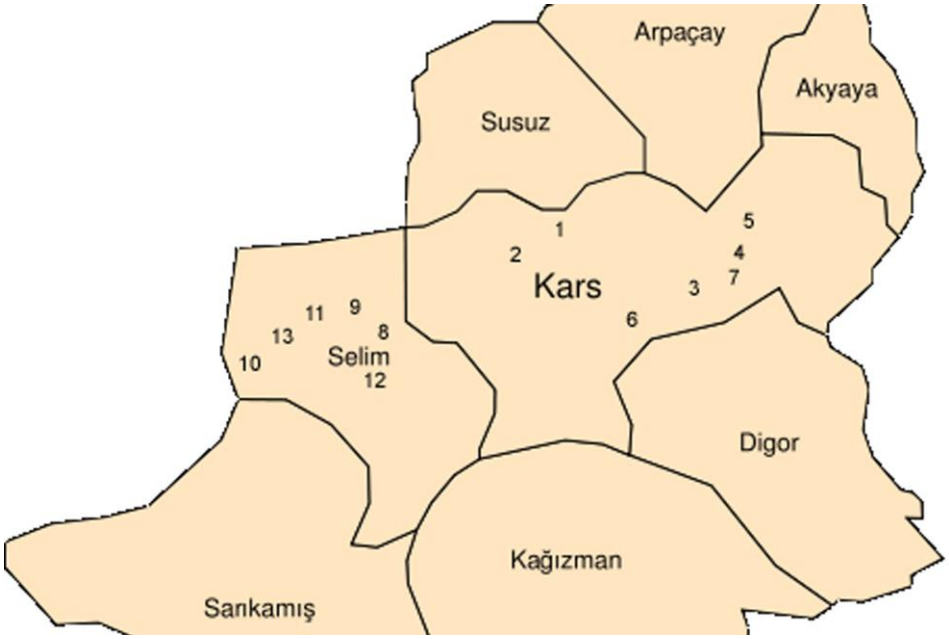
2. MATERYAL ve METOT

2.1. MATERYAL

2.1.1. Süt ve Vajinal Sıvap Örnekleri

Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2008 tarihleri arasında Kars Merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinden rastgele-tesadüfi örnekleme ile 250 inekten, 250 süt ve 250 vajinal sıvap olmak üzere toplam 500 örnek Listeria türleri yönünden değerlendirildi. Süt örnekleri sağımından önce, meme başları sabunlu bez ve alkol ile temizlenip, ilk sağım dışarı atıldı. Daha sonra steril vida kapaklı 50 ml'lik falkon tüplerine yaklaşık 40 ml süt alındı. Yine süt örneği alınan ineklerden steril sıvap ile 3 adet vajinal akıntı örneği alınarak içerisinde 5 ml Tryptose broth bulunan 10 ml'lik vida kapaklı tüplere konuldu.

Alınan süt ve vajinal sıvap örnekleri soğuk zincirde aynı gün içerisinde incelenmek üzere Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na getirildi. Örneklemelerin yapıldığı köylerin haritadaki yerleşim planı (Resim 1), köylerin şehir merkezine olan uzaklıkları (Tablo 4) ve hayvanların bazı özellikleri (Tablo 5) gösterilmiştir.



Resim 1 :Örneklemelerin yapıldığı köylerin haritadaki yerleşim planı

1- Boğazköy, 2- Çakmak, 3- Hacıveli, 4- Karakaş, 5- Külveren,

6- Ölçülü, 7- Subatan, 8- Bayburt, 9- Baykara, 10- Beyköy,

11- Darboğaz, 12- Selim/Merkez, 13- Sarıgün.

Tablo 4: Örneklerin Alındığı Köylerin Şehir Merkezine Uzaklıkları

Numune alınan yerler	**Şehir Merkezine Uzaklığı/km**
Kars /Boğazköy	10
Kars /Çakmak	6
Kars /Hacıveli	30
Kars /Karakaş	31
Kars /Külveren	36
Kars /Ölçülü	14
Kars /Subatan	28
Selim/Bayburt	37
Selim/Baykara	50
Selim/Beyköy	58
Selim/Darboğaz	50
Selim/Merkez	30
Selim/Sarıgün	54

Tablo 5: Örneklerin Alındığı Hayvanlara Ait Bazı Özellikler

Numunenin Alındığı Yer	Örneklenen Hayvan Sayısı	Örneklenen Hayvanların Yaş Aralığı	Hayvanların Irkı				Atığın Oluştuğu Periyot	Atık Yapan Hayvan Sayısı	Normal Doğum Yapan Hayvan Sayısı	Gebe Hayvan Sayısı
			Y	S	M	MLZ				
Kars /Boğazköy	30	1-5	6	1	14	9	5-7. ay	14	11	5
Kars /Çakmak	20	1-5	8	-	5	7	6-7. ay	5	7	8
Kars /Hacıveli	30	1-4	17	3	2	8	3-8. ay	8	12	10
Kars /Karakaş	20	1-5	4	-	10	6	5-8. ay	6	8	6
Kars /Külveren	20	1-4	3	2	11	4	4-7. ay	8	5	7
Kars /Ölçülü	20	2-5	5	-	8	7	5-8. ay	9	6	5
Kars /Subatan	20	2-4	14	-	-	6	5-7. ay	6	6	8
Selim/Bayburt	15	2-5	4	1	6	4	3-8. ay	4	7	4
Selim/Baykara	15	2-4	15	-	-	-	5-7. ay	5	6	4
Selim/Beyköy	15	1-3	15	-	-	-	6-7. ay	6	4	5
Selim/Darboğaz	15	2-4	15	-	-	-	5-7. ay	10	2	3
Selim/Merkez	15	1-3	2	4	5	4	5-6. ay	6	8	1
Selim/Sarıgün	15	1-4	15	-	-	-	5-8. ay	9	3	3
Toplam	**250**		**123**	**11**	**61**	**55**		**96**	**85**	**69**

Y: Yerli, **S:** Simental, **M:** Montofon, **MLZ:** Melez

2.1.2. Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan besiyerleri

Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar, üretici firmanın prosedürü dikkate alınarak ve bazı modifikasyonlar yapılarak hazırlandı.

2.1.2.1. Listeria Enrichment Broth Base (FDA/Oxoid CM862)

	gram/litre
Tryptone soya broth	30.0
Yeast extract	6.0
pH	7.3±0.2

Hazırlanması: Materyalde bulunabilecek Listeria cinsi bakterilerinin zenginleştirmesi amacıyla kullanıldı. Besiyerinden 18 g tartılarak üzerine 500 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutuldu ve vajinal sıvap örneklerinde kullanılmak üzere 10'ar ml tüplere dağıtıldı. Ayrıca süt örneklerinde kullanılmak üzere 225'er ml erlenmayerlere dağıtıldı.

Listeria selective enrichment supplement (Oxoid SR141)

	mg/ml
Nalidixic Acid	20.0
Cycloheximide	25.0
Acriflavine Hydrochloride	7.5
Distile su	2

Hazırlanması: Bir şişe içeriği 2 ml steril distile su içerisinde çözülerek, 500 ml'lik brotha ilave edildi.

2.1.2.2. Listeria Selective Agar Base (Oxford Agar/Oxoid CM856)

	gram/litre
Columbia blood agar base	39.0
Esculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Lithium chloride	15.0
pH	7.0±0.2

Hazırlanması: Besiyerinden 27.75 g tartılarak üzerine 500 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutuldu ve selektif supplement (SR140) ilave edilerek petri kutularına dağıtıldıktan sonra kullanılıncaya kadar +4^{o}C'de buzdolabında saklandı.

Listeria selective supplement (Oxoid SR140)

	mg
Cycloheximide	200.0
Colistin sulphate	10.0
Acriflavine	2.5
Cefotetan	1.0
Fosfomycin	5.0

Hazırlanması: Bir şişe içeriği 5 ml steril distile su/etil alkol karışımı içerisinde çözülerek, 500 ml'lik selektif agara ilave edildi.

2.1.2.3. Tryptic Soy-Yeast Extract Broth (TSYE Broth)

	gram/litre
Tryptic Soy Broth (Oxoid CM129)	30.0
Yeast Extract (Oxoid L219)	6.0
Distile Su	1.0
pH	7.3±0.2

Hazırlanması: Bir litre distile su içerisinde 30 gram Tryptone Soya Broth (TSB) ve 6 gram Yeast Extract (YE) eritilerek otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. süre ile steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutulup, pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı ve vida kapaklı tüplere 5'er ml dağıtılarak +4^{o}C'de buzdolabında saklandı. Listeria türlerinin identifikasyonu için yapılan testlerde kullanıldı.

2.1.2.4. Tryptic Soy-Yeast Extract Agar (TSYE Agar)

	gram/litre
Tryptic Soy Agar (Difco 0369-02-03)	40.0
Yeast Extract (Oxoid L219)	6.0
Distile Su	1.0
pH	7.3±0.2

Hazırlanması: Bir litre distile su içerisinde 40 gram Tryptone Soya Agar (TSA) ve 6 gram Yeast Extract (YE) eritilerek otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. süre ile steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutulup, pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı ve petri kutularına dökülerek +4^{o}C'de buzdolabında saklandı. Listeria türlerinin identifikasyonu için yapılan testlerde kullanıldı.

2.1.2.5. Blood Agar Base No.2 (Oxoid CM0271)

	gram/litre
Proteose peptone	15.0
Liver digest	2.5
Yeast extract	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0
pH	7.4±0.2

Hazırlanması: Bir litre distile su içerisine 40 g besiyeri ilave edilerek sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50^{o}C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 defibrine koyun kanı ilave edildi. Petrilere dağıtıldıktan sonra +4^{o}C'de buzdolabında saklandı. Besiyeri, Listeria türlerinin β hemoliz özelliklerini göstermede ve CAMP testinin yapılışında kullanıldı.

2.1.2.6. Semisolid İndol Motility Medium (SİM) (Oxoid CM435)

	gram/litre
Tryptone	20.0
Peptone	6.1
Ferrous Ammonium Sulphate	0.2
Sodium Thiosulfhate	0.2
Agar	3.5
Distile Su	1.0
pH	7.2±0.2

Hazırlanması: Bir litre distile su içerisinde 30 g besiyeri eritilerek otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. süre ile steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutulup, pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı ve vida kapaklı tüplere 5'er ml dağıtılarak +4^{o}C'de buzdolabında saklandı. Listeria türlerinin hareket özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

2.1.2.7. Christensen's Üre Agar (Oxoid CM0053):

	gram/litre
Peptone	1.0
Glucose	1.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	1.2
Potassium dihydrogen phosphate	0.8
Phenol red	0.012
Agar	15.0
pH	6.8±0.2

Hazırlanması: Listeria bakterilerinin üreaz aktivitelerini saptamak amacıyla kullanıldı. Besiyerinden 21 g tartılarak üzerine 1000 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutuldu ve içerisine steril % 40'lık üre solüsyonundan (Oxoid SR020) 5 ml ilave edilip, tüplere 5'er ml miktarında dağıtılarak katılaşması sağlandı. Kullanılıncaya kadar +4^{o}C'de buzdolabında saklandı.

2.1.2.8. Triple Sugar Iron Agar (Oxoid CM0277)

	gram/litre
'Lab-Lemco' powder	3.0
Yeast extract	3.0
Peptone	20.0
Sodium chloride	5.0
Lactose	10.0
Sucrose	10.0
Glucose	1.0
Ferric citrate	0.3
Sodium thiosulphate	0.3
Phenol red	0.024
Agar	12.0
pH	7.4±0.2

Hazırlanması: Listeria bakterilerinin H_2S aktivitelerini saptamak amacıyla kullanıldı. Besiyerinden 64.6 g tartılarak üzerine 1000 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutuldu ve petri kutularına dağıtılarak +4^{o}C'de buzdolabında saklandı.

2.1.2.9. OF Basal Medium (Merck 1.10282)

	gram/litre
Peptone from casein	2.0
Yeast extract	1.0
Sodium chloride	5.0
di-Potassium hydrogen phosphate	0.2
Bromothymol blue	0.08
Agar	2.5
pH	7.1±0.2

Hazırlanması: Listeria bakterilerinin karbonhidrat aktivitelerini saptamak amacıyla kullanıldı. Test edilecek her bir şeker için ayrı ayrı olarak hazırlandı. Besiyerinden 11 g tartılarak üzerine 1000 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121^{o}C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50^{o}C'ye kadar soğutuldu ve içerisine test edilecek şekerin % 10 luk solüsyonundan 100 ml ilave edildi. Tüplere 5'er ml miktarında dağıtıldı. Kullanılıncaya kadar +4^{o}C'de buzdolabında saklandı.

2.1.3. Referans Suşlar: Listeria cinsine ait türlerin biyokimyasal identifikasyon testleri ve PCR analizlerinin yapılması sırasında kullanılan *L. monocytogenes* ATTC-7644, *R. equi* ATCC-33701 ve *S. aureus* ATCC-25923 suşları Etlik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden, *L. monocytogenes* ve *L. innocua* TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. *L. ivanovii* tip 5 SLCC 2379 Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.1.4. İzole edilen Listeria türlerinin PCR temelli moleküler tanısı için kullanılan araç ve gereçler

- Taq DNA Polimeraz (Sigma D-6677)
- 10X PCR Buffer (Sigma P-2192)
- 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas)
- 10 mM dNTP Mix (Fermentas)
- Proteinaz K (Sigma P2308)
- Agaroz (Prona)
- Gene Ruler 1 kb DNA Step Ladder Plus Marker (Fermentas SM 0311)
- Ethidium Bromide (Sigma E7637)
- Loading dye (6x) (Fermentas R0611)
- Etanol Absolut (Merck 1.00983)
- Primerler :

Lis1A; 5'-ATG AAT ATG AAA AAA GCA AC-3' (forward)

Lis1B; 5'-TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC-3' (revers)

2.2. METOT

2.2.1. Süt ve vajinal sıvap örneklerinden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu

2.2.1.1. İzolasyon

Süt ve vajinal sıvap örneklerinden etken izolasyonu Lovett ve Hitchins'inde (1988) önerdiği FDA yöntemine göre yapıldı.

Süt Örneklerinden İzolasyon

Her örnekten 25 ml alınarak, 225 ml zenginleştirme brothu bulunan erlenmayerlere steril olarak konuldu. Daha sonra 30^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 24 ve 48 saat sonra zenginleştirme brothlarından LSA Besiyerine ekimler yapılarak 30^{o}C'de 24 saat inkübe edildi (43, 53, 71, 109).

Vajinal Sıvab Örneklerinden İzolasyon

Tryptose broth içerisinde taşınarak laboratuvara getirilen vajinal sıvaplar deney tüplerinde bulunan 10 ml zenginleştirme brothuna aktarıldı. Daha sonra 30^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 24 ve 48 saat sonra zenginleştirme brothlarından LSA Besiyerine ekimler yapılarak 30^{o}C'de 24 saat inkübe edildi (43, 53, 71, 109).

2.2.1.2. İdentifikasyon

Süt ve vajinal sıvap örneklerinin ekim ve inkübasyonunu takiben, besiyerinde üreyen pürüzsüz, yuvarlak ve merkezi parlak gri-siyah renkte görülen koloniler Listeria şüphesi ile TSA-YE besiyerine azaltma yöntemi ile ekildi ve 30^{o}C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda

üreyen kolonilere Henry İluminasyon tekniği, Gram boyama yöntemi, hareket muayenesi ve katalaz testleri uygulandı. Tüm testlerde kontrol amacıyla referans suşlarda kullanıldı.

Henry İluminasyon Tekniği

Beyaz bir ışık kaynağından 45^{o} açı ile gelen ışık bir ayna yardımı ile TSA-YE plağına alttan yansıtılarak aydınlatıldı. Işığın yansıması sonucu düzgün kenarlı, yuvarlak, merkezi mavi-yeşil renkli şeffaf görülen koloniler Listeria şüpheli olarak kabul edildi (87).

Gram Boyama

Listeria şüphesi bulunan koloniden, öze ile bir miktar alınarak, temiz bir lam üzerinde fizyolojik tuzlu su içerisinde yayıldıktan sonra kurutuldu. Alevden geçirilmek suretiyle tespit edildi. Kristal viole ile 2.5 dakika, lugol solüsyonu ile 1 dakika boyandı. Absolut alkolle dekolerize edildikten sonra sulu fuksin ile 30 saniye muamele edilerek gram boyama yapıldı (6). Preparatlar ışık mikroskopta immersiyon objektifte incelendi. Gram pozitif, kısa basil şeklinde görülen koloniler Listeria şüpheli olarak tespit edildiler (Resim 2).

Hareket Muayenesi

Şüpheli kolonilerden alınarak TSYE broth besiyerine ekim yapılarak, 25°C'de 24 saat inkübe edildi. Buradan alınan bir damla lam-lamel arası yöntemle incelendi. Takla ve dönme hareketleri görülen bakteriler hareketli olarak değerlendirildiler. Bununla beraber aynı izolatlar SİM medium yarı katı besiyerine iğne uçlu öze ile dik olarak ve besiyerinin tam ortasına gelecek şekilde ekildiler ve 25°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakıldılar. İncelemelerde gaz ve kararma oluşturmayan, şemsiye şeklinde veya ters çam ağacı şeklinde olan üremeler hareket yönünden pozitif kabul edildi (87).

Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerine öze yardımı ile alınan bir damla %3'lük H_2O_2 solüsyonu içerisine şüpheli koloni karıştırılarak gaz oluşumu yönünden incelendi. Birkaç saniye içerisinde kabarcık tarzında gaz oluşumu test yönünden pozitif olarak kabul edildi (6).

Triple Sugar Iron Agar Testi (TSI)

Tüplerde yatık olarak hazırlanan TSI agara izolatlar iğne öze ile besiyerinin hem dip kısmına hem de yatık yüzeyine ekildi ve 30^{o}C'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda asitlik, gaz ve H_2S oluşumu incelendi. Dipte ve yatık yüzeyde asit oluşumu Listeria yönünden pozitif olarak değerlendirildi (6).

İndol Testi

İzolatlar TSB-YE brotha ekildi ve 24^{o}C'de bir gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 0.5 ml Kovacs ayıracı tüplere ilave edilerek tüp hafifçe karıştırıldı. İndolün varlığında besiyerinin üst kısmında kırmızı renk oluşmakta yokluğunda ise sarı renk meydana gelmektedir. Listeria'lar indol negatif olduğu için sarı renk oluşması pozitif olarak değerlendirildi (6).

Üreaz Testi

Tüplerde yatık olarak hazırlanan üre agar besiyerinin yüzeyine izolatlar iğne öze ile ekildi ve 30^{o}C'de 24-48 saat inkübe edildi. Besiyerinin normal rengi olan pembenin kırmızıya dönüşmesi ürenin üreazla indirgendiğini gösterdi. Rengin kırmızıya dönüşmemesi ise üreaz enzimi açısından negatif olarak değerlendirildi (6).

İdentifikasyon Testleri

İdentifikasyon amacıyla yapılan tüm testler Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'e göre yapıldı (98).

CAMP Testi

CAMP testinde kullanmak için, bahsedilen avantajları nedeniyle koyun kanını tercih ettik. *S. aureus*, *R. equi*, referans suşlar ve izolatlar, hatalı sonuçlara neden olmamak için, iyice saflaştırıldıktan sonra CAMP testi yapılarak değerlendirildi.

Kanlı agar (%7 koyun kanı) besiyerine yatay ve birbirine paralel olarak *S. aureus* ile *R. equi* çizgi şeklinde ekildi. Daha sonra bu paralel çizgilerin arasına onlara değmeyecek şekilde dikey olarak testi yapılacak izolatlar ve referans suşlar ekildi. Petri kutuları 30^{o}C'de 24 saat inkübe edildi (24, 87). Yatay ve dikey çizgiler arasında oluşan hemoliz zonları referans suşlar ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *L. monocytogenes*'in oluşturduğu hemoliz zonu *S.aureus* çizgisinin yakınında ve mızrak başı şeklinde genişledi (Resim 3).

Karbonhidrat Fermentasyon Testi

İzolatların tümüne ayrı ayrı şeker fermentasyon testi uygulandı. OF Basal Medium tüplerde hazırlanarak içerisine filtre ile steril edilmiş glukoz, mannitol, ksiloz ve ramnozdan oluşan şekerler ilave edildi. İzolatlar bu tüplere ekildi ve 30^{o}C'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi içerisinde besiyerinin normal rengi olan mavi-yeşilin sarıya dönüşmesi ilgili şeker yönünden pozitif kabul edildi (6).

2.2.2 İzole edilen Listeria türlerinden DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için klasik kloroform ekstraksiyon yöntemi (93) modifiye edilerek kullanıldı.

Kloroform ekstraksiyon yöntemi

1. TSA-YE'da üretilen her izolattan bir öze dolusu alınarak 200 µl FTS içeren ependorflara konuldu ve süspanse edildi.

2. Üzerine 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilip hafifçe karıştırıldı.

3. Daha sonra 400 µl NaCl-EDTA-Tris-Na dodecylsulfate (NETS) lizis tampon solüsyonu eklendi.

4. Karışım hafifçe vortekslenerek 65^{o}C'de 15 dk. blok ısıtıcıda inkübe edildi.

5. İnkübasyondan sonra hafifçe vortekslenip, üzerine 600 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 oranında) ilave edildi.

6. Her bir gode 15 sn. kuvvetlice vortekslendi.

7. Sonra godeler 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.

8. Üstteki berrak kısım (süpernatant) yeni bir steril ependorfa alındı.

9. Üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm -20^{o}C'de saklanan absolüt alkol ilave edilerek vortekslendi ve gece boyunca -20^{o}C'de bekletildi.

10. Ertesi gün 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Böylece presipite olan DNA pelet haline geldi.

11. Üstteki sıvı pelete zarar verilmeden boşaltıldı.

12. Sonra ependorflara -20^{o}C'de saklanan % 70'lik etanoldan 1 ml eklendi.

13. Vortekslendikten sonra 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.

14. Pelete zarar vermeden alkol boşaltıldı ve ependorflar kuruması için oda ısısında 20 dk bekletildi. Kuruduktan sonra üzerine 100 µl distile su eklenerek vortekslendi ve kullanılıncaya kadar -20^{o}C'de saklandı.

Genomik DNA Konsantrasyonunun (miktarının) Tespiti ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

DNA ekstraksiyon işlemi sonrasında DNA bütünlüğünün kontrolü için örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek tespit edildi. Genomik DNA miktarının hesaplanmasında amaç DNA içeren distile suyun emdiği ultraviyole radyasyon miktarının spektrofotometre ile ölçülmesidir. DNA miktarı 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Spectramax Plus 384) absorbans ölçümü yapılarak belirlenirken, elde edilen genetik ürünün protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de ölçüm yapılarak tespit edildi. Kuvartz küvet içerisine referans olarak DNA'yı sulandırmada kullanılan distile su konuldu. 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbans ölçülerek elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete genomik DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm'de absorbans ölçüldü ve okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu. Absorbans ölçümü 280 nm için de aynı işlemlerle yapıldı. Örnekte, bir optik dansite (OD) yaklaşık olarak 50 µg/ml çift sarmallı DNA'nın bulunduğu kabul edilerek 260 nm ve 280 nm'de okunan değerlerin oranı (OD_{260}/OD_{280}) nükleik asidin saflığının ölçüsünü verdi. Çalışmada OD_{260}/OD_{280}= 1.8-2.0 olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (93).

DNA konsantrasyonu (µl/ml)= OD_{260} x 250 (seyrelme faktörü) x 50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi. İstenen konsantrasyon x İstenen hacim / Stok DNA konsantrasyonu (µl/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlandı. Bulunan değer stok DNA çözeltisinden alınması gereken miktarı verdi. Elde edilen değer 100 µl'den çıkartılarak hazırlanacak çalışma solüsyonu için alınması gereken distile su miktarı bulundu. Hazırlanan DNA çalışma solüsyonları kullanılıncaya kadar -20^{o}C'de bekletildi.

2.2.3. PCR İşlemi

Primerler: Protein p60'ı kodlayan *iap* geni (invasion associated protein) bütün Listeria türlerinde bulunmaktadır. Bunun için *iap* genini hedef alan primerler tercih edildi (18).

Lis1A; 5'-ATG AAT ATG AAA AAA GCA AC-3' (forward)

Lis1B; 5'-TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC-3' (revers)

1 ml dNTP (10mM) karışımı	**Kullanılacak miktar (µl)**
ANTP	100
TNTP	100
GNTP	100
CNTP	100
ddH_2O	600

iap Gen Amplifikasyonu

Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı.

Bir örnek için reaksiyon karışımı	**Kullanılacak miktar (µl)**
- ddH_2O	34.6
- PCR buffer	5
- $MgCl_2$	5
- dNTP (10 mM)	1
- Primer Lis 1A (50 pmol)	0.5
- Primer Lis 1B (50 pmol)	0.5
- Taq DNA polymeraz	0.4
- Templete DNA	3
- Toplam	**50**

PCR Cihazının (Thermal Cycler) Programlanması

Program başlangıç denatürasyonu 95^{o}C'de 5 dk. olmak üzere, 95^{o}C'de 15 sn. denatürasyon, 58^{o}C'de 30 sn. birleşme ve 72^{o}C'de 50 sn. ekstensiyondan oluşan 30 siklus ve 72^{o}C'de 10 dk. son ekstensiyondan oluşmaktadır (18, 19).

PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak amacıyla agaroz jel tekniği kullanıldı. Jelin hazırlanmasında ve tank tamponu olarak 1xTBE (Tris-Borik Asit-EDTA) kullanıldı. Agaroz jel (% 1'lik) için, 40 ml 1xTBE içeren bir balon joje içerisine 0.4 g agaroz (Prona Basica Le, PL 100g) tartılarak ilave edildi. Mikrodalga fırında homojen hale gelinceye dek ısıtıldı ve buhar çıkması durduktan sonra etidyum bromidten 4 µl eklendi. Hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırıldıktan sonra içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 20-25 dk beklenerek jelin donması sağlandı. Bu sırada etidyum bromidin aktivitesini yitirmemesi için hazırlanan jel gün ışığından korundu. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılarak içerisinde 1xTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi.

Jeldeki ilk çukura DNA marker'ı (Gene Ruler "1kb plus" MBI Fermantas) 1 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 1.5 µl 6x yükleme tamponu (Fermentas R0611), 5 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 80 volta ayarlanarak 1 saat yürütüldü. DNA fragman büyüklükleri UV illuminatörde (UVP/LMS-20E) görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. Süt örneklerinden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyon bulguları

Yapılan çalışmada 250 süt numunesi kültürel olarak değerlendirildi. Yapılan izolasyon ve identifikasyon sonucunda sadece 2 numuneden (%0.8) *L. monocytogenes* izole edildi. Sütlerinden *L. monocytogenes* izole edilen ineklerin ikisi de atık yapmıştı. Atık yapan 96 inekten, 2 (%2.1) *L. monocytogenes* izole edilmiş oldu. Süt örneklerinden *Listeria monocytogenes* izole edilen ineklerin vajinal sıvap örneklerinden izolasyon yapılamadı.

3.2. Vajinal sıvap örneklerinden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyon bulguları

Yapılan çalışmada kullanılan 250 vajinal sıvap örneğinin 14'ünden (%5.6) *Listeria* spp. izole edildi. Bunlarında 7'si (%2.8) *L. monocytogenes*, 3'ü (%1.2) *L. welshimeri*, 2'si (%0.8) *L. seeligeri* ve 2'side (%0.8) *L. innocua* olarak identifiye edildi. Atık yapmış 96 ineğin vajinal sıvap örneklerinin 8'inden (%8.3) *Listeria* spp. izole edilmiştir.

Toplamda atık yapmış 96 ineğin 10'undan (%10.4) *Listeria* spp. izole edilmiştir. İzolatların elde edildiği hayvanlara ait bazı bilgiler Tablo 6'da ve izolatlara ait bilgiler Tablo 7 ve 8'de gösterilmiştir.

3.3. PCR bulguları

PCR yöntemi ile 16 izolattan 27S, 14V, 19V, 242V ve 244V olmak üzere 5 izolatın ve referans suşların 1.6 kb bant oluşturdukları tespit edildi (Resim 4).

Tablo 6: İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

	4	14	17	19	27	32	90	130	143	178	183	236	241	242	244	250	*L.m*	*L. in*	*L. iv*
Gram boyama	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Not: 4 ve 27 nolu izolatlar süt izolatları, diğerleri vajinal sıvap izolatlarıdır. *L.m: L. monocytogenes*, *L. in*: *L. innocua*, *L. iv*: *L. ivanovii*

Tablo 7: İzolatların İdentifikasyon Sonuçları

	4S	14V	17V	19V	27S	32V	90V	130V	143V	178V	183V	236V	241V	242V	244V	250V	*L.m*	*L.in*	*L.iv*
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksiloz	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Ramnoz	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Hemoliz	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
S. aureus	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+	-	-	+	+	-	+	-	-
R. equi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Tür	***L. m***	***L. m***	***L. m***	***L. m***	***L. m***	***L. s***	***L. m***	***L. w***	***L. m***	***L. w***	***L. s***	***L. in***	***L. in***	***L. m***	***L. m***	***L. w***			

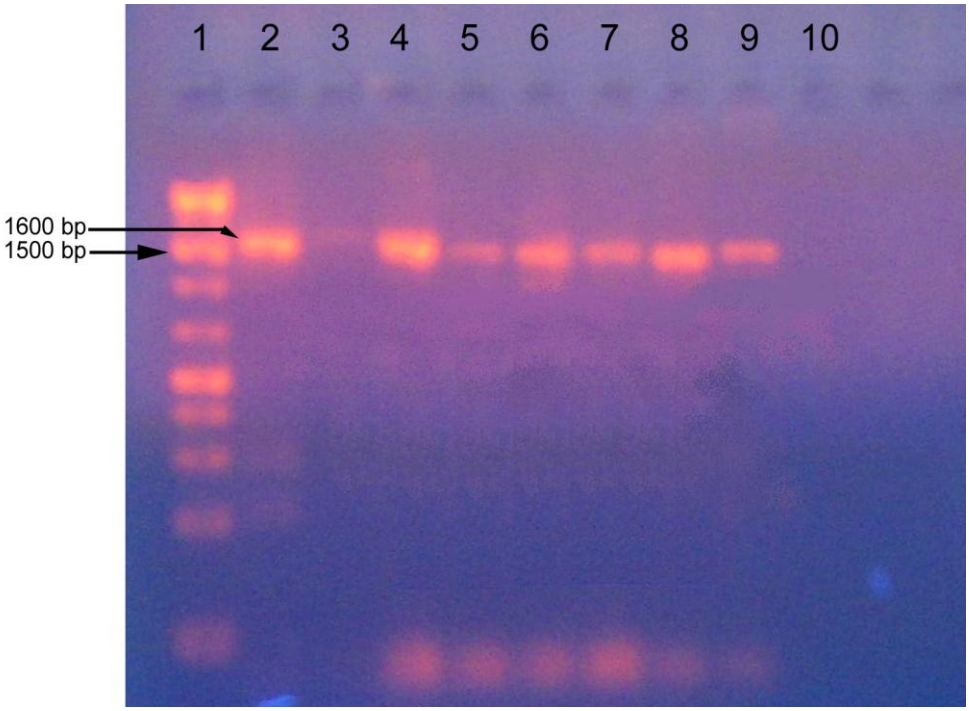
Not: 4S ve 27S nolu izolatlar süt izolatları, diğerleri vajinal sıvap izolatlarıdır. *L.m: L. monocytogenes*, *L. in*: *L. innocua*, *L. iv*: *L. ivanovii*, *L.s*: *L. seeligeri*, *L. w*: *L. welshimeri*

Tablo 8: İzolatların Elde Edildiği Hayvanlara Ait Bazı Bilgiler

No	Adresi	Irkı	Atık Durumu	Atık Zamanı\Ay
4S	Sarıgün\Selim	Yerli	+	7
14V	Baykara\Selim	Yerli	+	7
17V	Darboğaz\Selim	Yerli	+	6
19V	Darboğaz\Selim	Yerli	+	6
27S	Bayburt\Selim	Simental	+	4
32V	Merkez\Selim	Montofon	-	-
90v	Hacıveli\ Kars	Yerli	-	Gebe
130	Subatan\ Kars	Yerli	+	6
143V	Ölçülü\Kars	Montofon	+	6
178V	Boğazköy\Kars	Montofon	-	-
183V	Boğazköy\Kars	Montofon	+	7
236V	Çakmak\Kars	Yerli	-	-
241V	Çakmak\Kars	Montofon	-	-
242V	Çakmak\Kars	Montofon	-	Gebe
244V	Çakmak\Kars	Montofon	+	8
250V	Çakmak\Kars	Montofon	+	8

Resim 2: Gram pozitif Listeria kolonilerinin mikroskobik görünümleri

Resim 3: β hemolitik Listeria türlerinin kanlı agarda CAMP testi görünümleri



Resim 4: İzolatlara uygulanan *iap* gen bazlı PCR yöntemi ile saptanan Listeria DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

1 nolu sütun; 1 kb DNA step ladder plus marker

2-4 nolu sütunlar; referans suşlar

5-9 nolu sütunlar; izolatlar

10 nolu sütun; negatif kontrol

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Listeriozis, dünyanın birçok ülkesinde hayvan ve insanlarda sporadik ve endemik olarak görülen, infeksiyöz ve zoonotik bir hastalıktır (46). İnfeksiyon hayvanlarda septisemi, meningoensefalitis ve abort sonucu önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. İnfekte hayvanlardan elde edilen önemli bir besin kaynağı olan süt ve süt ürünlerinin tüketimiyle insanlara bulaşabilmektedir. Ayrıca diğer gıda kaynaklı patojenlerin aksine, buzdolabı ısısında etkenin çoğalabilmesi nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır (30, 57).

Kennerman ve arkadaşları Bursa Yöresi'nde yaptıkları *L. monocytogenes* antikor seroprevalans çalışmasında, silajla beslenen sığırların %57.5'luk seropozitiflik oranlarının silajla beslenmeyenlerin %18.3'lük seropozitiflik oranından istatistiki olarak daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (66). Abay ve Aydın tarafından 2003 yılında yapılan çalışmada, Sivas ili Gemerek ilçesinde bir süt sığırcılığı işletmesinde bulunan sağlıklı 160 sığırdan 100 tanesi seçilerek Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında dışkı örnekleri alınmıştır. Ocak döneminde %61, Nisan döneminde %39, Temmuz döneminde %36 ve Ekim döneminde %59 *Listeria* spp. izole edilmiştir (1). Bu çalışmanın yapıldığı Kars Yöresi'nde vajinal sıvap örneklerinden %5.6 ve süt örneklerinden %0.8 gibi düşük oranlarda izolasyon sağlanmıştır. Bu bölgede silaj ile beslemenin yok denecek kadar az olması, yörede infeksiyonun yayılımına katkıda bulunan başka faktörlerinde varlığını ortaya koymaktadır. Bölgemizdeki kış şartlarının çok ağır oluşu ve şiddetli soğuklar nedeniyle hayvanların çok uzun süre kapalı kalmalarının oluşturduğu stresin, infeksiyonda olumsuz etki yapacağı düşünülmektedir. Hayvan barınaklarının uygun standartlarda olmaması ve yeterli havalandırmanın yapılamaması da olumsuz şartları daha da ağırlaştırmaktadır. Bununla birlikte bölgenin sosyoekonomik yapısının düşük olması ve üreticilerin hastalıklar hakkında yeterli bilgiye sahip olmamaları infeksiyon riskini artırabilmektedir.

Bu çalışmada Listeria türlerinin izolasyonunda FDA yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemi seçmemizin sebebi, kısa zaman periyodunda izolasyon sağlanması ve kullanılan kimyasal maddelerle diğer mikroorganizmaların baskılanmasının maksimum düzeyde sağlanabilmesidir. Gün tarafından yapılan çalışmada FDA yönteminde 24 ve 48 saatlik zenginleştirmenin yeterli olduğu sonucuna varılmış ve daha uzun süreli zenginleştirmelerin anlamsız ve gereksiz zaman kaybına sebep olacağı vurgulanmıştır (53). Ayrıca Güven yaptığı çalışmada LSA besiyerinin Listeria türleri için, MMBA ve MBA besiyerlerinden daha iyi izolasyon sağladığını tespit etmiştir. Bununla birlikte FDA yönteminde 48 saatlik zenginleştirmenin 7 günlük zenginleştirmeden daha başarılı olduğunu bildirmiştir (54). Besiyerleri değerlendirildiğinde, diğer bakterilerin üremesinin baskılandığı LSA besiyerinin, Listeria türlerinin üremesi için en uygun besiyeri olduğu görülmektedir. Cins düzeyinde ve tür düzeyinde Listeria'ların belirlenmesinin LSA besiyerinde daha kolay olduğu görülmektedir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda bu çalışmada da, Listeria türlerinin izolasyonu için kullanılan LEB ve LSA besiyerlerinin tatminkar oldukları ve kısa sürede sonuç verdikleri gözlendi.

Yapılan çalışmada 250 süt numunesinin, sadece 2'sinden (%0.8) *L. monocytogenes* izole edildi. Rawool ve arkadaşları tarafından Hindistan'da yapılan çalışmada, mastitisli 169 inek ve 74 bufalodan alınan süt örnekleri incelenmiş, inek süt örneklerinden (%0.6) ve bufalo süt örneklerinden (%1.4) 1'er örnekte *L. monocytogenes* izole edilmiştir (89). Çalışmadaki bulgular ile Rawool ve arkadaşlarının bulguları paralellik göstermektedir.

Hindistan'da süt ineklerinden toplanan 2060 süt örneği ile yapılan diğer bir çalışmada ise, 139 (%6.74) *Listeria* spp. izolasyonu sağlanırken, *L. monocytogenes* izolasyonu 105 (%5.1) olmuştur (63).

Parihar ve arkadaşları tarafından Hindistan'da yapılan çalışmada süt besiciliği yapılan çiftliklerden sağlanan 123 süt örneği *Listeria* spp. yönünden analiz edilerek, 30'undan (%24.4) *Listeria* spp. izole edilmiştir. İdentifikasyon sonucunda bunların, 22'sinin (%17.87) *L. monocytogenes*, 4'ünün (%3.25) *L*

seeligeri, 2'sinin (%1.63) *L. innocua* ve 2 (%1.63)'sinin *L. welshimeri* olduğu tespit edilmiştir (80). Yapılan çalışma ile karşılaştırıldığında Hindistan'da gerçekleştirilen bu çalışmada oldukça yüksek oranda izolasyon sağlanmıştır. Çalışmada genital sistemi hastalığı bulunan hayvanlardan örneklemenin yapılması, izolasyon oranlarının oldukça yüksek olmasını etkilemiş olabilir.

Ertaş Elazığ ilinde yaptığı çalışmada, atık yapmış koyunlardan aldığı 50 süt örneğinin hiçbirinden Lİsteria cinsi bakteri izole edememiştir (38). Hasöksüz doktora tezinde çalıştığı 100 koyun süt örneğinin bakteriyolojik muayenesi sonucunda Listeria türü izole edemediğini bildirmiştir. FDA yöntemi ile yapılan izolasyon çalışmalarında PALCAM Agar ve LSA (Oxoid) kullanmıştır (55). Ertaş'ın yaptığı çalışmada izolasyon sağlayamaması, atık yapan koyunlardan sağlanan örnek sayısının azlığı nedeniyle olabileceği düşünülebilir. Ayrıca mastitislere sebep olan asıl etkenlerin, Listeria türleri olmadığı gerçeğini akla getirmektedir. Hasöksüzün çalışmasında ise Listeria türü izole edememesini, herhangi bir semptom göstermeyen koyunlardan alınan süt örneklerinin çalışılmasına ve sayının nispeten az olmasına bağlanabileceği düşünülebilir.

İzmir ve civarındaki işletmelerden sağlanan, klinik ve subklinik mastitisli 200 ineğe ait çiğ süt örneklerinin incelenmesi sonucu, 2 (%1) örnekte *L. innocua* tespit edilmiştir (39). Sivas ilinde yapılan çalışmada, FDA yöntemi ve 4°C'de uygulanan iki aşamalı zenginleştirme tekniği kullanılarak 100 çiğ süt örneği incelenmiştir. İzolasyon sonucunda 4 (%4) *L. monocytogenes* ve 2 (%2) *L. innocua* olmak üzere, toplam %6 oranında Listeria kontaminasyonu tespit edilmiştir. İki aşamalı zenginleştirmenin FDA yönteminden daha iyi sonuç vermesine rağmen, 21 gün sürmesi zaman açısından olumsuz bir tablo göstermektedir (106). İstanbul Anadolu yakasındaki büyükbaş hayvan çiftliklerinden toplanan 370 çiğ süt ve marketlerden toplanan 186 sert peynir örneği incelenmiştir. Kültür yöntemi ile yapılan incelemede, çiğ süt örneklerinin 17'sinde (%4.6), sert peynir örneklerinin 5'inde (%2.7) *Listeria* spp. izole edilmiştir. İncelenen 370 çiğ süt örneğinden izole edilen 17 *Listeria* spp.'nin 8'i (%47.1) *L. monocytogenes*,

6'sı (%35.3) *L. innocua*, 3'ü (%17.6) *L. welshimeri* olarak tespit edilmiştir (5). Araştırmacılar yaptıkları çalışmada FDA yöntemi kullanılarak 271 peynir, 221 çiğ süt, 11 lor ve 8 tereyağı olmak üzere toplam 511 örneği Listeria cinsi bakteriler açısından incelemeleri sonucunda, peynir örneklerinden 11 *L. monocytogenes* (%4), 1 *L. grayi* (%0.36); çiğ süt örneklerinden 1 *L. monocytogenes* (%0.45); tereyağlarından 1 *L. monocytogenes* (%12) suşu izole etmişlerdir (105). Yapılan çalışmalar bizim süt örneklerinden elde ettiğimiz izolasyon oranlarına nispeten uygunluk göstermektedir. Van il merkezindeki pastanelerden temin edilen 50 kremalı pasta örneğinin, 8'inden (%16) *L. monocytogenes*, 4'ünden (%8) *L. innocua* olmak üzere toplam 12 örnekten (%24) *Listeria* spp. izole edilmiştir (94). Listeriozis salgını olan bir bölgede, soğuk zenginleştirme yöntemi ile 121 süt örneğinin 15(%12)'inden ve sütleri süzmede kullanılan 14 filtrenin 2(%14)'sinden *L. monocytogenes* izole edilmiştir (56). Sonuçlar değerlendirildiğinde süt ve işlenmiş süt ürünlerinde listerial kontaminasyonun çok fazla olduğu görülmektedir. Buda çoğunlukla, yeterince hijyen kurallarına uyulmadığı gerçeğini akla getirmektedir.

Yapılan çalışmada kullanılan 250 vajinal sıvap örneğinin 14'ünden (%5.6) *Listeria* spp. izole edildi. Bunlarında 7'si (%2.8) *L. monocytogenes*, 3'ü (%1.2) *L welshimeri*, 2'si (%o.8) *L. seeligeri* ve 2'side (%0.8) *L. innocua* olarak identifiye edildi. Chaudhari ve arkadaşları da Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada bufalolardan aldıkları 125 vajinal sıvap örneğinden, 8'inde (%6.4) *Listeria* spp. izole etmişlerdir. Bunlarında 3'ünün (%2.4) *L. monocytogenes,* 1'inin (%0.8) *L ivanovii* olduğu tespit edilmiştir (23). *L. monocytogenes* izolasyon oranı bizim oranımıza benzerdir. Parihar ve arkadaşları tarafından, genital sistem hastalığı bulunan 20 inekten alınan cervico-vaginal sıvap örnekleri *Listeria* spp. yönünden analiz edilmiştir. Cervico-vaginal sıvap örneklerinin 4'ünden (%20) *Listeria* spp. izole edilmiştir. Bunların 2'si (%10) *L. monocytogenes* ve 2'side (%10) *L. innocua* olarak identifiye edilmiştir (80). Parihar'ın izolasyon oranları ise bizim oranlarımızdan oldukça fazladır. Bunun sebebi sadece genital sistem hastalığı bulunan ineklerden örneklerin alınmış olması olabileceği gibi, örnek sayısının az olması da etkilemiş olabileceği

kanaatindeyiz. Yapılan çalışmada da sadece atık yapan 96 inek dikkate alındığında, bu oran %8.3'e çıkmaktadır. Yapılan çalışmada çoğu atık vakalarının çok eski olduğu, 4 ay önceki atık vakalarının dahi olduğu ve atık vakasının oluşmasından kısa bir zaman sonra ulaştığımız hayvan sayısının az olması nedeniyle izolasyon oranlarımızın düştüğü de düşünülebilir.

Holko ve arkadaşları 60 peynir ve 30 çiğ süt örneğinde geleneksel yöntemlerle ve Nested PCR yöntemiyle izolasyon ve identifikasyon yapmışlar ve PCR ile bu örneklerin 18'inde pozitif sonuç almışlardır. Kültür yönteminde 24 saatlik zenginleştirme sonrası 12 pozitif sonuç alınırken, 48 saatlik zenginleştirme sonrası 18 pozitif sonuç alınmıştır (59). Kültür yönteminde işlemler 5-10 gün sürmekte oysa PCR iki gün gibi kısa bir sürede sonuçlanmaktadır. Ayrıca başka laboratuvarlarda identifikasyonu yapılmış 60 izolatlada yapılan çalışma ile de gösterilmiştir ki, nonhemolitik *L. monocytogenes* ile *L. innocua*'nın ayrımı geleneksel biyokimyasal yöntemlerle daha zordur (59).

PCR yöntemi ile 16 izolattan, 27S, 14V, 19V, 242V ve 244V numaralı izolatlar (%31.25) pozitif olarak tespit edilmiştir. Rawool ve arkadaşları da (89) yaptıkları çalışmada izole ettikleri 5 Listeria izolatına *iap* genini hedef alan PCR uygulamışlar ve 3 izolatta pozitif sonuç almışlardır. Ayrıca virülensi belirleğen diğer genleri, *plcA*, *prfA*, *actA* ve *hlyA*'yı hedef alan PCR işlemlerinin hiçbirinde tek başına tam pozitiflik sağlanamamıştır. Bu çalışma özellikle saha suşları ile yapılan ve virülens genlerini hedef alan PCR çalışmalarında her Listeria izolatında kesin pozitif sonuç alınamayabileceğini göstermektedir. PCR ile pozitifliği ispatlanamayan izolatların farklı saha suşları olabileceği veya *iap* geninde farklılıklar olabileceği anlaşılmaktadır.

Listeria cinsindeki bakteriler hücre içinde yaşamaları, olumsuz çevre şartlarında hatta buzdolabı ısısında yaşayabilmeleri, sağlıklı insanların ve hayvanların sindirim sisteminde hiçbir hastalığa neden olmadan varlıklarını sürdürebilmeleri ve çevrede çok yaygın olarak bulunabilmeleri nedeniyle çok dikkatli değerlendirilmelidirler. *L. monocytogenes* infeksiyonuna maruz kalan hayvanlar atık fetusları, salgıları ve sütleri ile çevresel kontaminasyona sebep

olurlar. İnfeksiyonda mortalite oranı düşük olmasına rağmen, morbidite oranı %20 civarındadır. Çiğ sütlerdeki listerial varlık her ne kadar enfeksiyon kaynaklı ise de, özellikle pastörize sütlerdeki Listeria varlığı ancak sonradan oluşan kontaminasyona ve buzdolabı ısısında üreyebilme yeteneğine bağlanabilmektedir. Listerial infeksiyonlarda silaj önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan birçok araştırma, uygun şartlarda hazırlanmayan ve muhafaza edilmeyen silajların listerial infeksiyon için tehlike arz ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmanın yapıldığı Kars Yöresi'nde atık yapan sığırların sütleri ile *L. monocytogenes*'i çevreye yaydıkları ve bunun sonucunda da hayvancılıkla uğraşanların ve bu sütleri tüketenlerin listerial infeksiyonlara maruz kalabileceği kanaatine varılmıştır. Aynı sürüdeki hayvanlarında enfeksiyona maruz kalabileceği ve bunun sonucunda daha büyük ekonomik kayıpların oluşacağı düşünülebilir. Yaklaşık 400 bin baş sığırın bulunduğu ve 285 bin ton inek sütü üretiminin olduğu yöremizde insan ve hayvan sağlığının listerial infeksiyonlar bakımından risk teşkil edebileceği kanaatine varıldı. Hayvan yetiştiriciliğinin ve hayvansal ürünlerin fazlaca üretildiği ve pazarlandığı Kars ilinde listerial infeksiyonların göz ardı edilmemesi ve gereken koruma ve kontrol tedbirlerinin alınması, bu bağlamda çiftlik sahiplerinin, hayvan bakıcılarının, gıda ürünleri üretimi yapılan işletmelerin personelinin ve hatta veteriner hekimlerin infeksiyonlar hakkında bilgilendirilmelerine önem verilmelidir. Ayrıca daha kapsamlı çalışmaların planlanarak uygulamaya konması, halk sağlığı açısından önemli olduğu gibi ekonomik faydalarda sağlayacaktır.

5. ÖZET

Kars Yöresi Sığırlarından Alınan Süt ve Vajinal Sıvap Örneklerinden Listeria Türlerinin Araştırılması

Listeriozis ruminantlılarda abortus, ensefalomyelitis ve septisemi ile seyrederek, önemli ekonomik kayıplara yol açan zoonoz bir infeksiyondur. Listeria'ların doğal rezervuarlarının toprak ve memelilerin sindirim sistemi olması, Listeria'lar ile gıdaların kontaminasyon ihtimalini artırmaktadır. Teknolojinin gelişimiyle birlikte daha hızlı bir yaşam tarzının benimsendiği toplumlarda hazır gıda tüketiminin artması, buzdolabı ısısında üreyebilen Listeria'lara karşı daha dikkatli ve kontrollü tüketimi gerektirmektedir.

Bu çalışmada, Kars Merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan 250 inekten alınan süt ve vajinal sıvap örneklerinden oluşan toplam 500 örnek Listeria cinsi bakteriler yönünden kültürel olarak değerlendirildi. FDA (Food and Drug Administration) yöntemi ile yapılan izolasyon çalışmasında, LEB (Listeria Enrichment Broth) ve LSA (Listeria Selective Agar) kullanıldı. İzolasyon ve identifikasyon sonucunda süt örneklerinin sadece 2'sinden (%0.8) *L. monocytogenes* izole edildi. Sütlerinden *L. monocytogenes* izole edilen ineklerin ikisi de atık yapmıştı. Atık yapan 96 inekten, 2 (%2.1) *L. monocytogenes* izole edilmiş oldu. Çalışmada kullanılan vajinal sıvap örneklerinin 14'ünden (%5.6) *Listeria* spp. izole edildi. Bunlarında 7'si (%2.8) *L. monocytogenes*, 3'ü (%1.2) *L welshimeri*, 2'si (%0.8) *L. seeligeri* ve 2'side (%0.8) *L. innocua* olarak identifiye edildi. İzolatlara uygulanan PCR işleminde 16 izolattan 5 tanesinde pozitif sonuç elde edildi.

Bu çalışma ile Kars Yöresi'nde, süt örneklerinden *L. monocytogenes* kültürel yöntemlerle ilk kez izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Yoğun hayvan populasyonuna sahip yöredeki atık vakalarının *L. monocytogenes* infeksiyonu sonucu oluşabileceği ve atık yapan ineklerin, en azından belli bir zaman diliminde sütleri ve diğer akıntıları ile etkenleri çevreye saçabilecekleri

görülmektedir. Hayvan ve insan sağlığı açısından önemli olan infeksiyonun ekonomik kayıplara da sebep olduğu düşünüldüğünde, koruma ve kontrol tedbirlerinin zamanında ve aksatılmaksızın uygulanması gerektiği kanaatine varıldı.

6. SUMMARY

An investigation of Listeria species isolated from milk and vaginal swabs of cows in the province of Kars, Turkey

Listeriosis, which is a zoonotic infection, causes abortion, encephalomyelitis and septicaemia in ruminants, leading to significant economic loss. The fact that soil and the digestive systems of mammals are the natural reservoir for *Listeria* spp. increases the likelihood that food contamination will occur. In developed societies, the faster pace of life and technological advances have resulted in increased consumption of processed foods, making it necessary to take more precautions against *Listeria* spp*.,* which propagate even under refrigeration.

In this study, a total of 500 samples of milk and vaginal swabs from 250 cows from herds with a recent history of abortion, from villages administered by the city of Kars and the town of Selim, were cultured for bacteria of the Listeria genus. Isolation was performed by the FDA (Food and Drug Administration) method, using LEB (Listeria Enrichment Broth) and LSA (Listeria Selective Agar). The results of the isolation and identification process showed that *L. monocytogenes* was present in only two of the milk samples (0.8%), both from cows which had recently aborted. Thus, *L. monocytogenes* was isolated from two (2.1%) out of 96 cows with a history of abortion. *Listeria* spp*.* were isolated from 14 (5.6%) of the vaginal swab samples used in the study. Seven (2.8%) of these were identified as *L. monocytogenes*, three (1.2%) as *L. welshimeri*, two (0.8%) as *L. seeligeri* and two (0.8%) as *L. innocua*. Five out of 16 isolates were found to be positive by PCR.

In this study, *L. monocytogenes* was isolated and identified in milk samples by the culturing method for the first time in the region of Kars. The findings show that *L. monocytogenes* infection may contribute to cases of abortion encountered in the region which has a large population of farm

animals, and that milk and other excretions from cows which have aborted may spread the bacteria into the environment for at least a period of time. It may be concluded that, since the infection is important for both animal and human health and causes considerable economic loss, timely and rigorous prevention and control measures should be implemented in the region.

7. KAYNAKLAR

1. Abay, S. ve Aydın, F.: Sağlıklı sığırların dışkılarından *Listeria* spp. Izolasyon ve identifikasyonu. Sağlık Bilimleri Dergisi. 14(3): 191-197, 2005.

2. Aktepe, O. C.: Ülkemizde Listeriozun insanlardaki durumu. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum, S: 61, 2007.

3. Allerberger, F.: Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 35, 183-189, 2003.

4. Arda, G.: Süt ve süt ürünlerinde Listeria varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi, Genelkurmay Başkanlığı, İstanbul, 1994.

5. Arda, G., Özsoy, M. F., Koçak, N., Çavuşlu, Ş., Keskin, K. ve Yenen, O. Ş.: Süt ve süt ürünlerinde Listeria araştırılması. Klinik Derg. 9(3), 152-155, 1996.

6. Arda, M.: Temel mikrobiyoloji ders kitabı. 2. Baskı, Medisan yayınları, Ankara, 2000.

7. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö.: Özel mikrobiyoloji (epidemiyoloji, bakteriyel ve mikotik infeksiyonlar) ders kitabı. 1. baskı, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, S: 236-247, 1992.

8. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M. ve Diker, K. S.: Özel mikrobiyoloji ders kitabı. 5. baskı, Medisan yayınları, Ankara, S: 147-155, 1999.

9. Arslan, A., Gönülalan, Z., Dinçoğlu, A. H. ve Kök, F.: Tavuk karkas kısımları ve karkas yıkama sularında Listeria türlerinin incelenmesi. Turk J. Vet. Anim. Sci., 23, ek sayı 2, 305-308, 1999.

10. Aslan, V., Turgut, K., Kaya, O. ve Sevinç, M.: Sığırlarda listeriosis olgusu. Hay. Araş. Derg., 1(1), 37-39, 1991.

11. Atlas, R. M.: Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group. Second Edition, 2006.

12. Axelsson, F. and Sorin, M. L.: Transia Listeria Technical Handbook. Hisings Backa, Sweden, 1998.

13. Aydın, N. ve Paracıkoğlu, J.: Veteriner mikrobiyoloji (Bakteriyel hastalıklar) ders kitabı. İlke emek yayınları, Ankara, S: 57-63, 2006.

14. Barber, M.: A comparative study of *Listerella* and *Erysipelothrix*. J. Path. Bact., 48, 11-23, 1939.

15. Berktaş, M., Bozkurt, E. N., Bozkurt, H., Alişarlı, M. ve Güdücüoğlu, H.: Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes*'in izolasyonu.Van Tıp dergisi, 13, 2, 36-41, 2006.

16. Blanco, M., Fernandez-Garayzabal, J. F., Dominguez, L., Briones, V., Vazquez-Boland, J. A., Blanco, J. L., Garcia, J. A. and Suarez, G.: A technique for the direct identification of haemolytic-pathogenic Listeria on selective plating media. Letters in Applied Microbiology, 9, 125-128, 1989.

17. Börkü, M. K., Ural, K., Gazyağcı, S., Özkanlar, Y., Babür, C. and Kılıç, S.: Serological detection of listeriosis at a farm. Turk J. Vet. Anim. Sci., 30, 279-282, 2006.

18. Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. and Wagner, M.: Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology, 65(10), 4688-4692, 1999.

19. Bubert, A., Köhler, S. and Goebel, W.: The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, 58(8), 2625-2632, 1992.

20. Busch, S. V. and Donnelly, C. W.: Development of a Repair-Enrichment Broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua.* Applied and Environmental Microbiology, 58(1), 14-20, 1992

21. Cassiday, P. K., Graves, L. M. and Swaminathan, B.: Replica plating of colonies from Listeria-Selective Agars to Blood Agar to improve the isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. Applied and Environmental Microbiology, 56(7), 2274-2275, 1990.

22. Chakraborty, T. and Goebel, W.: Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. Current Topics in Microbiology in İmmunology, 138, 41-58, 1988.

23. Chaudhari, S. P., Malik, S. V. S, Chatlod, L. R. and Barbuddhe, S. B.: Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* and detection of antibodies against phosphatidylinositol-specific phospholipase C in buffaloes. Compararive Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 27(2) : 141-148, 2004.

24. Christie, R., Atkins, N. E. and Munch-Petersen, E.: A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 22, 197-200, 1944.

25. Curtis, G. D. W. and Lee, W. H.: Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes.* International Journal of Food Microbiology, 26 (1), 1-13, 1993.

26. Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F. and Griffin, E. J.: A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 8, 95-98, 1989.

27. Curtis, G. D. W., Nichols, W. W. and Falla, T. J.: Selective agents for Listeria can inhibit their growth. Letters in Applied Microbiology, 8, 169-172, 1989.

28. Donnelly, C. W. and Baigent, G. J.: Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Applied and Environmental Microbiology, 52(4), 689-695, 1986.

29. Doyle, M. E.: Virulence Characteristics of *Listeria monocytogenes*. FRI BRIEFINGS. Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison. 1-13, 2001.

30. Doyle, M. P. and Schoeni, J. L.: Selective-Enrichment Procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. Applied and Environmental Microbiology, 51(5), 1127-1129, 1986.

31. Ekici, K., İşleyici, Ö., Sağun, E.: Süt ve süt ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. YYÜ. Vet. Fak. Derg. 15 (1-2), 97-101, 2004.

32. Eld, K., Danielsson-Tham, M. L., Gunnarsson, A. and Tham, W.: Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. Veterinary Microbiology, 36, 185-189, 1993.

33. Erdoğan, H. M.: An epidemiological study of listeriosis in dairy cattle. PhD Thesis, Bristol Universty, Bristol, U.K. 1998.

34. Erdoğan, H. M., Çetinkaya, B., Green, L. E., Cripps, P. J. and Morgan, K. L.: Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical listeriosis in dairy cattle in England. The Veterinary Record, 149, 289-293, 2001.

35. Erdoğan, H. M., Cripps, P. J. and Morgan, K. L.: Optimization of a culture technique for the isolation of *Listeria monocytogenes* from faecal samples. J. Vet. Med., 49, 502-506, 2002.

36. Erdoğan, H. M., Gökçe, G., Gökçe, H. İ., Kırmızıgül, A. H., Güneş, V., Sural, E. ve Yılmaz, K.: Kars Yöresi'ndeki sığırlarda *Listeria monocytogenes* infeksiyonlarının ELISA yöntemi ile araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. Cilt:5, sayı :1, s.43-46, 1999.

37. Erol, İ.: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi Kitabı. Ankara, S: 126-134, 2007.

38. Ertaş, H. B.: Elazığ bölgesinde koyun ve keçi sütlerinden Listeria türlerinin izolasyonu. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.1997.

39. Eskiizmirliler, S. N.: İzmir Bölgesi mastitisli inek sütlerinden *Listeria* spp. izolasyonu. Bornova Vet. Kont. Ve Araşt. Enst. Md. Derg. C: 21, Sayı: 35, s: 43-53, 1996.

40. Evanson, D. J., Klatt, M. J., Donlevy, T. P. and Flowers, R. S.: Agar-based 24-H Method for presumptive identification of *Listeria monocytogenes.* Journal of Food Protection, 54(5), 370-371, 1991.

41. Farber, J. M., and Peterkin, P. I.: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, 55 (3), 476-511, 1991.

42. Fernandez-Garayzabal, J. F., Suarez, G., Blanco, M. M., Gibello, A. and Dominguez, L.: Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. International Journal of systematic bacteriology, 46(7), 832-834, 1996.

43. Food-borne Pathogens Monograph Number 2 Listeria, Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England.

44. Gahan, C. G. M. and Hill, C.: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. Journal of Applied Microbiology. 98, 1345-53, 2005.

45. Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P. M.: Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Review, 29, 851-875, 2005.

46. Gellin, B. G. and Broome, C. V.: Listeriosis. *JAMA (*J Am Med Assoc*)* 261 (9), 1313–1320, 1989.

47. George, S. M., Lund, B. M. and Brocklehurst, T. F.: The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 6, 153-156, 1988.

48. Gill, D. A.: Ovine bacterial encephalitis (circling disease) and the bacterial genus listerella. The Australian Veterinary Journal. 13, 46-57, 1937.

49. Gray, M.L.: Epidemiological aspects of Listeriosis. Amer. J. Pub. Health. 53 : 554-563, 1963.

50. Gray, M. L. and Killinger, A. H.: *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol. Rev. 30:309–382, 1966.

51. Gray, M. L., Stafseth, H. J., Thorp, F., Jr., Sholl, L. B. and Riley, W. F., Jr.: A new technique for isolating listerellae from the bovine brain. J. Bacteriol. 55, 471-476, 1948.

52. Güçlü, H. S., Karaer, K. Z., Babür, C. and Kılıç, S.: The seroprevalence of *Listeria monocytogenes* in sport horses bred in Ankara province. Turk J. Vet. Anim. Sci.,31(4), 271-273, 2007.

53. Gün, H.: İstanbul ve yöresindeki sağlıklı ineklerin sütlerinde Listeria türlerinin izolasyon, identifikasyon ve patojenitesi üzerine araştırmalar. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul. 1994.

54. Güven, A.: Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde Listeria türlerinin araştırılması. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ. 1994.

55. Hasöksüz, M., Ilgaz, A.: Marmara Bölgesindeki sağlam koyunların kan serumlarında ELISA yöntemi ile *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşan antikorların saptanması ve listeriosis üzerinde etiyolojik-epizootiolojik

çalışmalar. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 26:157-174, 2000.

56. Hayes, P. S., Feeley, J. C., Graves, L. M., Ajello, G. W. and Fleming, D. W.: İsolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Applied and Environmental Microbiology, 51(2), 438-440, 1986.

57. Hayes, P. S., Graves, L. M., Ajello, G. W., Swaminathan, B., Weaver, R. E., Wenger, J. D., Schuchat, A., Broome, C. V. and Listeria Study Group.: Comparison of Cold Enrichment and U. S. Department of Agriculture Methods for isolating *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated food. Applied and Environmental Microbiology, 57(8), 2109-2113, 1991.

58. Hayes, P. S., Graves, L. M., Swaminathan, B., Ajello, G. W., Malcolm, G. B., Weaver, R. E., Ransom, R., Deaver, K., Plikaytis, B. D., Schuchat, A., Wenger, J. D., Pinner, R. W., Broome, C. V. and Listeria Study Group.: Comparison of three Selective Enrichment Methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. Journal of Food Protection, 55(12), 952-959, 1992.

59. Holko, I., Urbanova, J., Kantikova, M., Pastorova, K. and Kmet, V.: PCR detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. Acta Vet. Brno, 71, 125-131, 2002.

60. İkiz, S.: Listeriozun Laboratuvar tanısı. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum, S: 62-64, 2007.

61. Kalender, H.: Detection of *Listeria monocytogenes* in faeces from chickens, sheep and cattle in Elazığ province. Turk J. Vet. Anim. Sci., 27, 449-451, 2003.

62. Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Warke, S. R., Rawool, D. B., Malik, S. V. S and Barbuddhe, S. B.: Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in faeces of wild animals in captivity. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 29, 295-300, 2006.

63. Kalorey, D. R., Warke, S. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B. and Barbuddhe, S. B.: Listeria species in bovine raw milk: A large survey of Central India. Food Control, 19, 109-112, 2008.

64. Kara, A. A., Algur, Ö. F. ve Kaya, M.: Erzurum piyasasından temin edilen beyaz ve çivil peynirlerden, Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu. Tr. J. Of Biology 23, S: 331-337, 1999.

65. Kars Tarım İl Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şube Müdürlüğü, 2009 yılı hayvan mevcutları verileri.

66. Kennerman, E., Babür, C. and Kılıç, S.: Determination of seroprevalence of *Listeria monocytogenes* antibodies in cattle in Bursa province of Turkey (2005). Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med., 24(1-2-3-4), 95-98, 2005.

67. Kennerman, E., Erdoğan, H. M., Şentürk, S. ve Gölcü, E.: Bursa Bölgesindeki koyunlarda Listeriosisin ELISA ile serolojik tanısı. Veteriner Cerrahi Dergisi. 6(3-4), 22-25, 2000.

68. Kılınç, B.: Su ürünlerinde *Listeria monocytogenes*. E. Ü. Su Ürünleri Dergisi, 18(3-4), 565-574, 2001.

69. Kocabıyık, A. L., Çetin, C. ve Özakın, C.: Faecal carriage of *Listeria monocytogenes* in stray dogs in Bursa province, Turkey. Turk J. Vet. Anim. Sci., 29, 1357-1359, 2005.

70. Lewis, S. J. and Corry, J. E. L.: Comparison of a cold enrichment and the FDA method for isolating *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. From ready-to-eat food on retail sale in the U. K. International Journal of Food Microbiology, 12, 281-286, 1991.

71. Liu, D.: Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press, 2008.

72. Lorber, B.: Listeriosis. Clinical İnfectious Diseases. 24, 1-11, 1997.

73. Lovett, J.: Taxonomy and general characteristics of *Listeria* spp. Editors: Miller, A. J., Smith, J. L. and Somkuti, G. A. Foodborne Listeriosis. Society for Industrial Microbiology, chapter:3, 9-12, 1990.

74. Lovett, J., Francis, D. V. and Bradshaw, J. G.: Outgrowth of *Listeria monocytogenes* in foods. Editors: Miller, A. J., Smith, J. L. and Somkuti, G. A. Foodborne Listeriosis. Society for Industrial Microbiology, chapter: 26, 183-187, 1990.

75. Low, J. C., and Donachie, W.: A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet. J. 153, 9–29, 1997.

76. Mckellar, R. C.: Use of CAMP Test for identification of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 60(12), 4219-4225, 1994.

77. Murray, E. G. D., Webb, R. A. and Swann, M. B. R.: A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed *Bacillus bacterium monocytogenes* (n. sp.). Journal of Pathology, 29, 407-439, 1926.

78. Muz, A., Ertaş, H. B., Öngör, H., Gülcü, H. B., Özer, H., Eröksüz, H., Dabak, M., Başbuğ, O. ve Kalender, H.: Elazığ ve çevresinde koyun ve keçilerde abortus olgularının bakteriyolojik, serolojik ve patolojik olarak incelenmesi. Turk J. Vet. Anim. Sci., 23, ek sayı 1, 177-188, 1999.

79. Özmen, G. ve Kılıç, H.: Gemlik Garnizonu'nda tüketime sunulan tavuk etlerinden *Listeria* spp. izolasyonu. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 15 (3) S: 194-197, 2006.

80. Parihar, V. S., Barbuddhe, S. B., Chakurkar, E. B., Danielsson-Tham, M. L. and Tham, W.: Isolation of Listeria species from farm bulk milk at the receiving dairy plant and cervico-vaginal swabs from dairy cows in Goa. Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases (IJCMIID), 28(1), 1-5, 2007.

81. Parihar, V. S., Barbuddhe, S. B., Danielsson-Tham, M. L. and Tham, W.: Isolation and characterization of Listeria species from tropical seafoods. Food Control, 19, 566-569, 2008.

82. Paterson, J. S.: The present position regarding *Listerella monocytogenes* infection in animal and man. The Veterinary Record, no: 28, vol: 51, p: 873-876, 1939.

83. Peiris, W. I. P.: *Listeria monocytogenes,* a food-borne pathogen. Masters thesis, Swedish University, Uppsala, Sweden. 2005.

84. Picoux, J. B.: Ovine listeriosis. Small Ruminant Research, 76, 12-20, 2008.

85. Pini, P. N. and Gilbert, R. J.: A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. International Journal of Food Microbiology, 7, 331-337, 1988.

86. Pirie, J. H. H.: Listeria : Change of name for a Genus of Bacteria. Nature, 145, 264, 1940.

87. Prentice, P. A., Neaves, P.: The identification of Listeria species. In: Board R. G., Jones D., Skinner F. A., editors. Applied bacterial symposium. Oxford, England: Blackwell Science Ltd. pp. 283–296, 1992.

88. Ralovich, B.: Data for the properties of Listeria strains. Acta Microbiologica Hungarica, 39 (2), 105-132, 1992.

89. Rawool, D. B., Malik, S. V. S, Shakuntala, I., Sahare, A. M. and Barbuddhe, S. B.: Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. International Journal of Food Microbiology, 113, 201-207, 2007.

90. Reissbrodt, R.: New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.-an overview. International Journal of Food Microbiology, 95, 1-9, 2004.

91. Rodriguez, L. D., Fernandez, G. S., Garayzabal, J. F. F. and Ferri, E. R.: New methodology fort he isolation of Listeria microorganisms from heavily contaminated environments. Applied and Environmental Microbiology, 47(5), 1188-1190, 1984.

92. Ryser, E. T. and. Marth, E. H.: Listeria*,* Listeriosis, and Food Safety. Food Science and Technology. New York, Marcell Dekker, Inc. 2007.

93. Sambrook, J. ve Russell, D.: Molecular cloning: A laboratory manual (Third edition). volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory, America. 2001.

94. Sancak, Y. C., İşleyici, Ö., Elibol, C. ve Ekici, K.: Van'da tüketime sunulan kremalı pastalarda Listeria türlerinin varlığının belirlenmesi. YYÜ. Vet. Fak. Derg., 13(1-2), 8-11, 2002.

95. Schuchat, A., Swaminathan, B., and Broome, C. V.: Epidemiology of human listeriosis. Clinical Microbiological Reviews, 4 (2), 169-183, 1991.

96. Seeliger, H. P. R.: Modern taxonomy of the Listeria group relationship to its pathogenicity. Clinical and Investigative Medicine, 7, 4, 217-221, 1984.

97. Seeliger, H. P. R.: Listeriosis-History and Actual Developments. Infection 16 suppl. 2, 80-84, 1988.

98. Seeliger, H. P. R and Jones, D.: Genus Listeria Pierie 1940. In: Sneath, Mair, Sharpe,and Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore 2, 1235-1245, 1986.

99. Solmaz, H., Akkan, H. A., Tütüncü, M., Karaca, M., Ekin, İ. H. ve Kutlu, İ.: Van ve yöresinde atlarda listeriozisin seroprevalansı. YYÜ. Vet. Fak. Derg., 13(1-2), 62-63, 2002.

100. Şahin, M.: Türkiye'de listeriozun hayvanlardaki durumu. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum, S: 55-58, 2007.

101. Şahin, M. and Beytut, E.: Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* in the Kars region. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30, 503-506, 2006.

102. Taştan, R., Aydın, N., Aktar, H., Gülyaz, V. ve Şenol, A. G.: Sığırlarda listerial ensefalitis olgusu. Etlik Vet. Mikrob. Derg., 8(4), 37-43, 1996.

103. Tiwari, N. P. and Aldenrath, S. G.: Isolation of *Listeria monocytogenes* from food products on four Selective Plating Media. Journal of Food Protection, 53(5), 382-385, 1990.

104. Uraz, G. ve Yücel, N.: *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica* ve benzerlerinin (*Yersinia kristensenii, Yersinia frederiksenii, Yersinia intermedia*) çiğ süt örneklerinden izolasyonu. Tr. J. Of Agriculture and Forestry 22, S: 463- 468, 1998.

105. Uysal, H. K. ve Anğ Ö.: Süt ve süt ürünlerinden izole edilen Listeria türleri. Türk Mikrobiol. Cem. Derg. 33 S: 163-169, 2003.

106. Ünlü, G. V., Ünlü, M. ve Bakıcı, M. Z.: Incidence of *Listeria* spp. from raw milk in Sivas. Türk J. of Medical Sciences, 28, 389-392, 1998.

107. Vazquez-Boland, J. A., Khun, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J.: Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clinical Microbiology Reviews, 14 (3), 584-640, 2001.

108. Walker, S. J., Archer, P. and Banks, J. G.: Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. Journal of Applied Bacteriology, 68, 157-162, 1990.

109. Warburton, D. W., Farber, J. M., Armstrong, A., Caldeira, R., Hunt, T., Messier, S., Plante, R., Tiwari, N. P. and Vinet, J.: A comparative study of

the ‘FDA’ and ‘USDA’ methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. International Journal of Food Microbiology, 13, 105-118, 1991.

110. Yeh, E. T.: Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from organic retail chicken. Masters thesis, University of Maryland, Maryland, ABD. 2004.

111. http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_05.pdf, İsolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Laboratory Guidebook Notice of Change, 2006. Erişim tarihi: 17.01.2008.

112. http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_07.pdf, İsolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Laboratory Guidebook Notice of Change, 2009. Erişim tarihi: 28.10.2009.

113. http://www.kku.edu.tr., Ayaz, N. D., Erol, İ.: *Listeria monocytogenes*'in önemi ve virülens faktörleri, Erişim tarihi: 15.01.2008.

114. http://www.mikrobiyoloji.org., *Listeria monocytogenes.* Erişim tarihi: 16.01.2008.

115. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition, 2004. Erişim tarihi: 07.12.2007.

116. http://www.textbookofbacteriology.net/Listeria.html, *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Kenneth Todar University of Wisconsin-madison Department of Bacteriology. Todar’s Online Textbook of Bacteriology. 2008. Erişim tarihi: 01.05.2008.

117. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13: Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK): Büyükbaş hayvan sayıları. Erişim tarihi: 01.10.2009.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars'ın Digor ilçesinde 1972 yılında doğdu. İlköğrenimini ve lise öğrenimini Kars'ta tamamladı. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1995 yılında mezun oldu. Aynı fakültenin Patoloji Anabilim Dalı'nda, 1998 yılında Uzman kadrosunda göreve başladı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yaparak, 2003 yılında Bilim Uzmanı ünvanı aldı. Aynı yıl Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladı. Halen Patoloji Anabilim Dalı'nda Uzman olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir kız babasıdır.

EKLER

İzolasyon ve İdentifikasyonda Kullanılan Besiyerleri (11)

Listeria Enrichment Broth (LEB)

Pancreatic digest of casein	17.0 g
Yeast extract	6.0 g
NaCl	5.0 g
Papaic digest of soybean meal	3.0 g
Glucose	2.5 g
K2HPO4	2.5 g
Cycloheximide	0.05 g
Nalidixic acid	0.04 g
Acriflavine·HCl	0.015 g
Distile su	1.0 L
pH	7.3

Listeria Enrichment Broth, FDA (LEB)

Pancreatic digest of casein	17.0 g
Yeast extract	6.0 g
NaCl	5.0 g
Papaic digest of soybean meal	3.0 g
K2HPO4	2.5 g
Glucose	2.5 g
Nalidixic acid solution	8.0 ml
Cycloheximide solution	5.1 ml
Acriflavin·HCl solution	3.0 ml
Distile su	1.0 L
pH	7.3±0.2

Nalidixic Acid Solution (100.0 ml)

Nalidixic acid	0.5 g
Distile su	100 ml

Cycloheximide Solution (100.0 ml)

Cycloheximide	1.5 g
Ethanol	40.0 ml
Distile su	60.0 ml

Acriflavin·HCl Solution (100.0 ml)

Acriflavin·HCl solution	0.5 g
Distile su	100.0 ml

Hazırlanışı: Nalidixic acid, acriflavin, cycloheximide ve glukoz filtre ile siteril edilir. İçerikteki diğer maddeler ise 1 atmosfer basınçta 121°C'de 15 dakika siteril edilir

Listeria Enrichment Broth I
(Listeria Primary Selective Enrichment Broth, UVM I) (University of Vermont I Listeria Primary Selective Enrichment Broth), **USDA/FSIS** (Oxoid)

NaCl	20.0 g
Na2HPO4	12.0 g
Beef extract	5.0 g
Proteose peptone	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
KH2PO4	1.35 g
Esculin	1.0 g
Nalidixic acid solution	1.0 ml
Acriflavine solution	1.0 ml
Distile su	1.0 L
pH	7.4±0.2

Nalidixic Acid Solution (10.0 ml)

Nalidixic acid	0.2 g
NaOH (0.1M)	10.0ml

Acriflavine Solution (10.0 ml)

Acriflavine	0.12g
Distile su	10.0 ml

UVM Listeria Enrichment Broth
(University of Vermont Listeria Enrichment Broth)

NaCl	20.0 g
Na2HPO4	9.6 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Beef extract	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
KH2PO4	1.35 g
Esculin	1.0 g
Nalidixic acid	40.0 mg
Acriflavine·HCl	12.0 mg
Distile su	1.0 L
pH	7.2±0.2

Listeria Enrichment Broth II,
(Listeria Primary Selective Enrichment Broth, UVM II) (University of Vermont II Listeria Primary Selective Enrichment Broth)**, USDA/FSIS** (Oxoid)

NaCl	20.0 g
Na2HPO4	12.0 g
Beef extract	5.0 g
Protease peptone	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
KH2PO4	1.35 g
Esculin	1.0 g
Nalidixic acid solution	1.0 ml
Acriflavine solution	1.0 ml
Distile su	1.0 L
pH	7.4±0.2

Nalidixic Acid Solution (10.0 ml)

Nalidixic acid	0.2 g
NaOH (0.1M)	10.0 ml

Acriflavine Solution (10.0 ml)

Acriflavine	0.25 g
Distile su	10.0 ml

Amaç: Gıda, süt ve süt ürünlerinden *Listeria* spp. İzolasyonu için kullanılmaktadır.

Demi-Fraser Broth

NaCl	20.0 g
Tryptose	10.0 g
Na2HPO4	9.6 g
Beef extract	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
LiCl	3.0 g
KH2PO4	1.35 g
Esculin	1.0 g
Acriflavin·HCl	12.5 mg
Nalidixic acid	10.0 mg
Ferric ammonium citrate supplement	10.0 ml
Distile su	1.0 L
pH	7.2±0.2

Ferric Ammonium Citrate Supplement (10.0 ml)

Ferric ammonium citrate	0.5 g
Distile su	10.0 ml

Fraser Broth

NaCl	20.0 g
Na2HPO4	12.0 g
Beef Extract	5.0 g
Proteose peptone	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
LiCl	3.0 g
KH2PO4	1.35 g
Esculin	1.0 g
Fraser supplement solution	10.0 ml
Distile su	1.0 L
pH	7.2±0.2

Fraser Supplement Solution (10.0 ml)

Ferric ammonium citrate	0.5 g
Acriflavine·HCl	0.25 g
Nalidixic acid	0.1 g
Ethanol	5.0 ml
Distile su	5.0 ml

Fraser Secondary Enrichment Broth

NaCl	20.0 g
Na2HPO4	12.0 g
Beef extract	5.0 g
Proteose peptone	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
LiCl	3.0 g
KH2PO4	1.35 g
Esculin	1.0 g
Acriflavin solution	10.0 ml
Ferric ammonium citrate solution	10.0 ml
Nalidixic acid solution	1.0 ml
Distile su	1.0 L

Ferric Ammonium Citrate Solution (10.0 ml)

Ferric ammonium citrate	0.5 g
Distile su	10.0 ml

Acriflavin Solution (10.0 ml)

Acriflavin	0.025 g
Distile su	10.0 ml

Nalidixic Acid Solution (10.0 ml)

Nalidixic acid	0.04 g
NaOH (0.1N)	10.0 ml

Listeria Fermentation Broth

Proteose peptone No. 3	10.0 g
NaCl	5.0 g
Beef extract	1.0 g
Bromcresol Purple	0.1 g
Carbohydrate solution	10.0 ml
Distile su	1 L

Carbohydrate Solution (10.0 ml)

Carbohydrate	5.0 g
Distile su	10 ml

Amaç: Glucose, salicin, rhamnose, dulcitol, ya da raffinose. gibi karbonhidratların fermentasyonlarını test etmek için kullanılır.

Listeria Transport Enrichment Medium

Sodium glycerophosphate	10.0 g
Agar	2.0 g
Sodium thioglycolate	1.0 g
CaCl2	0.1 g
Nalidixic acid	0.04 g
Acridine solution	2.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.4±0.2

Acridine Solution (10.0 ml)

Acridine	0.04 g
Distile su	10 ml

Modifiye Mc Bride Agar

Agar	15.0 g
Glycine anhydride	10.0 g
Tryptose	10.0 g
NaCl	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Phenylethanol	2.5 g
LiCl	0.5 g
Cycloheximide solution	10.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.3±0.2

Cycloheximide Solution (10.0 ml)

Cycloheximide	0.2 g
Distile su	10 ml

Amaç: Süt ürünlerinden *Listeria* spp. İzolasyonu için kullanılır.

McBride Listeria Agar

Agar	15.0 g
Glycine	10.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
NaCl	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Phenylethyl alcohol	2.5 g
LiCl	0.5 g
Distile su	1 L
pH	7.3±0.2

LPM Agar (BAM M81)
(Lithium Chloride Phenylethanol Moxalactam Plating Agar)

Agar	15.0 g
Glycine anhydride	10.0 g
LiCl	5.0 g
NaCl	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Phenylethyl alcohol	2.5 g
Moxalactam solution	2.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.3±0.2

Moxalactam Solution (10.0 ml)

Moxalactam	0.1 g
Distile su	10 ml

LPM Agar with Esculin and Ferric Iron (BAM M82)

Agar	15.0 g
Glycine anhydride	10.0 g
LiCl	5.0 g
NaCl	5.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Beef extract	3.0 g
Phenylethyl alcohol	2.5 g
Esculin	1.0 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Moxalactam solution	2.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.3±0.2

Modified Oxford Listeria Selective Agar
(Oxford Agar, Modified) (Listeria Selective Agar, Modified Oxford)
(MOX Agar) (BAM M103a)

Special peptone	23.0 g
LiCl	15.0 g
Agar	12.0 g
NaCl	5.0 g
Cornstarch	1.0 g
Esculin	1.0 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Buffered colistin methane sulfonate solution	1.0 ml
Buffered moxalactam solution	2.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.2±0.2

Buffered Colistin Methane Sulfonate Solution (100.0 ml)

Colistin methane sulfonate	1.0 g
Potassium phosphate buffer (0.1M)	100 ml
pH	6.0±0.2

Buffered Moxalactam Solution (100.0 ml)

Sodium ya da ammonium moxalactam	1.0 g
Distile su	100 ml

Not: Buffered colistin methane sulfonate ve buffered moxalactam solüsyonu filtre ile siteril edilerek –20°C'de saklanır.

Oxford Agar
(Listeria Selective Agar, Oxford)

Special peptone	23.0 g
LiCl	15.0 g
Agar	10.0 g
NaCl	5.0 g
Cornstarch	1.0 g
Esculin	1.0 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Antibiotic inhibitor	10.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.0±0.2

Antibiotic Inhibitor (10.0 ml)

Cycloheximide	0.4 g
Colistin sulfate	0.02 g
Fosfomycin	0.01 g
Acriflavine	5.0 mg
Cefotetan	2.0 mg
Ethanol (% 50)	10.0 ml

Antibiyotiklerin Hazırlanışı: Antibiyotiklerin hepsi 10 ml ethanol içerisinde iyice çözülür ve filtre ile siteril edilir.

Hazırlanışı: Antibiyotikler hariç, bütün maddeler 990 ml distile su içerisinde iyice çözülür. 1 atmosfer basınçta 121°C'de 15 dakika siteril edilir. Besiyerinin ısısı 45-50°C'ye kadar soğuduktan sonra filtre ile siteril edilen 10 ml antibiyotik solüsyonu da ilave edilir ve iyice karıştırılarak petrilere veya tüplere dökülür.

Oxford Agar, Modified
(Listeria Selective Agar, Modified Oxford) (MOX Agar)

Special peptone	23.0 g
LiCl	15.0 g
Agar	12.0 g
NaCl	5.0 g
Cornstarch	1.0 g
Esculin	1.0 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Antibiotic inhibitor	10.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.0±0.2

Antibiotic Inhibitor (10.0 ml)

Moxalactam	0.015 g
Colistin sulfate	0.01 g
Distile su	10 ml

PALCAM Agar
(Polymyxin Acriflavine LiCl Ceftazidime Esculin Mannitol Agar)
(PALCAM Listeria Selective Agar) (BAM M118a)

Peptone	23.0 g
LiCl	15.0 g
Agar	10.0 g
Mannitol	10.0 g
NaCl	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Starch	1.0 g
Esculin	0.8 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Glucose	0.5 g
Phenol Red	0.08 g
PALCAM selective supplement	10.0 ml
Distile su	1 L
pH	7.2±0.2

PALCAM Selective Supplement (10.0 ml)

Ceftazidime	20.0 mg
Polymyxin B	10.0 mg
Acriflavine·HCl	5.0 mg
Distile su	10 ml

Tryptic Soy Agar with 0.6% Yeast Extract

Agar	15.0 g
Pancreatic digest of casein	15.0 g
Yeast extract	6.0 g
Pancreatic digest of soybean meal	5.0 g
NaCl	5.0 g
Distile su	1 L
pH	7.0-7.5

Trypticase Soy Agar Yeast Extract (TSAYE) (BAM M153)

Agar	15.0 g
Pancreatic digest of casein	17.0 g
Yeast extract	6.0 g
Papaic digest of soybean meal	3.0 g
NaCl	5.0 g
K2HPO4	2.5 g
Glucose	2.5 g
Distile su	1 L
pH	7.3±0.2

Trypticase Soy Broth Yeast Extract (TSBYE)

Pancreatic digest of casein	17.0 g
Yeast extract	6.0 g
Papaic digest of soybean meal	3.0 g
NaCl	5.0 g
K2HPO4	2.5 g
Glucose	2.5 g
Distile su	1 L
pH	7.3±0.2

Motility Test and Maintenance Medium

Peptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	4.0 g
Beef extract	3.0 g
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	0.05 g
Distile su	1 L