

Kars Yöresi Sığırlarından Alınan Süt ve Vajinal Sıvap Örneklerinden *Listeria* Türlerinin Araştırılması ^[1]

Doğan AKÇA * ✍ Mitat ŞAHİN **

[1] Aynı adlı doktora tezinden özetlenen bu araştırma Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından 2008-VF-013 nolu proje olarak desteklenmiştir

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-4911

Özet

Bu çalışmada, Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan 250 inekten alınan süt ve vajinal sıvap örnekleri olmak üzere toplam 500 örnek *Listeria* cinsi bakteriler yönünden kültürel olarak değerlendirildi. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'nın bildirdiği yöntem ile yapılan izolasyon çalışmasında, *Listeria* Enrichment Broth (LEB) ve *Listeria* Selective Agar (LSA) kullanılmış, süt örneklerinin 2'sinden (%0.8) *L. monocytogenes* izole edilirken, vajinal sıvap örneklerinin 14'ünden (%5.6) *Listeria* spp. izole edilmiştir. Vajinal sıvap örneklerinden izole edilen 14 *Listeria* izolatının 7'si (%2.8) *L. monocytogenes*, 3'ü (%1.2) *L. welshimeri*, 2'si (%0.8) *L. seeligeri* ve 2'si de (%0.8) *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen 10 (%10.4) *Listeria* izolatı, atık yaptığı bilinen 96 inekten elde edilmiştir. İzolatlara uygulanan *iap* genini hedefleyen PCR işleminde 16 izolattan 5 tanesinde pozitif sonuç elde edildi.

Anahtar sözcükler: Sığır, *Listeria*, Süt, Vajinal sıvap, İzolasyon, PCR

Investigation of *Listeria* Species Isolated from Milk and Vaginal Swab Samples of Cows in The Province of Kars, Turkey

Summary

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 used for culture isolation of *Listeria*. The isolation was performed by the method described by Food and Drug Administration (FDA) method, using *Listeria* Enrichment Broth (LEB) and *Listeria* Selective Agar (LSA). Based on the results of isolation and identification, *L. monocytogenes* was present in only two of the milk samples (0.8%) while *Listeria* spp. were isolated from 14 (5.6%) of the vaginal swab samples. Among those 14 isolates, seven (2.8%), three (1.2%), two (0.8%) and two (0.8%) were identified as *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* and *L. innocua*, respectively. Ten *Listeria* isolates were originated from 96 cattle with the history of abortion. Five out of 16 isolates were found to be positive by PCR for detecting *iap* gene.

Keywords: Cattle, *Listeria*, Milk, Vaginal swab, Isolation, PCR

GİRİŞ

Listeriosis ruminantlarda abortus, ensefalomyelit ve septisemi ile karakterize, ekonomik kayıplara yol açan zoonotik bir enfeksiyondur. *Listeria*'lar 1-45°C gibi çok geniş ısı aralığında üreyebilirler. Tuza ve pH'ya toleransları yüksektir ¹⁻⁶. Doğal rezervuarlarının toprak ve memelilerin sindirim sistemi olması, *Listeria*'lar ile gıdaların kontaminasyon riskini artırmaktadır. Ayrıca buzdolabı ısısında üreyebilmeleri halk sağlığı açısından önem arz etmektedir ⁷⁻¹¹.

Listeria monocytogenes, 1960 yılına kadar deney hayvanları, yabani hayvanlar, kanatlılar ve evcil hayvanlar olmak üzere 50'den fazla hayvan türünden ve insanlardan izole edilmiştir ¹²⁻¹⁷. Çevresel kontaminant olan *Listeria*'lar denizlerden ve tatlı sulardan izole edildiği gibi işlenmiş su ürünlerinden de izole edilmişlerdir ¹⁸. Enfeksiyonun bulaşmasına sebep olan gıdaların başında süt ve süt ürünleri ¹⁹, çiğ et, tavuk eti, et ürünleri, çiğ sebze ve



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426806/1157



doganakca1@hotmail.com

deniz ürünleri ²⁰ gelmektedir. *Listeria* cinsinde yer alan en patojen tür *L. monocytogenes*'dir ¹². Dünyanın birçok ülkesinde ve yurdumuzda yapılan araştırmalarda gıdalarda yüksek oranda *L. monocytogenes* bulunduğu saptanmıştır ^{12,21}. *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 kalabilmekte ve buzdolabı ısısında üreyebilmektedir ⁹. Bunun doğal sonucu olarak da *Listeria* içeren süt 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 düşüklere sebep olabileceği ve dikkatle değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir ^{7,11,22-26}.

Listeria infeksiyonlarında, yeni doğan bebekler, küçük çocuklar, hamile kadınlar, yaşlılar, kortikosteroid tedavisi görenler ve ilaç bağımlıları, AIDS, şeker, kanser ve böbrek hastaları gibi immunsupresif hastalar risk grubunu oluştururlar ²³⁻³⁰.

Listeriozis bulaşıcı olmayan sporadik vakalar şeklinde ortaya çıkar. Fakat özellikle silaj gibi kontamine kaynaklar koyunlarda salgınlara yol açabilir. 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 ¹⁵.

Listeriozisin teşhisinde kültürel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyon yanında, serum aglütinasyon testi, komplement fiksasyon testi ve ELISA gibi serolojik testlerden de yararlanılmaktadır ³¹⁻³⁶. Flow Cytometric Metodu ³⁷, Rapid Screening Test ³⁸ ve son zamanlarda PCR tekniği de teşhis amacı ile kullanılmaktadır ³⁹⁻⁴¹.

Bu çalışma ile, Türkiye'deki mevcut 11 milyon baş sığırdan yaklaşık 400 bininin bulunduğu ^{42,43} Kars yöresinde, 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 yıllık 296 bin tonluk süt üretiminin, 285 bin tonunun inek sütünden sağlandığı yöremizde ⁴³ süt, süt ürünleri ve diğer hayvansal gıdaların listerial infeksiyonlar açısından oluşturduğu risk durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

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.

Metot

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

Süt Örneklerinden İzolasyon: Her örnekten 25 ml alınarak, 225 ml zenginleştirme sıvı besiyeri bulunan erlenmayerlere steril olarak konuldu. Daha sonra 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 24 ve 48 saat sonra zenginleştirme besiyerlerinden LSA Besiyerine ekimler yapılarak 30°C'de 24 saat inkübe edildi ^{21,44-46}.

Vajinal Sıvap Örneklerinden İzolasyon: Tryptose broth içerisinde taşınarak laboratuvara getirilen vajinal sıvaplar deney tüplerinde bulunan 10 ml zenginleştirme sıvı besiyerine aktarıldı. Daha sonra 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 24 ve 48 saat sonra zenginleştirme besiyerlerinden LSA Besiyerine ekimler yapılarak 30°C'de 24 saat inkübe edildi ^{21,44-46}.

Süt ve vajinal sıvap örneklerinin ekim ve inkübasyonunu takiben, besiyerinde üreyen pürüzsüz, yuvarlak ve merkezi parlak gri-siyah renkte görülen koloniler *Listeria* şüphesi ile Tryptic Soy Agar - Yeast Extract (TSA-YE) besiyerine azaltma yöntemi ile ekildi ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üreyen kolonilere Henry İlluminasyon tekniği, Gram boyama, hareket muayenesi, katalaz testi, CAMP testi ve karbonhidrat fermentasyon testi uygulandı.

İzole Edilen *Listeria* Türlerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için klasik kloroform ekstraksiyon yöntemi ⁴⁷ modifiye edilerek kullanıldı.

Kloroform ekstraksiyon yöntemi

TSA-YE besiyerinde üretilen her izolattan bir öze dolusu alınarak 200 µl FTS içeren ependorflara konuldu ve süspanse edildi. Üzerine 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilip hafifçe karıştırıldı. Daha sonra 400 µl NaCl-EDTA-Tris-Na dodecylsulfate (NETS) lizis tampon solüsyonu eklenerek karışım hafifçe vortekslenildi ve 65°C'de 15 dk. blok ısıtıcıda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hafifçe vortekslenip, üzerine 600 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 oranında) ilave edildikten sonra her bir gode 15 sn. kuvvetlice vortekslenerek 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım (süpernatant) yeni steril bir ependorfa alındı. Üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm -20°C'de saklanan absöüt alkol ilave edilerek vortekslenildi ve gece boyunca -20°C'de bekletildi. Ertesi gün 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Böylece presipite olan DNA pelet haline geldi. Üstteki sıvı pelete

zarar verilmeden boşaltıldı. Sonra ependorflara -20°C'de saklanan %70'lik etanoldan 1 ml eklendi. Vortekslelendikten sonra 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Pelete zarar vermeden alkol boşaltıldı ve ependorflar kuruması için oda ısısında 20 dk bekletildi. Kuruduktan sonra üzerine 100 µl distile su eklenerek vortekslelendi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

PCR İşlemi

Protein p60'ı kodlayan *iap* geni (invasion associated protein) bütün *Listeria* türlerinde bulunmaktadır. Bunun için *iap* genini hedef alan primerler tercih edildi³⁹.

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

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

Her bir örnek için 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı (34.6 µl ddH₂O, 5 µl PCR buffer, 5 µl MgCl₂, 1 µl dNTP (10 mM), 0.5 µl Primer Lis 1A (50 pmol), 0.5 µl Primer Lis 1B (50 pmol), 0.4 µl Taq DNA polymeraz ve 3 µl Template DNA). PCR cihazı (thermal cycler), başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dk. olmak üzere, 95°C'de 15 sn. denatürasyon, 58°C'de 30 sn. birleşme ve 72°C'de 50 sn. ekstensiyondan oluşan 30 siklus ve 72°C'de 10 dk. son ekstensiyondan oluşacak şekilde programlandı^{39,40}.

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak amacıyla agaroz jel tekniği kullanıldı. Jeldeki ilk çukura DNA marker'ı (Gene Ruler "1kb plus" MBI Fermentas) 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 görüntülendi.

BULGULAR

Süt Örneklerinden *Listeria* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Yapılan çalışmada 250 süt numunesi kültürel olarak değerlendirildi. Yapılan izolasyon ve identifikasyon sonucunda sadece 2 numunedan (%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.

Vajinal Sıvap Örneklerinden *Listeria* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyon 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'si de (%0.8) *L. innocua* olarak identifiye edildi. Atık yapmış 96 ineğin vajinal sıvap örneklerinin 8'inden (%8.3) *Listeria* spp. izole edilmiştir. Bu 8 izolatin 5'i *L. monocytogenes*, 2'si *L. welshimeri* ve 1 tanesi de *L. seeligeri* olarak identifiye edilmiştir.

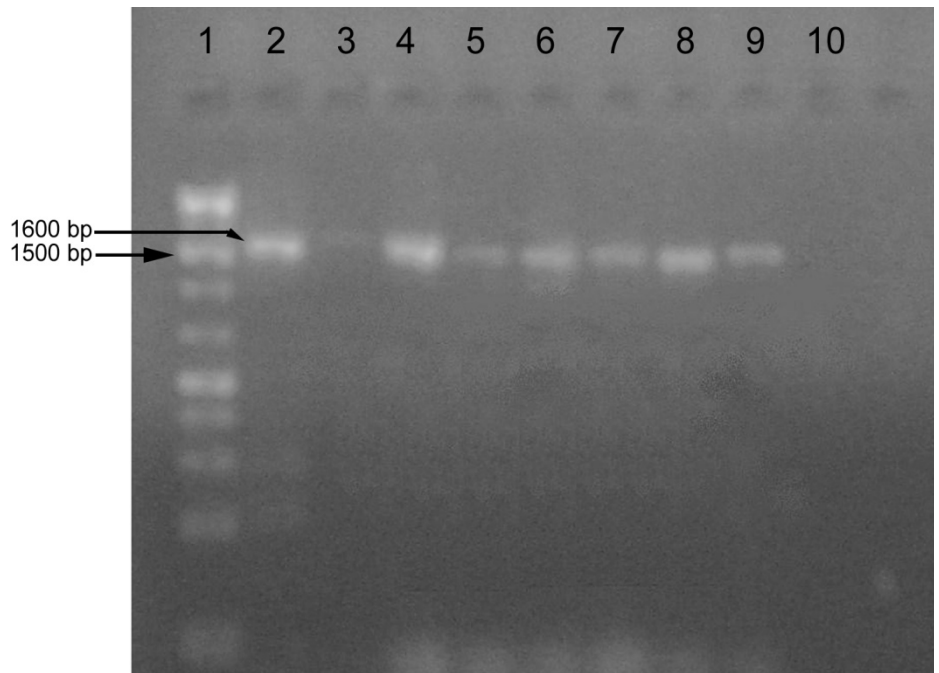
Sonuç olarak süt ve vajinal sıvap örneklerinden izole edilen toplam 16 *Listeria* spp.'nin 10'u (%10.4) atık yaptığı bilinen 96 inekten izole ve identifiye edilmiştir.

PCR Bulguları

PCR yöntemi ile 16 izolattan 27S, 14V, 19V, 242V ve 244V olmak üzere 5 izolatin ve referans suşların 1.6 kb bant oluşturdukları tespit edildi (Şekil 1).

Şekil 1. İzolatlara uygulanan *iap* gen bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Listeria* DNA'sının %1.5'lük agaroz jeldeki görüntüsü. 1 nolu kolon; 1 kb DNA step ladder plus marker, 2-4 nolu kolonlar; pozitif kontroller, 5-9 nolu kolonlar; izolatlar, 10 nolu kolon; negatif kontrol

Fig 1. An agarose gel picture of amplified products from *Listeria* by *iap* based PCR. Lane 1. DNA ladder (1 kb step marker, Fermentas MBI), Lane 2-4. Positive controls, Lane 5-9. *Listeria* isolates, Lane 10. Negative control



TARTIŞMA ve SONUÇ

Listeriozis, dünyanın birçok ülkesinde hayvan ve insanlarda sporadik ve endemik olarak görülen, infeksiyöz ve zoonotik bir hastalıktır¹². İnfeksiyon hayvanlarda septisemi, meningoensefalitis ve abort sonucu önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalık infekte 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^{8,10}.

Kennerman ve ark.⁴⁸ Bursa Yöresi'nde yaptıkları *L. monocytogenes* antikor seroprevalans çalışmasında, silajla beslenen sığırların %57.5'lük seropozitiflik oranlarının silajla beslenmeyenlerin %18.3'lük seropozitiflik oranından istatistik olarak daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Abay ve Aydın⁴⁹ 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. Ayrıca Şahin ve Beytut⁵⁰ tarafından, Kars Yöresi'nde 2004 yılının Mart ayında, 5 adet koyun atık fütüslerinin karaciğer ve akciğerlerinden *L. ivanovii* izole edildiği rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, vajinal sıvı 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 faktörlerin de varlığını ortaya koymaktadır. Bölgemizdeki kış şartlarının uzun sürmesi ve şiddetli soğuklar nedeniyle hayvanların çok uzun süre kapalı kalmalarının oluşturduğu stresin, infeksiyonun oluşmasında 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 olmaları infeksiyon riskini artırabilmektedir.

Kısa zaman periyodunda izolasyon sağlanması ve kullanılan kimyasal maddelerle diğer mikroorganizmaların baskılanmasının maksimum düzeyde sağlanabilmesi nedeniyle bu çalışmada *Listeria* türlerinin izolasyonu amacıyla FDA'nın bildirdiği yöntem seçilmiştir. Gün²¹, sütlerden *Listeria* izolasyonunda FDA yöntemi ile 24 ve 48 saatlik zenginleştirmenin yeterli olduğu ve daha uzun süreli zenginleştirmelerin anlamsız ve gereksiz zaman kaybına yol açacağını vurgulamıştır. Güven³³ ise yaptığı çalışmada LSA besiyerinin *Listeria* türleri için, Modifiye McBride Agar (MMBA) ve McBride Agar (MBA) besiyerlerinden daha iyi izolasyon sağladığını ayrıca FDA'nın bildirdiği yöntemde 48 saatlik zenginleştirmenin 7 günlük zenginleştirmeden daha başarılı olduğunu bildirmiştir. Besiyerleri değeri-

dirildiğinde, 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 gözlemlendi.

Yapılan çalışmada 250 süt numunesinin, sadece 2'sinden (%0.8) *L. monocytogenes* izole edildi. Rawool ve ark.⁵¹ 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. Çalışmadaki bulgular ile Rawool ve ark.'nın 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) olmuştur⁵². Parihar ve ark.⁵³ 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. 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.

Ertaş⁹ Elazığ ilinde yaptığı çalışmada, atık yapmış koyunlardan aldığı 50 süt örneğinden *Listeria* cinsi bakteri izole edememiştir. Hasöksüz³⁴ 100 koyun süt örneğinin FDA yöntemi ile yaptığı izolasyon çalışmasında PALCAM Agar ve LSA besiyeri kullanmış ve *Listeria* türü izole edemediğini bildirmiştir. 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. Hasöksüz'ün çalışmasında ise *Listeria* türü izole edememesini, herhangi bir semptom göstermeyen koyunlardan alınan süt örneklerinin çalışılmasına ve sayısının 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 edilmiştir⁵⁴. Sivas ilinde yapılan çalışmada, FDA yöntemi ve 4°C'de uygulanan iki aşamalı zenginleştirme tekniği kullanılarak 100 çiğ süt örneği incelenmiş, izolasyon sonucunda 4 (%4) *L. monocytogenes* ve 2 (%2) *L. innocua* olmak üzere, toplam %6 oranında *Listeria* spp. tespit edilmiştir. Araştırmacılar iki aşamalı zenginleştirmenin FDA

yönteminden daha iyi sonuç vermesine rağmen, yöntemin 21 gün sürmesinin zaman açısından olumsuz bir durum olduğunu bildirmektedir⁵⁵. İstanbul Anadolu yakasındaki büyükbaş hayvan çiftliklerinden toplanan 370 çiğ süt ve marketlerden toplanan 186 sert peynir örneği incelenmiştir. Kültürel olarak 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 edilmiştir⁵⁶. Uysal ve Ağı⁵⁷ 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. 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 edilmiştir⁵⁸. 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 edilmiştir⁵⁹. Sonuçlar değerlendirildiğinde süt ve işlenmiş süt ürünlerinde listerial kontaminasyonun çok fazla olduğu görülmektedir. Bu da çoğunlukla, yeterince hijyen kurallarına uyulmadığı gerçeğini akla getirmektedir.

Yapılan çalışmada kullanılan 250 vajinal sıvı 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 tanımlanmıştır. Chaudhari ve ark.⁶⁰ da Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada bufalolardan aldıkları 125 vajinal sıvı 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. Sonuçlar karşılaştırıldığında izolasyon oranlarının son derece benzer olduğu görülmektedir. Parihar ve ark.⁵³, genital sistem hastalığı bulunan 20 inekten alınan serviko-vajinal sıvı örneklerini *Listeria* spp. yönünden incelemiş, 4'ünden (%20) *Listeria* spp. izole etmişlerdir. İzolatların 2'si (%10) *L. monocytogenes* ve 2'si de (%10) *L. innocua* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen izolasyon oranları ise bizim oranlarımızdan oldukça fazladır. Bunun sebebi sadece genital sistem hastalığı bulunan ineklerden örneklerin alınmış olmasına ve örnek sayısının azlığına bağlanabilir. Yürütülen bu çalışmada da sadece atık yapan 96 inek dikkate alındığında, vajinal sıvı örneklerinden *Listeria* izolasyon oranının %8.3 olduğu görülmektedir. Ayrıca atık vakalarının birçoğunun eski olduğu da göz önüne alınırsa bu oranın makul olduğu düşünülebilir.

Holko ve ark.⁴¹ 60 peynir ve 30 çiğ süt örneğini kültürel

ve Nested PCR yöntemiyle incelemişler; kültür yönteminde 24 saatlik zenginleştirme sonrası 12, 48 saatlik zenginleştirme sonrası 18 pozitif sonuç alınırken PCR ile de 18 örneğin pozitif tespit edildiğini bildirmişlerdir. Kültür yönteminde işlemler 5-10 gün sürmekte oysa PCR iki gün gibi kısa bir sürede sonuçlanmaktadır. Ayrıca başka laboratuvarlarda identifikasyonu yapılmış 60 izolatla yapılan çalışma ile de gösterilmiştir ki, nonhemolitik *L. monocytogenes* ile *L. innocua*'nın geleneksel biyokimyasal yöntemlerle ayrımı daha zordur⁴¹.

Kültürel yöntemlerle izole ve tanımlanmış 16 *Listeria* izolatının PCR yöntemi ile, 27S, 14V, 19V, 242V ve 244V numaralı izolatları (%31.25) pozitif olarak tespit edilmiştir. Rawool ve ark.⁵¹ yaptıkları çalışmada izole ettikleri 5 *Listeria* izolatına *iap* genini hedef alan PCR uygulamışlar ve 3 izolatta pozitif sonuç almışlardır. Ayrıca virülensi belirleyen diğer genleri, *plcA*, *prfA*, *actA* ve *hlyA*'yı hedef alan PCR işlemlerinin hiçbirisinde 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* enfeksiyonuna maruz kalan hayvanların atık fütüsleri, salgıları ve sütleri çevresel kontaminasyona sebep olurlar. Enfeksiyonda 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 enfeksiyonlarda silaj önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan birçok araştırma, uygun şartlarda hazırlanmayan ve muhafaza edilmeyen silajların listerial enfeksiyon için tehlike arz ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmanın yapıldığı Kars yöresinde atık yapan sığırların sütleri ile *L. monocytogenes*'i çevreye yaydıkları ve bunun sonucunda da hayvancılıkla uğraşanların ve bu sütleri tüketenlerin listerial enfeksiyonlara maruz kalabileceği kanaatine varılmıştır. Aynı sürüdeki hayvanların da enfeksiyona maruz kalabileceği ve bunun sonucunda daha büyük ekonomik kayıpların oluşacağı düşünülebilir. Yaklaşık 400 bin baş sığırın bulunduğu ve yıllık 285 bin ton inek sütü üretiminin olduğu yöremizde insan ve hayvan sağlığının listerial enfeksiyonlar 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 ve sağlık personelinin infeksiyonlar hakkında bilgilendirilmelerine önem verilmelidir. Ayrıca konuya ilişkin daha kapsamlı çalışmaların planlanarak uygulamaya konması, halk sağlığı açısından önemli olduğu gibi ekonomik faydalar da sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Arda G:** Süt ve süt ürünlerinde *Listeria* varlığının araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Genelkurmay Başkanlığı, İstanbul, 1994.
2. **Ekici K, İşleyici Ö, Sağun E:** Süt ve süt ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 15 (1-2): 97-101, 2004.
3. **George SM, Lund BM, Brocklehurst TF:** The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 6, 153-156, 1988.
4. **Lovett J:** Taxonomy and general characteristics of *Listeria* spp. In, Miller AJ, Smith JL, Somkuti GA (Eds): Foodborne Listeriosis. Society for Industrial Microbiology, Chapter: 3, pp. 9-12, Elsevier Science Pub, Newyork, 1990.
5. **Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV:** Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev*, 4 (2): 169-183, 1991.
6. **Seeliger HPR, Jones D:** Genus *Listeria* Pirie 1940. In, Sneath PAH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2., pp. 1235-1245, The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1986.
7. **Doyle ME:** Virulence Characteristics of *Listeria monocytogenes*. pp. 1-13, Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, 2001.
8. **Doyle MP, Schoeni JL:** Selective-Enrichment Procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. *Appl Environ Microbiol*, 51 (5): 1127-1129, 1986.
9. **Ertaş HB:** Elazığ bölgesinde koyun ve keçi sütlerinden *Listeria* türlerinin izolasyonu. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 1997.
10. **Hayes PS, Graves LM, Ajello GW, Swaminathan B, Weaver RE, Wenger JD, Schuchat A, Broome CV and Listeria Study Group:** Comparison of Cold Enrichment and U.S. Department of Agriculture Methods for isolating *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated food. *Appl Environ Microbiol*, 57 (8): 2109-2113, 1991.
11. **Ayaz ND, Erol İ:** *Listeria monocytogenes*'in önemi ve virülens faktörleri. <http://www.kku.edu.tr>. *Erişim tarihi:* 15.01.2008.
12. **Gellin BG, Broome CV:** Listeriosis. *J Am Med Assoc*, 261 (9): 1313-1320, 1989.
13. **Gray ML:** Epidemiological aspects of Listeriosis. *Am J Public Health Nations Health*, 53, 554-563, 1963.
14. **Gray ML, Killinger AH:** *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev*, 30, 309-382, 1966.
15. **Picoux JB:** Ovine listeriosis. *Small Ruminant Research*, 76, 12-20, 2008.
16. **Seeliger HPR:** Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. *Clin Invest Med*, 7 (4): 217-221, 1984.
17. **Seeliger HPR:** Listeriosis-History and Actual Developments. *Infection*, 16 (Suppl. 2): 80-84, 1988.
18. **Kılınc B:** Su ürünlerinde *Listeria monocytogenes*. *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, 18 (3-4): 565-574, 2001.
19. **Pini PN, Gilbert RJ:** A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. *Int J Food Microbiol*, 7, 331-337, 1988.
20. **Parihar VS, Barbuddhe SB, Danielsson-Tham ML, Tham W:** Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control*, 19, 566-569, 2008.
21. **Gün H:** İstanbul ve yöresindeki sağlıklı ineklerin sütlerinde *Listeria* türlerinin izolasyon, identifikasyon ve patojenitesi üzerine araştırmalar. *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1994.
22. **Gahan CGM, Hill C:** Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J Appl Microbiol*, 98, 1345-53, 2005.
23. **Anonim:** Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. Laboratory Guidebook Notice of Change, 2006. http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_05.pdf. *Accessed:* 17.01.2008.
24. **Anonim:** Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples. http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_8_07.pdf. Laboratory Guidebook Notice of Change, 2009. *Accessed:* 28.10.2009.
25. **Anonim:** *Listeria monocytogenes*. <http://www.mikrobiyoloji.org>. *Erişim tarihi:* 16.01.2008.
26. **Anonim:** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th ed., 2004. <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>. *Accessed:* 07.12.2007.
27. **Aktepe OC:** Ülkemizde Listeriozun insanlardaki durumu. *I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum*, s. 61, 3-6 Aralık 2007.
28. **Erol İ:** Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi Kitabı. s. 126-134, Pozitif Matbaacılık, Ankara, 2007.
29. **Lorber B:** Listeriosis. *Clin Infect Dis*, 24, 1-11, 1997.
30. **Anonim:** *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Kenneth Todar University of Wisconsin-madison Department of Bacteriology. Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2008. <http://www.textbookofbacteriology.net/Listeria.html>. *Accessed:* 01.05.2008.
31. **Erdoğan HM:** An epidemiological study of listeriosis in dairy cattle. *PhD Thesis*, Bristol Universty, Bristol, UK. 1998.
32. **Erdoğan HM, Gökçe G, Gökçe Hİ, Kırmızıgül AH, Güneş V, Sural E, Yılmaz K:** Kars Yöresi'ndeki sığırlarda *Listeria monocytogenes* infeksiyonlarının ELISA yöntemi ile araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 5 (1): 43-46, 1999.
33. **Güven A:** Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde *Listeria* türlerinin araştırılması. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 1994.
34. **Hasöksüz M, Ilgaz A:** Marmara Bölgesindeki sağlam koyunların kan serumlarında ELISA yöntemi ile *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşan antikorların saptanması ve listeriosis üzerinde etiyolojik-epizootolojik çalışmalar. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 26, 157-174, 2000.
35. **İkiz S:** Listeriozun Laboratuvar tanısı. *I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum*, s. 62-64, 3-6 Aralık 2007.
36. **Kennerman E, Erdoğan HM, Şentürk S, Gölçü E:** Bursa bölgesindeki koyunlarda Listeriosis ELISA ile serolojik tanısı. *Vet Cerrahi Derg*, 6 (3-4): 22-25, 2000.
37. **Donnelly CW, Baigent GJ:** Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl Environ Microbiol*, 52 (4): 689-695, 1986.
38. **Evanson DJ, Klatt MJ, Donlevy TP, Flowers RS:** Agar-based 24-H Method for presumptive identification of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*, 54 (5): 370-371, 1991.
39. **Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M:** Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*, 65 (10): 4688-4692, 1999.
40. **Bubert A, Köhler S, Goebel W:** The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 58 (8): 2625-2632, 1992.
41. **Holko I, Urbanova J, Kantikova M, Pastorova K, Kmet V:** PCR detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. *Acta Vet Brno*, 71, 125-131, 2002.
42. **Anonim:** Kars Tarım İl Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şube Müdürlüğü, 2009 yılı hayvan mevcutları verileri. <http://www.karstarim.gov.tr/>. *Erişim tarihi:* 01.10.2009.
43. **Anonim:** Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK): Büyükbaş hayvan sayıları. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13. *Erişim tarihi:* 01.10.2009.

- 44. Post DE:** Food-borne Pathogens. Monograph Number 2 (Listeria). pp. 3-25, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England, 1997.
- 45. Gorski L:** Identification and detection. Phenotypic identification. In, Liu D (Ed): Handbook of *Listeria monocytogenes*. pp. 139-168, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2008.
- 46. Warburton DW, Farber JM, Armstrong A, Caldeira R, Hunt T, Messier S, Plante R, Tiwari NP, Vinet J:** A comparative study of the 'FDA' and 'USDA' methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol*, 13, 105-118, 1991.
- 47. Sambrook J, Russell D:** Molecular cloning: A laboratory manual. Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, America. 2001.
- 48. Kennerman E, Babür C, Kılıç S:** Determination of seroprevalence of *Listeria monocytogenes* antibodies in cattle in Bursa province of Turkey. *Uludağ Univ Vet Fak Derg*, 24, 95-98, 2005.
- 49. Abay S, Aydın F:** Sağlıklı sığırların dışkılarından *Listeria* spp. izolasyonu ve identifikasyonu. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14 (3): 191-197, 2005.
- 50. Şahin M, Beytut E:** Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* in the Kars region. *Türk J Vet Anim Sci*, 30, 503-506, 2006.
- 51. Rawool DB, Malik SVS, Shakuntala I, Sahare AM, Barbuddhe SB:** Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *Int J Food Microbiol*, 113, 201-207, 2007.
- 52. Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB:** *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. *J Food Control*, 19, 109-112, 2008.
- 53. Parihar VS, Barbuddhe SB, Chakurkar EB, Danielsson-Tham ML, 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 J Comp Microbiol Immunol Infect Dis*, 28 (1): 1-5, 2007.
- 54. Eskiizmirli SN:** İzmir Bölgesi mastitisli inek sütlerinden *Listeria* spp. izolasyonu. *Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg*, 21 (35): 43-53, 1996.
- 55. Ünlü GV, Ünlü M, Bakıcı MZ:** Incidence of *Listeria* spp. from raw milk in Sivas. *Türk J Med Sci*, 28, 389-392, 1998.
- 56. Arda G, Özsoy MF, Koçak N, Çavuşlu Ş, Keskin K, Yenen OŞ:** Süt ve süt ürünlerinde *Listeria* araştırılması. *Klimik Derg*, 9 (3): 152-155, 1996.
- 57. Uysal HK, Anğ Ö:** Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Listeria* türleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 33, 163-169, 2003.
- 58. Sancak YC, İşleyici Ö, Elibol C, Ekici K:** Van'da tüketime sunulan kremalı pastalarda *Listeria* türlerinin varlığının belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 13 (1-2): 8-11, 2002.
- 59. Hayes PS, Feeley JC, Graves LM, Ajello GW, Fleming DW:** Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Appl Environ Microbiol*, 51 (2): 438-440, 1986.
- 60. Chaudhari SP, Malik SVS, Chatlod LR, Barbuddhe SB:** Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* and detection of antibodies against phosphatidylinositol-specific phospholipase C in buffaloes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27 (2): 141-148, 2004.