T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLATLARININ BAZI VİRULENS GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Adem ADIGÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Oktay KESKİN

ŞANLIURFA
2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLATLARININ BAZI VİRULENS GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Adem ADIGÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Oktay KESKİN

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20128 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle çalışmalarıma yön veren, ilgisini ve emeğini esirgemeden, her konuda destek olan değerli danışman hocam Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Oktay KESKİN'e ve Yüksek Lisans eğitimim ve laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Murat SAYTEKİN ve Arş. Gör. Afer Güllü YÜCETEPE ile birlikte Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı değerli hocalarım Prof. Dr. Osman Yaşar TEL ve Prof. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi maddi olarak destekleyen Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne;

Eğitim hayatım boyunca benimle yakından ilgilenen ve herzaman fikirlerinden yararlandığım değerli amcam Prof. Dr. Abdullah ADIGÜZEL'e;

Yüksek lisans eğitimim sürecinde tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen ve bana herzaman yardımcı olan Gıda Yük. Müh. Osman YAHYAOĞLU'na, öneri ve yorumlarıyla tezime katkıda bulunan arkadaşlarım Dr. Şahabettin DAĞHAN, Ahmet Arif PALALI ve Furkan YENİÇERİ'ye;

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle daima yanımda olan değerli aileme, bu süreçte sabır ve anlayışla beni destekleyen sevgili eşime ve oğlum Yahya'ya teşekkür ederim.

Son olarak bu tezi rahmetli anneme ithaf ediyorum.

Adem ADIGÜZEL
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR……i
İÇİNDEKİLER……...ii
ŞEKİLLER DİZİNİ……...iii
TABLOLAR DİZİNİ……...…….iv
KISALTMALAR DİZİNİ…….....v
ÖZET……..……....vi
ABSTRACT……...……vii
1. GİRİŞ……..….1
2. GENEL BİLGİLER……....4
2.1.Tarihçe……..…….……4
2.2.Lısterıa Monocytogenes'ın Taksonomisi……..…….……...4
2.3.Lısterıa Monocytogenes'ın Etiyolojisi ve Biyokimyasal Özellikleri…….9
2.4.Lısterıa Monocytogenes'ın Epidemiyolojisi……11
2.5.Lısterıa Monocytogenes'de Patogenez……12
2.6.Lısterıa Monocytogenes'de Klinik…....……..……..13
2.7.Lısterıa Monocytogenes'ın Virulens Genleri……...13
3. GEREÇ VE YÖNTEM…….....…….…...…17
3.1.Gereç…….……17
3.1.1. Listeria İzolatlari ve Referans Suşlar……..……..…17
3.1.2. Listeria Besiyerleri…….....…….……17
3.1.3. Listeria Moleküler Analiz Gereçleri…….....…….....18
3.2.Yöntem…….……19
3.2.1. Moleküler Yöntemlerle inlA, inlC, inlJ, hlyA Gen Bölgelerinin Araştırılması……19
3.2.2. *inl*A, *inl*C, *inl*J, *hly*A Gen Bölgelerinin Araştırılması İçin PCR Yöntemi……19
3.2.3. Elektroforez Yöntemi……..20
4. BULGULAR……21
5. TARTIŞMA……25
6. SONUÇ VE ÖNERİLER……31
7. KAYNAKLAR……...……..……...32
8. EKLER…….…....42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. *Listeria* genusunun 16S ve 23S rRNA, *iap*, *prs*, *vcl*B ve *ldh* genlerinin analizlerini temel alan filogenetik şeması……6

Şekil 4.1. *L. monocytogenes* virulens genlerinin (*inl*A-800 bp, *inl*C-517 bp, *hyl*A- 388 bp, *inl*J-238 bp) multipleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agar jel (%1,5) elektroforez görüntüsü…….21

Şekil 4.2. *L. monocytogenes* virulens genlerinin (*inl*A-800 bp, *inl*C-517 bp, *hyl*A-388 bp, *inl*J-238 bp) multipleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agar jel (%1,5) elektroforez görüntüsü…….22

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. *Listeria monocytogenes* Taksonomisinin Tarihsel Gelişimi……5

Tablo 2.2. *Listeria* cinsinin serovarları……..8

Tablo 2.3. *Listeria*'ların üreme koşulları…….....9

Tablo 2.4. *Listeria* türlerinin fenotipik tanımlaması için metodolojik bir system……10

Tablo 2.5. L. monocytogenes'in virulens genleri…….14

Tablo 3.1. İncelenen izolat sayısı ve orijinleri……...17

Tablo 3.2. Multipleks PCR protokolünde araştırılan *L. monocytogenes* virulens genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primerler……..……...18

Tablo 4.1. Multipleks PCR ile araştırılan *L. monocytogenes* virulens genlerinin izolatlara göre belirlenen dağılımı……...23

Tablo 4.2. İncelenen *L. monocytogenes* izolatlarının orjinlerine göre *inl*A, *inl*C, *inl*J ve *hyl*A genlerinin varlığı yönünden pozirif bulunan izolat sayıları ve oranlar……..…….24

KISALTMALAR

AIDS	**:**	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Aw	**:**	Activity of Water – (Su Aktivitesi)
DNA	**:**	Deoxyribonucleic Acid
***inl*A**	**:**	Internalin A
***inl*C**	**:**	Internalin C
***inl*J**	**:**	Internalin J
***hly*A**	**:**	Hemolysin A
Maks	**:**	Maksimum
MALDI-TOF MS	**:**	Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
Min	**:**	Minimum
PCR	**:**	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pH	**:**	Power of Hidrogen
***prf*A**	**:**	Positive Regulatory Factor A
RNA	**:**	Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
rRNA	**:**	Ribonucleic Acid – (Ribonükleik Asit)
TSA	**:**	Tryptone Soya Agar
Taq olymerase	**:**	Thermostable DNA Polymerase

ÖZET

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *LISTERIA MONOCYTOGENES* İZOLATLARININ BAZI VİRULENS GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Adem ADIGÜZEL

Veteriner Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışmada klinik ve gıda kaynaklı *L. monocytogenes* izolatlarında türe özgü listeriolizin O ve internalin A moleküllerini kodlayan *hyl*A ve *inl*A genleri ile virulensi belirleyen internalin C ve internalin J moleküllerini kodlayan *inl*C ve *inl*J genlerinin varlığının araştırılması ve izolatlarda bu 4 genin varlığının analizi için bir multipleks PCR protololünün oluşturulması amaçlandı. Bu amaçla 7 klinik ve 21 gıda orijinli olmak üzere toplam 28 *L. monocytogenes* izolatı kullanıldı. Çalışma sonucunda 6'sı klinik ve 12'si gıda orjinli olmak üzere toplam 18 izolat araştırılan 4 genin varlığı yönünden de pozitif olarak belirlenirken koyun beyninden elde edilen 1 izolat ve gıda orjinli 2 izolatın *inl*J ve *hyl*A gen varlığı yönünden pozitif olduğu saptandı. Ayrıca gıda orijinli 2 izolat *inl*A ve *hyl*A genleri yönünden pozitif olarak belirlendi. Analiz edilen 4 izolatda ise araştırılan genlerin hiç birisi tespit edilemedi. Klinik orijinli izolatlar *inl*A ve *inl*C genleri yönünden %85,7 oranında ve *inl*J ve *hyl*A genleri yönünden ise %100 oranında pozitif bulundu. Gıda kaynaklı izolatlar *inl*A, *inl*C, *inl*J ve *hyl*A genlerinin varlığı yönünden sırasıyla %66,7; %76,2; %71,4 ve %80,1 oranında pozitif olarak belirlendi. Bu verilere göre ikisi tür spesifik, ikisi de virulens belirteci olmak üzere 4 gen bölgesinin tespit edilmesi için tasarlanan multipleks PCR tekniğinin hızlı ve kullanılabilir bir teknik olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hayvan, gıda, *Listeria monocytogenes,* multipleks PCR, virulens genleri.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME VIRULENCE GENES OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES

Adem ADIGÜZEL

Department of Veterinary Microbiology, Master Thesis

In this study, was aimed that to detect *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genes, which encode listeriolysin O, internalin A, internalin C and internalin J in, *L. monocytogenes* isolates from clinical and food originated samples. The first two genes encode respective proteins based on species specific, while the latters encodes molecules responsible for virulence. We also planned to establish a multiplex PCR protocol that enables to detect of all four genes together. A total of 28 *L. monocytogenes* isolates obtained from 7 clinical and 21 food originated sample were used in the study. As a result of the study, a total of 18 isolates including 6 of clinical origin and 12 of food origin, were found to be positive in terms of the presence of the four genes investigated, while 1 isolate, obtained from sheep brain, and 2 isolates, recovered from food origin, were found to be positive for the presence of *inlJ* and *hyl*A genes.

In addition, 2 isolates of food origin were positive for inlA and hylA genes. None of the investigated genes could be detected in the 4 isolates analyzed. The clinical origin isolates were found to be positive in 85.7% for inlA and inlC genes, and 100% positive for inlJ and hylA genes. The isolates of food origin were detected to be positive for the presence of *inl*A, *inl*C, *inl*J and *hyl*A genes at the rate of 66.7% , 76.2%, 71.4%, and 80.1% respectively. Based on these data, it was concluded that the multiplex PCR technique, designed to detect 4 gene regions, two of which is species specific and two of which are virulence markers, is a fast and usable technique. Based on these results, it is thought that multiplex PCR designed were found as a fast and useful technique to detect four genes, which are species-specific and virulence indicators.

Keywords: Animal, food, *Listeria monocytogenes*, multiplex PCR, virulence genes.

1. GİRİŞ

Listeria monocytogenes, olumsuz çevre koşulları dahil her yerde bulunabilen bir patojen olmasından dolayı insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olan gıda kaynaklı bir patojendir. İnsanlarda nadir olmakla birlikte, tüm dünyada sporadik ve epidemik formlarda ortaya çıkabilmektedir (1).

Listeria cinsinin sahip olduğu patojenite özelliği bakımından sadece iki türü dikkat çekmektedir. Bunlardan *L. monocytogenes* insanlarda ve hayvanlarda, *Listeria ivanovii* ise memeli hayvanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bunun yanısıra *L. ivanovii* ve *Listeria seeligeri* türleri de insanlarda hastalık yapabilmektedir. *L. monocytogenes*, çevrede çok geniş bir alanda yaşayabilmektedir. Tipik olarak *L. monocytogenes* saprofitik bir yaşam sürdürmekte ve genellikle toprakta, bitki örtüsünde ve hayvan dışkısında bulunmaktadır. Ayrıca, gıdaların hazırlanmasında soğuk sıcak uygulamaları ile, kurutma ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi antibakteriyel önlemlere karşıda oldukça dirençli bir mikroorganizmadır. Bu nedenlerle, etkenin yaygın bir gıda patojeni haline gelmesi beklenirken *L. monocytogenes*'in enfektif dozunun yüksek olması Listeriozis'in, sporadik vakalar olarak kalmasını sağlamaktadır (2).

Genel olarak *L. monocytogenes* bitki artıklarında, toprakta ve tüketim sularında bulunmakla birlikte silaj, kanalizasyon, mezbaha atıkları, sağlıklı ve mastitisli ineklerde, insan ve hayvan dışkısında da bulunmaktadır (3).

Fırsatçı patojen olarak bilinen *L. monocytogenes*, risk altında bulunan insan ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara sebeb olabilmektedir. Bu hücre içi fakültatif bakteri çevrede yaygın olmakla birlikte kontamine gıdaların tüketilmesi yoluyla da enfeksiyonları oluşturmaktadır (3).

Yapılan araştırmalar neticesinde, hayvan listeriyozunun çoğunlukla depolanan yemlerin özellikle de silaj tüketilmesi ve başlıca kontaminasyon kaynağı olarakta çevre ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu saprofitik mikroorganizma, çevreden hayvan

yemine bulaştığı gibi toprakta, suda ve çürüyen sebzelerde de canlı formunu koruyabilmektedir (4). Bu nedenle silaj *L. monocytogenes*'in en sık rastlandığı kaynaktır (5). *L. monocytogenes* ile enfekte olmuş gıdaların tüketilmesi insanlarda ve hayvanlarda listeriozise neden olur (6)**.** Listeriozis tipik olarak septisemi, meningitis, meningoensefalit ve abortus gibi çeşitli belirtilerle ortaya çıkmaktadır. İnsanda listeriozis enfeksiyonun erken evresinde genelde spesifik olmayan grip ve gastroenteritis benzeri semptomlar (örn., titreme, yorgunluk, baş ağrısı, kas ve eklem ağrısı) göstermektedir. Etken hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olurken özellikle, büyük baş hayvanlarda abortus ve ensefalite sebep olmaktadır (7).

L. monocytogenes memeliler, kuşlar, balıklar ve kabuklular dahil birçok hayvan türünü enfekte edilebilmektedir, bununla birlikte çoğu klinik listeriozis vakası ruminantlarda görülmektedir. Özellikle koyunlar *L. monocytogenes* gibi bakterilere karşı oldukça hassastır. Ruminantlarda listeriozis; ensefalitis, abortus ve septisemi şeklinde görülür. Enfekte hayvanlar, genel olarak denge kaybı, daire çizmesi ve sık rastlanmayan vücut spazmları gibi ciddi nörolojik belirtiler göstermektedir. Genel olarak ateş, iştahsızlık ve hareketlerde yavaşlama görülür. Listeriozisin genelikle kış ve ilkbahar başlarında ruminantlarda ortaya çıkmasının muhtemel nedeni hayvanların kalitesiz silaj yemeleriyle ilişkilendirilir (9). Listeriozis domuzlarda nadiren görülür, kuşlar ise organizmanın genellikle subklinik taşıyıcılarıdır (8).

Koyun ve keçilerde hastalığın seyri hızlı gelişmekte ve klinik belirtilerin görülmesiyle birlikte 24-48 saat sonrasında ise ölüm gerçekleşebilmektedir. Fakat hızlı ve etkili bir tedavinin uygulanmasıyla iyileşme oranı %30'a kadar çıkabilmektedir. Sığırlarda hastalığın seyri daha yavaş olmakla birlikte iyileşme oranı %50' ye çıkabilmektedir (10).

Etkenin çevredeki geniş dağılımına ve gıdalardaki nispeten yüksek izolasyonuna rağmen, genel popülasyonda listeriozis insidansı düşüktür. Sistemik listeriozis insidansı, hamile kadınlar, yaşlılar, şeker hastaları, alkol bağımlıları, AIDS hastaları, böbrek hastaları gibi bağışıklık sistemi zayıf olan bireyler dahil duyarlı popülasyonlarda çok daha yüksektir (6,11). Bununla birlikte, enfeksiyon, hastalığa yakalanacak hiçbir yatkınlığı olmayan kişilerde de ortaya çıkabilmektedir (1). Ayrıca invaziv listeriosis, hamile kadınlarda abortusa ve bağışıklığı baskılanmış kişilerde menenjite yol açar. 2017-2018

de Güney Afrika'daki listeriozis salgınında, enfekte olanların çoğu bebekler ve hamile kadınların oluşturduğu 1000'den fazla vakanın görüldüğü ve bu vakalarda ise %42'lik bir ölüm oranın kaydedildiği bildirilmiştir (12).

Gıda enfeksiyonlarına ve intoksikasyonlarına neden olan birçok mikroorganizmanın içerisinden patojenik etkileri nedeniyle bazıları daha fazla öneme sahiptir. Bu patojen grup içerisinde başlıca etkenlerden biri *L. monocytogenes*'dir(13).

Özellikle bu bakterinin, gıda işleme ortamlarında bulunma ihtimalinin yüksek olması ve düşük sıcaklıklarda dahil üreyebilmesi, gıda endüstrisi ve gıda güvenliği açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir (7). Bu sebeplerden dolayı gıda kökenli bir patojen olarak *L. monocytogenes*'in ekonomi ve halk sağlığı üzerine önemli etkileri bulunmaktadır (14)**.** *L. monocytogenes*, çiğ süt, pastörize süt ve peynir dahil olmak üzere süt ürünlerinin kontamine gıdalar olarak görüldüğü büyük gıda kaynaklı salgınlara neden olabilmektedir (15).

Dolayısıyla *L. monocytogenes*'in gıdalardan hızlı ve güvenilir metotlarla tespiti ve identifiye edilmesi halk sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. (14).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Hayem 1891'de Fransa'da, Henle de 1893'te Almanya'da araştırmaları neticesinde insanların dokularında *Listeria* benzeri Gram pozitif çomaklara rastlamışlardır (16).

Hülphers 1911 yılında *Bacillus hepatis* adını verdiği organizmayı bir tavşanın karaciğerindeki nekrotik dokularından izole etti (17). Bu cinse ait türleri işaret eden enfeksiyonlar ilk kez 1920'li yılların ortalarında Murray tarafından açıklığa kavuşturulmuş, bakterinin gıda kaynaklı patojen olduğunun anlaşılması 1980'li yılları bulmuştur. Murray laboratuvar hayvanlarının kanından Gram pozitif çomak şeklinde bakteri izole etmiş, ancak bu patojen bakteriyi o güne kadar bilinen hiçbir cinse dahil edememiş ve etken monositozla ilişkilendirilidiği için bu bakteriye *Bacterium monocytogenes* adını vermiştir. 1920'lerin sonlarında Güney Afrika'daki olağandışı gerbil ölümlerinin ardından, bu bakteri, Pirie tarafından Lord Joseph Lister'in onuruna *Listerella hepatolytica* olarak adlandırılmıştır, bunu takiben 1929 yılında Nyfeldt insanlarda bu bakteriyi saptamış ve *Listerella hominis* olarak isimlendirmiştir (16,18).

Murray ve Pirie yapılan çalışmalar neticesinde aynı tür bakteri ile ilgilendiklerini anlayınca daha önceki isimleri biraraya getirip *Listerella monocytogenes* ismini oluşturmuşlardır (19).

İlerleyen yıllarda *Listerella ovis* gibi isimler de almasına rağmen 1940'ta Pierre tarafından bakterinin bugünkü ismi olan *L. monocytogenes* olarak adlandırılmıştır (Tablo 1) (20).

Tablo 2.1. *Listeria Monocytogenes* Taksonomisinin Tarihsel Gelişimi

Yıl /Araştırmacı	Yer	İsimlendirme	Etken kaynağı
1891 Hayem	Fransa		İnsan
1893 Henle	Almanya		İnsan
1911 Hülpers	İsveç	*Bacillus hepatis*	Tavşan
1926 Murray ve ark..	Cambridge/İngiltere	*Bacterium monocytogene*s	Tavşan, Domuz
1927 Pirie	Güney Afrika	*Listerella hepatolytica*	Gerbil
1927 Leningham	Londra/İngiltere	*Listerella monocytogenes*	
1929 Nyfeld	Danimarka	*Listerella hominis*	İnsan
1937 Gill	Yeni Zelanda	*Listerella ovis*	Koyun
1940 Pierre		*Listeria monocytogenes*	

2.2. *Listeria Monocytogenes*'in Taksonomisi

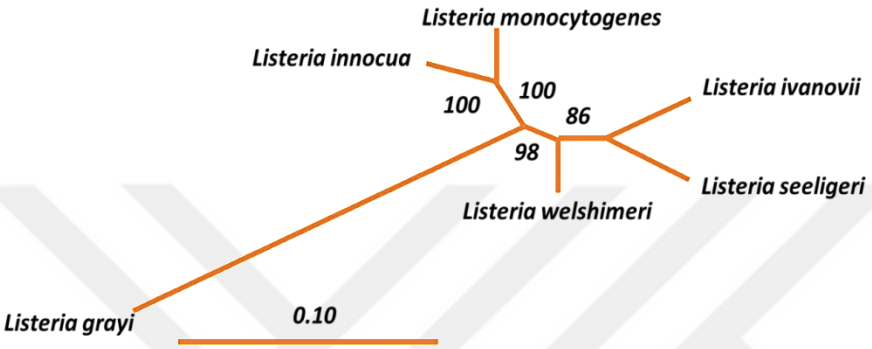
Listeria genusu içerisinde *Listeria aquatica*, *Listeria booriae*, *Listeria cornellensis*, *Listeria cossartiae*, *Listeria costaricensis*, *Listeria denitrificans*, *Listeria farberi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria goaensis*, *Listeria grandensis*, *Listeria grayi*, *Listeria immobilis*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria murrayi*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria portnoyi*, *Listeria riparia*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria rustica*, *Listeria seeligeri* *Listeria thailandensis*, *Listeria valentina*, *Listeria weihenstephanensis* *Listeria welshimeri* olmak üzere 28 tür vardır (21).

Bu türlerden sadece ikisi *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* patojen olarak kabul edilir. *L. monocytogenes*, hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalıklarla en yaygın şekilde ilişkilendirilen *Listeria* türünü temsil eder. Hem *L. ivanovii* hem de *L. monocytogenes* memeli patojenleri iken, *L. ivanovii* nadir görülür ve ağırlıklı olarak geviş getiren hayvanlarda hastalığa neden olur. Bununla birlikte, insanlarda hastalığa neden olan *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* ile ilgili bazı raporlar bulunmaktadır (22).

DNA-DNA hidribizasyonu, multilokus enzim elektroforezi analizi ve 16S rRNA gen sekansı temel alındığında *Listeria* cinsi içinde yer alan altı tür iki gruba ayrılır (Şekil 1).

1. *L. monocytogenes* ve onunla yakın ilişkili türler: *Listeria innocua, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri, Listeria welshimeri*

2. *L. grayi* (23,24).



Şekil 2.1. *Listeria* genusunun 16S ve 23S rRNA, iap, prs, vclB ve ldh genlerinin a nalizlerini temel alan filogenetik şeması

Listeria cinsinin 6 adet Gram pozitif türü çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. *L. monocytogenes* hem insanlar için hemde hayvanlar için patojenikken, *L. ivanovii*'nin genellikle koyun ve sığır gibi memeli hayvanlarda enfeksiyona neden olduğu belirtilmiştir (26).

L. monocytogenes, insan gıda kaynaklı bir patojen olmasından dolayı kamuoyunda büyük bir endişe içermektedir.

***Listeria* sistematiği** (24)

Alem: Bacteria

Bölüm: Firmicutes

Sınıf: Bacilli

Takım: Bacillales

Aile: Listeriaceae

Cins: Listeria

Tür: *L. monocytogenes*

L. monocytogenes izolatları, farklı fakat örtüşen ekolojik nişlere sahip en az 4 evrimsel soyda da kategorize edilebilir. 1/2b, 4b, 3b ve 3c serotiplerinden oluşan Lineage I, yüksek patojeniteleri nedeniyle çoğu insan listeriosis salgını ile ilişkilidir. 1/2a, 1/2c ve 3c serotiplerinden oluşan Lineage II, yaygın olarak gıda, doğa ve çiftliklerden izole edilir. Genellikle hayvan listeriosis ve sporadik insan vakaları ile ilişkilidir. Çoğu, inlA ve prfA'daki erken durdurma kodon mutasyonları (PMSC) nedeniyle virülans açısından zayıflatılmıştır. *L. monocytogenes* izolatları, farklı fakat örtüşen ekolojik nişlere sahip en az 4 evrimsel soyda da kategorize edilebilir. 1/2b, 4b, 3b ve 3c serotiplerinden oluşan Lineage I, yüksek patojeniteleri nedeniyle çoğu insan listeriosis salgını ile ilişkilidir. 1/2a, 1/2c ve 3c serotiplerinden oluşan Lineage II, yaygın olarak gıda, doğa ve çiftliklerden izole edilir. Genellikle hayvan listeriosis ve sporadik insan vakaları ile ilişkilidir. Çoğu, inlA ve prfA'daki erken durdurma kodon mutasyonları (PMSC) nedeniyle virülans açısından zayıflatılmıştır. Soy III ve soy IV, insan listeriosis arasında düşük insidansa sahip oldukları için klinik olarak daha az önemlidir, bu da insan virulansının azaldığını düşündürür (20).

Listeria somatik (O) antijenleri 15 alt tipe ayrılmıştır (I–XV) ve flagellar (H) antijenleri dört alt tipe ayrılır (A–D). Gruba özgü *Listeria* O ve H'nin analizi üzerine antijenler, en az 13 serotip (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) *L. monocytogenes*'de tanınır ancak 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotiplerinin listeriyoz vakalarının %95-98'inden sorumlu olduğu gözlenmiştir (27). Ancak 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotiplerinin listeriyoz vakalarının %95-98'inden sorumlu olduğu gözlenmiştir (28).

Nitekim, 2006 yılında yapılan bir çalışmada, *L. monocytogenes* serovarlarından, serovar 4b'nin tek başına *Listeria* ile ilgili endemik gıda kaynaklı hastalıkların % 49'una sebeb olduğunu göstermiştir (29).

Listeria cinsinin serovarları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Listeria* Cinsinin Serovarları

***Listeria* Türü**	**Serotipler**	**O-antijenleri Somatik**	**H-antijenleri Flagellar**
L. monocytogenes	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B D
	3a	II (III) IV	A B
	3b	II (III) IV (XII) (XIII)	A B C
	3c	II (III) IV (XII) (XIII)	B D
	4a	(III) (V) VII IX	A B C
	4ab	(III) V VI VII IX X	A B C
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	4e	(III) V VI (VIII) (IX)	A B C
	7	(III) XII XIII	A B C
L. ivanovii	5	(III) (V) VI (VIII) X	A B C
L. innocua	6a	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	A B C
	6b	X XI	A B C
L. grayi		(III) XII XIV	E

Türe özgü tanımlamaya benzer şekilde, iki ana alt tipleme yaklaşımı yaygın olarak kullanılmaktadır: fenotipik ve genetik (moleküler veya DNA) alt tipleme Fenotipik alt

tipleme yaklaşımı, serotipleme, faj tiplemesi, multilokus enzim elektroforezi (MLEE) ve esteraz tiplemesi içerir. Genetik alt tipleme yaklaşımı, darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), ribotipleme, PCR tabanlı alt tipleme teknikleri ve tekrarlayan element PCR (REP-PCR)] ve DNA dizilimine dayalı alt tipleme teknikleri. Fenotipik alt tipleme yaklaşımı zaman zaman düşük ayrım ve tekrarlanabilirlikten muzdarip olsa da, genetik alt tipleme yaklaşımı oldukça hassas, ayrımcı ve tekrarlanabilirdir (31).

2.3. *L. Monocytogenes*'in Etiyolojisi ve Biyokimyasal Özellikleri

Listeria türleri kendi içerisinde mikroskobik görüntülerinden dolayı benzerlikler göstermektedirler. *L. monocytogenes*, 0,4-0,5 x 1-2 μm boyutunda, düzgün ve kısa çubuk formundadır. Mikroskobik görüntülemede ise taze kültürler tek veya birkaç bakteriden oluşan kısa zincirli kokobasil olarak görülmektedir. Büyüklük olarak eski kültürlerde, 6-20 μm boyunda flamentöz yapıda görülebilirler (32). Sayıları 1-5 arasında değişiklik gösteren peritrik kamçılarıyla 25 °C' de belirgin bir yuvarlanma hareketi sergiler, 37 °C' de flagella gelişimi yavaş şekillendiğinden hareket fark edilemeyebilir (33).

Düşük pH ve düşük sıcaklıklarda büyüme minimum olmasına rağmen, pH 4.5 9.6'da büyüyebilir. 72 °C 10 saniye pastörizasyon sıcaklığının *Listeria*'ya karşı etkili olduğu bulunmuştur. Eski bakteri kültürlerinde uzun filamentler görülür. Bakteri, konakçının vücudunun dışında nemli atmosferde birkaç yıl canlı kalabilir (8). *Listeria*'ların üreme koşulları Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. *Listeria*'ların Üreme Koşulları (34).

Faktör	Minimum	Optimum	Maksimum
Sıcaklık (ºC)	-1.5	30- 37	37
pH	4.0	6,0-8,0	9.6
aw	0,90	0,97	-
Tuz[%]	-	10%	4°C de 25 %

The Christie, Atkins, Munch–Petersen (CAMP) Testi

CAMP testi, hemolitik listeriaların yani *L. monocytogenes, L. ivanovii* ve *L. seeligeri* türlerinin ayrımında kullanılan başlıca testlerdendir. β-hemolitik *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* kanlı agara birbirine paralel olacak düz bir çizgi şeklinde ekilir. Şüpheli listeria kültürleri de bu çizgilere dik olacak şekilde, birbirine değmeden tek düz çizgi halinde ekilir ve 35°C de 24-48 saat inkubasyona bırakılır. *L. monocytogenes, S. aureus* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur, *R. equi* tarafında herhangi bir hemoliz oluşturmaz. *L. ivanovii, R. equi* çizgisine yakın yerde hemoliz oluşturur. *L. seeligeri* ise *L. monocytogenes*'e göre daha zayıf bir hemoliz oluşturmaktadır (30).

Listeria türlerinin fenotipik tanımlaması için metodolojik bir sistem Tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 2.4. *Listeria* Türlerinin Fenotipik Tanımlaması İçin Metodolojik Bir Sistem

		L. monocytogenes	*L. innocua*	*L. ivanovii*	*L. seeligeri*	*L. welshimeri*	*L. grayİ*
Hemoliz		+	-	+	+	-	-
Katalaz		+	+	+	+	+	+
Oksidaz		-	-	-	-	-	-
Fermantasyon	L-Rhamnose	+	+/-	-	-	+/-	+/-
	D-Mannitol	-	-	-	-	-	+
	D-Xylose	-	-	+	+	+	-
	α –Methyl – mannoside	+	+	-	-	+	+

2.4. *Listeria monocytogenes*'ın Epidemiyoloji

L. monocytogenes; toprakta, tatlı ve tuzlu suda, hayvan gübresinde, çürüyen bitkilerde ve bu ortamlarla ilişkili birçok çiğ gıdada doğal olarak bulunabilen ve her yerde üreyebilen Gram pozitif bir bakteridir (36). *L. monocytogenes'*in tipik fizyolojik özellikleri arasında orta ve yüksek NaCl seviyelerine (%28 a/h'ye kadar) karşı yüksek tolerans göstermesi ve donma sıcaklıklarına karşı dirençli olaması gelmektedir. Bundan dolayı, bu organizma soğutma uygulamaları sırasında üreyebilir ve yaşamını sürdürebilir, oysa ki diğer rakip organizmalarda bu özellikler bulunmazken *L. monocytogenes* nispeten düşük su aktivitesinde dahi hayatta kalabilir (37,38). *L. monocytogenes*, yüksek ölüm oranlarına sahip gıda kaynaklı önemli bir patojendir. İnsan ve hayvan konaklarını enfekte edebilen fakültatif hücre içi bir patojendir. Konak içine girdiğinde, bu bakteri fagositik ve fagositik olmayan hücreleri istila etme, hücre içinde çoğalma ve doğrudan hücreden hücreye yayılma, böylece hümoral bağışıklık tepkisinden kaçma kapasitesine sahiptir (39).

L. monocytogenes patojeninin bulaşması, genel olarak kontamine gıdaların tüketilmesiyle gerçekleşir (40). Bundan dolayı çoğu insan enfeksiyonu da gıda kaynaklıdır (41). Aynı zamanda hayvanlarda da, listeriozis ağırlıklı olarak gıda kaynaklı bir hastalıktır ve genellikle bozulmuş yüksek pH'ya sahip silaj veya otların tüketimi ile bulaşır. *L. monocytogenes* enfeksiyonları ile ilişkili hayvanlarda üç ana hastalık vardır; sinirsel olarak (dönme hastalığı) ensefalit ve menenjite, visseral olara sıklıkla septisemiye ve üreme ile ilgili ise abortus ve ölü doğumlara kürtajlar ve ölü doğumlara neden olur (42, 43).

Gıda kaynaklı birçok büyük Listeriozis salgını, insanlarda ve hayvanlarda paralellik gösterir. Kayıt altına alınmış ilk gıda kaynaklı Listeriozis salgını 1980 ile 1981 yılları arasında Kanada'da meydana gelmiş ve kontamine lahana salatasının yenmesinden kaynaklandığı bildirilmişir (44). 2008 ve 2015 yılları arasında Avrupa'da ölüm oranlarının %12,7 ile %20,5 arasında değiştiği 14.002 insan invaziv listeriozis vakaları rapor edilmiştir (45). 2017-2018 yıllarında Güney Afrika'da 200 ölümle sonuçlanan 900'den fazla vaka ve listeriozis salgını rapor edilmiştir. Salgına neden olan kaynağın "polony" adı verilen kontamine işlenmiş bir et ürünü olarak rapor edilmiştir (46).

2.5. *Listeria monocytogenes*'de Patogenez

Listeria, konakçıyı enfekte edip bağışıklık hücrelerinden kaçınarak ve bunun neticesinde de enfeksiyona neden olmak için benzersiz virulens faktörlerine sahiptir (8).

L. monocytogenes, bağırsak, kan beyin ve fetoplasental bariyeri geçme yeteneğine sahiptir. Gastrointestinal sistem istila edildiğinde, bakterinin konakçının epitel hücreleri içerisine (fagositoz yoluyla) alınmasıyla, ardından çoğalır ve bunun sonucunda enfeksiyon meydana gelir. *Listeria* tarafından konakçı hücrelerin enfekte edilmesinde, yapışma, istila, vakuollerin parçalanması, konak savunma mekanizmalarının çoğalması ve kaçmasıyla hücreden hücreye yayılmayı içeren çeşitli aşamalar yer alır. Etken hücre içi fagositik vakuole girdikten sonra, *L. monocytogenes* tarafından vakuolar membranı parçalamasına ve hücre içi öldürmeyi önlemesine izin veren listeriolizinleri ve fosfolipazları salgılar (47). Etkenin çeşitli yüzey proteinleri ve konak reseptörleri, yapışmanın ilk aşamasında yer alır (48). *Listeria,* fagositik ve fagositik olmayan her iki hücre çeşidini de enfekte edebilir. Fagositik hücreler enfekte edildiğinde tıpkı makrofajlar da olduğu gibi, bakteri girişi fagositoz yoluyla gerçekleşirken, fagositik olmayan hücrelerde ise hücre içerisine giriş invaziv *Listeria* proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (49)**.** Enfeksiyon, etkenin besin yoluyla alınması, solunması veya yara açıklarından vücuda alınmasıyla gerçekleşir. Ruminantlarda, Listeriozisin ensefalitik formu, organizmanın konjuktiva veya oral ve burun mukozasındaki küçük yaralanmalar yoluyla girdikten sonra gelişir ve daha sonra periferik sinirler boyunca beyne hareket eder. Bu çeşit enfeksiyon yolunun kuşlarda meydana gelip gelmediği henüz bilinmemektedir. Kümes hayvanlarındaki meydana gelen enfeksiyonlar ise yemlerin kümes yakınında bulunan hayvan çiftliklerindeki (örneğin, sığır veya domuz çiftlikleri) dışkı malzemeleri ile kirlenmesi ve bu dışkıların özellikle yağmur veya selden sonra kümes hayvanları için önemli bir enfeksiyon kaynağı olduğu bildirilmiştir. Gaga kesme ve aşılamadan kaynaklı yaralar etken için olası giriş bölgeleridir (50).

2.6. *Listeria monocytogenes*'de Klinik

Genel olarak enfeksiyonların çoğu subkliniktir. Bağışıklığı zayıflamış veya stresli hayvanlarda klinik enfeksiyonlar gerçekleşmektedir (51).

Hastalığın üç klinik formu vardır: nörolojik, septisemi ve abortustur. Nörolojik form (dönme hastalığı) genellikle bakterinin ağız boşluğundaki kesikler yoluyla vücuda

girdiği çiftlik hayvanlarında görülür. Etken trigeminal sinir yoluyla beyne taşınır (52,53). Bu nedenle enfeksiyonun neden olduğu lezyonların çoğu beyin sapında (esas olarak medulla oblongata) ve omurilikte lokalizedir (54).

Listeriozisden etkilenen hayvanların klinik belirtileri arasında depresyon, ateş, ve çevreye karşı ilgisizlik vardı. Hayvanlar genellikle kendilerini köşelere ayırır ve kafalarına baskı yaparlar. Sürekli tökezler ve daire çizerler (dönme hastalığı). Sarkık kulaklar, dudaklar ve genişlemiş burun delikleri gibi özellikleriyle bilinen yüz felci, enfekte hayvanlarda yaygın olarak görülmektedir (55). Hayvanlar genellikle kademeli felç geçirmekte ve hastalığın son aşamasında artık hayvanlar ayakta durmakta zorlanmaktadır. Bundan sonra ise hayvan yatar hale gelir ve genellikle koma ve ölüm ile neticelenir (51). Çiftlik hayvanlarının listerial enfeksiyonu, birçok çevresel ve hayvan faktöründen kaynaklanmaktadır. *L. monocytogenes* prevalansının geviş getiren hayvanların olduğu çiftliklerde mevsimsel olduğu ve çiftlik uygulamalarından etkilendiği belirtilmiş ve genel olarak küçükbaş hayvanlarda (koyun ve keçi) sığırlara göre daha yüksek bulunmuştur (56). Klinik vakalar en sık sığır, koyun ve keçilerde görülür. *L. monocytogenes'*in oluşturduğu enfeksiyona üçhastalık formu da gözlenebilirken, *L. ivanovii* en sık geviş getiren hayvanlarda üreme kayıplarıyla ilişkilendirilmiştir (57). Kuşlarda klinik hastalık nadirdir. Genç kuşlar hem enfeksiyona hem de klinik hastalık gelişimine daha duyarlıdır. Listeriozis kümes hayvanlarında tipik olarak septisemi veya ekstremitelerde parezi/felç, tortikolis, titreme, koordinasyon bozukluğu ve stupor/depresyon ile birlikte ensefalit ile kendini gösterir (58).

Listerik ensefalit teşhisi, klinik belirtilere, beyindeki histopatolojik lezyonlara ve ayrıca etkenin enfekte dokulardan izolasyonu ve identifikasyonuna dayanır (59).

2.7. *Listeria monocytogenes*'ın Virulens Genleri

L. monocytogenes'in *hly*A, *plc*A, *plc*B, *mpl*, *act*A, internalin A (*inl*A) ve internalin B (*inl*B) genlerinin enfeksiyon oluşumunda ve bakterinin yayılmasında önemli rolllere sahip olduğu anlaşılmıştır (60,61). *L. monocytogenes*'in virulens genleri Tablo 5'te belirtilmiştir.

Tablo 2.5. *L. monocytogenes*'in Virulens Genleri

Genin adı		**Genin fonksiyonu**
*prf*A	Positive regulatory factor	A Virulens genlerinin transkripsiyonu
*plc*A	Phosphatidylinositol specific phospholipase	C Vakuolden kaçış
*plc*B	Phosphatidylinositol specific phospholipase	C Hücreden hücreye geçiş
*hly*A	Listeriolysin O	Vakuolden kaçış
mpl	Zinc dependet metalloprotease	PLC'nin aktivasyonu
*act*A	Actin polymerizing protein	Hücreden hücreye geçiş
*inl*A	Internalin A	Hücreye penetrasyon
*inl*B	Internalin B	Hücreye penetrasyon
*inl*C	Internalin C	Hücreden hücreye geçiş
*inl*J	Internalin J	Enfeksiyon sonrası rol oynar

L. monocytogenes'in virulens genleri *prf*A (positive regulatory factor A) tarafından regule edilir (62). Adhezyon ve invazyonda rol oynayan virulens faktörleri içinde konakçı hücrelerin yapışması ve istilası ile ilgili farklı proteinler vardır. Internalin A (InlA) ve B (InlB), tanımlanan ilk proteinlerdi ve bunlar hücre yüzeyinde ifade edilir**.** Hücrede uygun bir reseptör olması durumunda *inl*A'nın varlığı epitel hücrelerine giriş için yeterlidir. InlA ve InlB proteinleri memeli hücrelerin invazyonunda *L. monocytogenes* için gereklidir. İnternalinler A ve B, invazyon için ana proteinlerdir (17).

On bir internalin geni (*inl*A, *inl*B, *inl*C, *inl*C2, *inl*D, *inl*E, *inl*F, *inl*G, *inl*H, *inl*I ve *inl*J) *L. monocytogenes*'de tespit edilmiştir. İnternalin genlerinin, hayvan modellerinde veya doku kültürlerinde *L. monocytogenes*'in virulensini arttırdığı bilinmektedir (65).

InlA

InlA 800 amino asitten oluşur, epitel hücrelerine girişi destekler ve bağırsak bariyerini geçmede önemli bir rol oynar. Transmembran glikoproteini olan E-cadherin

InlA'nın reseptörüdür ve E-cadherin ile InlA'nın arasındaki etkileşim türe özgüdür InlA, kovalent olarak bağlı bir 88 kDa yüzey proteinidir, hücre duvarına bağlanır ve ökaryotik reseptör Ecadherin'e bağlanır ve bakteriyi hücre içine girmeyi teşvik eder **(**66).

InlB

InlB, 630 amino asitten oluşur, hepatositler ve nonepiteliyal hücreler dahil birçok farklı hücre hattına girişi destekler. hepatosit büyüme faktörü (hgf) veya Met hedef hücreleride InlB için ana reseptör olarak kabul edilir (17).

PrfA

Bakteriyel transkripsiyon faktörlerinin Crp/Cap-Fnr ailesinin bir üyesi olan PrfA proteini, fakültatif hücre içi patojen *Listeria monocytogenes*'in temel virulens belirleyicilerinin ekspresyonunu kontrol eder . Listerial hücre içi enfeksiyon döngüsünün adımlarının her birine -konakçı hücre istilası, fagozomal kaçış, sitozolik replikasyon ve doğrudan hücreden hücreye yayılma - PrfA regulon ürünleri aracılık eder (67).

Listeriolysin O (LLO)

Listeriolysin O (LLO), *Listeria monocytogenes'*in fagositik vakuollerden kaçmasına ve konak hücre sitozolüne girmesine izin veren gözenek oluşturucu bir sitolizindir (68).

ActA

ActA, bağlanma ve hedef hücrelere giriş ile ilgili bir proteindir.

inlC

IrpA (Internalin ile ilgili protein A) olarakta bilinen, *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii*'nin virulensiyle bağlantılı 30 KDa'lık küçük bir salgı proteinidir (69) *inl*C, diğer virulensgenleriyle aynı transkripsiyonel aktivatöre sahiptir, sadece patojenik *Listeria* suşlarında bulunur ve bir *inl*C delesyon mutantı önemli ölçüde daha az virülenttir. InlC, reseptörlerle zayıf veya geçici ilişkilerde yer alabilir; bu durum InlC için neden henüz hiçbir reseptörün keşfedilmediğini açıklamaya yardımcı olabilir (63)**.** Internalin C (InlC), enfeksiyonun postintestinal aşamalarına katkıda bulunan bir virulens belirtecidir (70).

InlJ

Internalin J (InlJ), enfeksiyonun sonraki aşamalarında olduğu kadar bağırsak bariyerinden geçişte de doğrudan rol oynar (64). *inl*C ve *inlJ*'nin varlığı etkenin virulens potansiyeli artırır (25).

Bu çalışmada klinik ve gıda kaynaklı *L. monocytogenes* izolatlarında türe özgü listeriolizin O ve internalin A moleküllerini kodlayan *hyl*A ve *inl*A gen bölgeleri ile virulensi belirleyen internalin C ve internalin J moleküllerini kodlayan *inl*C ve *inl*J gen bölgelerinin saptanması ve bu 4 gen bölgesini birlikte saptayabilecek bir multipleks PCR protololünün oluşturulması amaçlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. *Listeria* İzolatları ve Referans Suşlar

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarına 2015-2018 yılları arasında Listeriozis teşhisi amacıyla getirilen sığır beyni, koyun beyni ve koyun atıklarından elde edilen 7 adet ve Tereyağı, Kaşar Peyniri, Kakaolu Yaş Pasta, Sade Dondurma, Krema, Kaymak, Eritme Peyniri, Çikolatalı Yaş Pasta, Kakaolu Dondurma, Yaş Pasta, Börek, Sosis, Kavurma, Köfte, Lahmacun, Hamburger, Pizza, Sucuk, Çiğ Et, Döner ve Fasulye' den izole edilen 21 adet *L. monocytogenes* izolatı olmak üzere toplam 28 adet *L. monocytogenes* izolatı kullanıldı (Tablo 6). Bu izolatlar %10 gliserinli Brucella buyyonu içeren kryotüplerde-84°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmektedir. Ana Bilim dalı kültür koleksiyonunda bulunan *L. monocytogenes* ATCC 7644, ATCC 19115 ve ATCC 13932 referans suşları, analizlerin gerçekleştirilmesinde pozitif kontrol suşlar olarak kullanıldı (Tablo 6). Bu izolatlar kullanılmadan önce, mini VIDAS (bioMérieux, France) ve MALDI-TOF MS (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) cihazlarında ayrıca test edilerek konfirmasyonları yapıldı.

Tablo 3.1. İncelenen izolat sayısı ve orijinleri

	İzolat orijini				Toplam
	Sığır beyni	Koyun beyni	Koyun atık	Gıda	
İzolat sayısı	1	1	5	21	28

3.1.2 Besiyerleri

L.monocytogenes izolatlarının canlandırılması ve DNA izolasyonları için Tryptic Soya Agar (TSA) (Merck) besiyeri kullanıldı. TSA besiyeri hazırlanma talimatına uygun olarak hazırlandıktan sonra, 121 °C de 15 dakika otoklav edilip steril tek kullanımlık plastik petri kutularına (90 mm çapında) döküldü. Daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.3 Moleküler Analiz Gereçleri

DNA İzolasyonu Gereçleri

1,5 ml'lik DNase/RNase free mikrosantrifüj tüpleri (Isolab), mikrosantrfüj cihazı (Thermo Scientific-microCL 21R) ve vorteks cihazı (Heidolph-Reax) kullanıldı. Kültürlerden elde edilen DNA'lar kullanılana kadar - 20°C muhafaza edildi.

PCR Amplifikasyonu Gereçleri

PCR amplifikasyonu Thermo Scientific-Arktik termal cycler cihazı ile yapıldı. Amplifikasyonda uygun ortamı sağlamak için Taq DNA Polimeraz Enzimi (Thermo Scientific), 25 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific), 10X Taq PCR Solüsyonu (Thermo Scientific), 10 mM dNTP mix (Fermentas) ve PCR grade su (Ambion) kullanıldı. PCR için Tablo 7'de gösterilen primerler Sentebiolab firmasına sentezlettirilerek kullanıldı. Her bir primer ana stoğu µl de 100 pmol nükleotid zincir içerecek şekilde sulandırıldı. PCR için revers ve forward ana stoklar kullanıldı.

Tablo 7: Multipleks PCR protokolünde araştırılan *L. monocytogenes* virulens genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primerler (25,71)

Hedef gen bölgesi	**Primer sekansı (5'-3')**	**Ürün büyüklüğü (bp)**	**Kaynak**
*inl*A	F: ACG AGT AAC GGG ACA AAT GC, R: CCC GAC AGT GGT GCT AGA TT)	800	Liu ve ark.(25)
*inl*C	F: AAT TCC CAC AGG ACA CAA CC R: CGG GAA TGC AAT TTT TCA CTA	517	Liu ve ark.(25)
*hyl*A	F: GAA TGT AAA CTT CGG CG R: GCC GTC GAT GAT TTG AAC TTC ATC	388	Meghdadi ve ark.(71)
*inl*J	F: TGT AAC CCC GCT ACA CAG TT R: AGC GGC TTG GCA GTC TAA TA	238	Liu ve ark.(25)

Elektroforez gereçleri

Elektroforez jel düzeneği ve elektroforez tankı amplifiye PCR ürünlerinin yürütülmesi için (Thermo Scientific- EC300XL) kullanıldı. Elektroforez jel düzeneğinde uygun ortam şartlarını sağlamak için 10X TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (Fermentas), distile su ile 1× olacak şekilde sulandırıldı. Agaroz jel (Biomax), farklı PCR protokollerine uygun olarak %1,5 oranında olacak şekilde hazırlandı. Oluşan bandların görüntülenmesi için agar içine 3 µl Ethidyum Bromid (Sigma) ilave edildi. PCR ürünleri jel görüntüleme sisteminde okutularak (Major Sience- USA) değerlendirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler Yöntemlerle *inl*A, *inl*C, *inl*J, *hly*A Gen Bölgelerinin Araştırılması

DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu izolatlardan kaynatma yöntemi elde edildi. Bu amaçla:

1- 500 µl streil distile su steril eppendorf tüplerine eklendi.

2- Ekim yapılan agarlarda oluşan tipik *L. monocytogenes* kolonisinden öze dolusu alındı.

3-Yeteri kadar karıştırıldıktan sonra 15 dk kaynatma işlemi uygulandı.

4- 13.000 devirde 10 dk santrfüjlendikten sonra kriyoviallerden 200 µl üst faz (supernatant) alınarak mikrosantrfüj tüplerine aktarıldı daha sonra -20ºC'de tekrar kullanılmak üzere saklandı.

3.2.2. *inl*A, *inl*C, *inl*J, *hly*A Gen Bölgelerinin Araştırılması İçin PCR Yöntemi

Gen bölgelerinin araştırılması için Liu ve ark.., (25)' nın kullandığı moleküler yöntem, reaksiyona giren kimyasalların miktarları çok az değiştirilerek ve hlyA primerlerinin ilavesiyle modifiye edilerek kullanıldı. Tek PCR ile bir seferde 4 gen bölgesinin araştırılabildiği bu modifiye multipleks PCR için, Taq DNA Polimeraz Enziminden 0,2 µl, 25 mM $MgCl_2$'den 3 µl, 10X Taq PCR solüsyonundan 2,5 µl, 10 mM dNTP mix'ten 0,5 µl, 100 pmol olarak sulandırılan primerlerden ise *inl*A için 0,2 µl, inlC için 0,15 µl, inlC için 0,1 µl ve *hly*A için 0.2 µl, revers ve forward ayrı ayrı olmak üzere kullanıldı. PCR suyundan 15,5 µl ve en son DNA templeytlerden 2 µl ilave

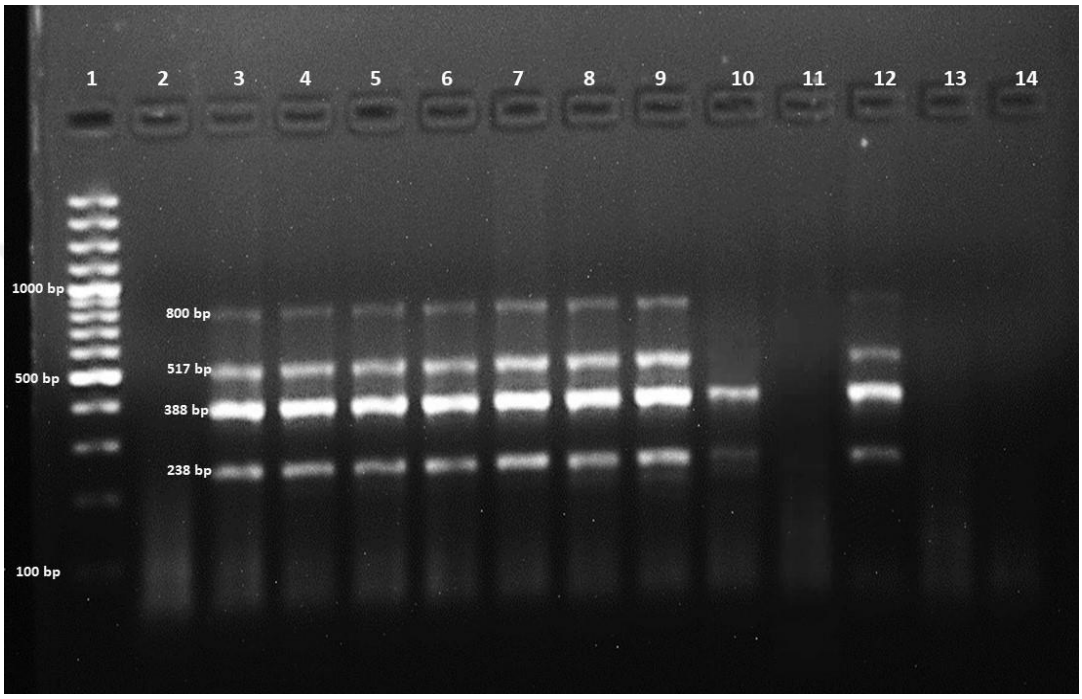
edilerek son hacim 25 µl olacak şekilde PCR karışımları hazırlandı. Termal döngü cihazında PCR koşulları, 94 °C'de 2 dakika ilk denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde, 94 °C'de 20 saniye denatürasyon, 55 °C'de 20 saniye annealing, 72 °C'de 50 saniye uzatma ve 72 °C'de 2 dakika son uzatma olarak uygulandı (25).

3.2.3. Elektroforez Yöntemi

Amplikonlar, %1,5'luk agaroz jelde 90 V akımda 60 dakika boyunca elektroforez ile yürütüldükten sonra sonuçlar jel görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

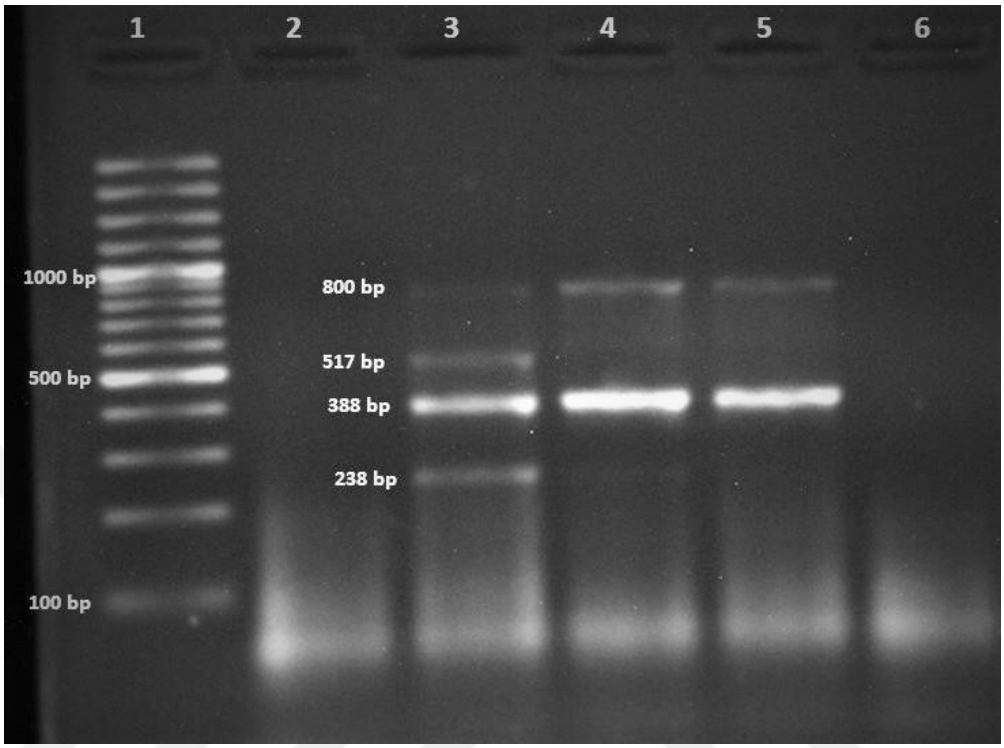
4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 28 adet *L. monocytogenes* izolatının tamamı VIDAS (bioMérieux, France) ve MALDI-TOF MS (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) yöntemleri ile *L. monocytogenes* olarak doğrulandı.



Şekil 4.1. *L. monocytogenes* virulens genlerinin (*inl*A-800 bp, *inl*C-517 bp, *hyl*A-388 bp, *inl*J-238 bp) multipleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agar jel (%1,5) elektroforez görüntüsü.

1: DNA Ladder (100 bp), 2: Negatif kontrol 3. Pozitif kontrol ATCC 19115, 4: Pozitif kontrol ATCC 19115, 5: Pozitif kontrol ATCC 7644, 6-9, 12: 4 gen bölgesi pozitif olan izolatlar, 10: *hyl*A ve *inl*C pozitif izolat (Koyun beyni), 11,13-14: 4 gen bölgesi negatif izolatlar



Şekil 4.2. *L. monocytogenes* virulens genlerinin (*inl*A-800 bp, *inl*C-517 bp, *hyl*A-388 bp, *inl*J-238 bp) multipleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agar jel (%1,5) elektroforez görüntüsü.

1: DNA Ladder (100 bp), 2: Negatif kontrol 3. Pozitif kontrol ATCC 19115, 4-5: *inl*A ve *hyl*A pozitif izolatlar (Krema ve kaymak orjinli), 6: 4 gen bölgesi negatif izolatlar

Araştırmada test edilen *L. monocytogenes* izolatlarının virulens genlerinin (*inl*A-800 bp, *inl*C-517 bp, *hyl*A-388 bp, *inl*J-238 bp) multipleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agar jel (%1,5) elektroforez ile elde edilen farklı bant görünümleri Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir.

Multipleks PCR ile araştırılan *L. monocytogenes* virulens genlerinin araştırmada incelenen izolatlara göre belirlenen dağılımı Tablo 8'de, incelenen *L. monocytogenes* izolatlarının orjinlerine göre *inl*A, *inl*C, *inl*J ve *hyl*A genlerinin varlığı yönünden pozitiflik oranları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 4.1. *L. monocytogenes* izolatlarında saptanan virulens gen varlığının izolatların orijinine göre dağılımı

Orijin		**Materyal**	***inl*A geni**	***inl*C geni**	***inl*J geni**	***hylA* geni**
Klinik	Klinik Örnekler	Sığır Beyni	+	+	+	+
		Koyun Beyni	-	-	+	+
		Koyun Abort	+	+	+	+
		Koyun Abort	+	+	+	+
		Koyun Abort	+	+	+	+
		Koyun Abort	+	+	+	+
		Koyun Abort	+	+	+	+
Gıda	Süt ürünleri	Tereyağı	+	+	+	+
		Kaşar Peyniri	+	+	+	+
		Kakaolu Yaş Pasta	+	+	+	+
		Sade Dondurma	-	-	-	-
		Krema	+	-	-	+
		Kaymak	+	-	-	+
		Eritme Peyniri	-	-	-	-
		Çikolatalu Yaş Pasta	+	+	+	+
		Kakaolu Dondurma	+	+	+	+
		Yaş Pasta	-	-	-	-
		Börek	+	+	+	+
	Et ve et ürünleri	Sosis	-	-	-	-
		Kavurma	+	+	+	+
		Köfte	-	-	+	+
		Lahmacun	+	+	+	+
		Hamburger	+	+	+	+
		Pizza	+	+	+	+
		Sucuk	+	+	+	+
		Çiğ Et	+	+	+	+
		Döner	-	-	+	+
	Diğer	Fasulye	+	+	+	+
	Pozitif Kontrol	ATCC 19115	+	+	+	+
		ATCC 13932	+	+	+	+
		ATCC 7644	+	+	+	+
	Negatif Kontrol		-	-	-	-

Tablo 4.2. *L. monocytogenes* izolatlarının orjinlerine göre *inl*A, *inl*C, *inl*J ve *hyl*A genlerinin varlığı yönünden pozitiflik oranları

	*inl*A geni pozitif izolat n (%)	*inl*C geni pozitif izolat n (%)	*inl*J geni pozitif izolat n (%)	*hyl*A geni pozitif izolat n (%)
Klinik orijinli izolat (n=7)	6 (85,7)	6 (85,7)	7 (100)	7 (100)
Gıda orijinli izolat (n=21)	14 (66,7)	16 (76,2)	15 (71,4)	17 (80,1)
Toplam izolat (n=28)	20 (71,4)	22 (78,6)	22 (78,6)	23 (85,7)

5. TARTIŞMA

"L. monocytogenes, gerek insanlar gerekse hayvanlarda menenjit, meningoensefalit, septisemi ve abortus oluşturan gıda kaynaklı önemli bir patojendir. *L. monocytogenes*'in birçok suşu doğal olarak virulent olmasına ve yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmasına rağmen, bazıları virulent değildir ve konakçılarda enfeksiyona neden olamaz. Etken, hem fagositik hem de fagositik olmayan hücre tiplerini enfekte edebilir, hücre içinde çoğalabilir ve doğrudan hücreden hücreye yayılabilir, böylece humoral immun yanıttan kaçabilir. Etkenin sahip olduğu internalin proteinleri patojenin istilasını ve virulensini artırabilir. Bu nedenle, virulens belirteçlerinin saptanması, virulent *L. monocytogenes* suşlarının avirulent suşlardan ön ayrımı için hızlı bir yoldur ve virulensle ilişkili anahtar genler için hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren PCR tabanlı pek çok araştırma yapılmıştır (70,72-77).

Furrer ve ark. (72) ile Blais ve ark. (73) virülensi belirleyen önemli bir faktör olan hemoliz yeteneğini belirlemek için *hyl*A genin varlığının *L. monocytogenes*'i tür düzeyinde belirlemek için başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Diğer tararftan *inl*A geninin *L. monocytogenes* için tür spesik olduğunu belirleyen birçok çalışma yapılmıştır (74,76,78).

Daha sonra yapılan çalışmalarda *inl*J geninin (32,77,79) ve *inl*C geninin (70) virulens özelliğini belirleyen spesifik gen bölgeleri olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada araştırılan gen bölgelerinden sadece ikisinin araştırıldığı çalışmada, Lomonaco ve ark. (80) peynir orijinli 53 *L. monocytogenes* izolatının tamamını *inl*A ve *inl*J genleri açısından pozitif bulurken, *inl*C genini ise 52 izolatta tespit etmiştir. Meghdadi ve ark. (71) 30 su kaynaklı, 15 de insan klinik örnekleden izole edilen 45 *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A ve *inl*A gen bölgelerini belirlemişlerdir. Yaptıkları RFLP sonucunda klinik örneklerin tamamı ile su kaynaklı örneklerin çoğununun aynı profilde olması nedeniyle, su kaynaklı bulaşmaların hastalık oluşturma riski açısından önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Liu ve ark. (25) *L. monocytogenes*'i tür düzeyinde identifiye etmek ve virulens özelliğini hızlı bir şekilde belirlemek için *inl*A, *inl*C ve *inl*J gen bölgelerini saptamak amacıyla bir multipleks PCR protokolü geliştirilmişlerdir. Araştırıcılar çalışmada insan, hayvan, gıda ve çevresel kaynaklı 36 adet *L. monocytogenes* izolatı yanında diğer 5 farklı *Listeria* türünden 22 izolat da test edilmiştir. Araştırıcılar 36 izolatın tamamında *inl*A genini saptarken, ruminant beyninden elde edilen 1, gıda kaynaklı 1 ve balık orijinli 4 izolatı *inl*C ve *inl*J genleri, tavuk orijinli 1 izolatı *inl*C geni, gıda ve insan kaynaklı 1'er izolatı da *inl*J genleri yönünden negatif olarak belirlemişlerdir, diğer izolatların ise *inl*C ve *inl*J genleri yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar izolatların hastalık oluşturma yeteneklerini etkenin farelere intraperitoneal enjeksiyon ile deneysel olarak araştırmışlardır. Sonuç olarak *inl*A, *inl*C ve *inl*J genlerini hedefleyen multipleks PCR tekniğinin, *L. monocytogenes'*in tür düzeyinde belirlenmesini ve virulensinin aynı anda doğrulanmasını kolaylaştıran bir yöntem olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Das ve ark. (69), virulensi belirleyen *inl*C geninin *L. ivanovi* türünde de bulunması nedeniyle virulens belirteci olarak kabul edilen *inl*C, *inl*J ve *hyl*A gen bölgelerinin saptanmasını hedefleyen bir multipleks PCR geliştirmeyi amaçladıkları çalışmada biyokimyasal özellikleri ve patojenite profilleri bilinen insan, hayvan ve gıda orijinli 23 *L. monocytogenes* ve 2 *L. ivanovii* izolatı kullanmışlardır. Multipleks PCR sonucunda patojen olanların çoğunda *inl*C gen bölgesi bulunması yanında, patojen olmayan bazı *L. monocytogenes* izolatlarında bu gen bölgesini tespit ettiklerini, bu nedenle daha çok virulens geninin araştırılarak profillerin buna göre değerlendirilmesinin daha doğru olacağını belirtmişlerdir. Pournajaf ve ark. (81) insan orijinli klinik materyallerden izole edilen 14, ve klinik orijinli olmayan örneklerden elde edilen 32 (süt ürünlerinden 9, işlenmiş et ürünlerinden 11, koyun, keçi ve sığır kaynaklı 12) izolatın virulans faktörlerinin multipleks PCR tekniği ile belirlenmesi amacıyla test etmişlerdir. Klinik örneklerden izole edilen suşların tamamında *inl*A geni bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırılan *inl*C gen bölgesi açısından 9 ve *inl*J gen bölgesi bakımından da 8 izolat pozitif bulunmuştur. Klinik orijinli olmayan izolatlarda ise yine tamamının *inl*A gen bölgesi taşıdığı, 27 izolatın *inl*C ve 25 izolatın da *inl*J açısından pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Sharma ve ark. (82) 457 çiğ süt örneğinden izole ettikleri toplam 5 adet *L. monocytogenes* izolatının tamamında *inl*A ve *inl*C gen bölgesini belirlerken hiç birisinde *inl*J geni saptamadıklarını rapor etmişlerdir. Arslan ve Özdemir (83) inceledikleri gıda orijinli 15 adet *L. monocytogenes* izolatının tamamını multipleks PCR ile *inl*A, *inl*C ve *inl*J gen

bölgeleri açısından pozitif bulmuşlardır. Samad ve ark. (84) farklı gıdalardan izole edilen 10 *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A ve *inl*A gen bölgelerini pozitif olarak saptarken, 7'sinde *inl*C ve 5'inde de *inl*J gen bölgesi belirlendiğini bildirmişlerdir.

Eldaly ve ark. (85) Mısır'da mezbahada kesilen hayvanlarda *L. monocytogenes'*in insidensini belirlemek için yaptıkları çalışmada 30'ar sığır, manda ve koyun örneği olmak üzere 90 örnekten 48 *L. monocytogenes* izole etmişlerdir. Araştırıcılar elde ettikleri izolatlarda *inl*A, *inl*C ve *inl*J gen varlığını multipleks bir PCR kullanarak ve yine *hyl*A gen varlığını belirledikleri PCR yöntemi ile test ederek izolatların tamamının patojen olduğunu bildirmişlerdir. Soni ve ark. (86), sebze ve toprak orijinli 30 izolatta 8 farklı virulens geninin varlığı açısından yaptıkları çalışmada *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genlerini de incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genlerinin varlığı açısından bakıldığında bütün izolatların bu 4 geni taşıdığı saptanmıştır. Wu ve ark. (61) hayvansal ve bitkisel gıda örneklerinden izole ettikleri 248 *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A varlığı saptarken, 247'sinde *inl*A, 246'sında *inl*J ve 243'ünde *inl*C genlerini tespit etmişlerdir. Gelbicova ve ark. (87) insan, gıda ve çevresel orijinli 181 *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genlerini belirlemişlerdir. Abdollahzadeh ve ark. (88) 7 klinik örnek, 4 balık orijinli izolatın tamamında *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genlerini saptarken 1 balık izolatında sadece *hyl*A ve *inl*A genlerini bulmuşlardır. Du ve ark. (89) 21 gıda orijinli *L. monocytogenes* izolatında 10 farklı virulens geni araştırdıkları çalışmada bütün izolatları bu çalışmada araştırılan *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genleri yönünden pozitif bulmuşlardır. Da Silva ve ark. (90) kasap ekipmanlarından izole edilen 74 izolatta 8 virulens genini araştırdıkları çalışmada, izolatlarda *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genleri açısından pozitiflik oranını %100 olarak rapor etmişlerdir. Heidarzadeh ve ark. (91) İran'da 2015-2017 yılları arasında vaginitis bulunan hamile kadınlardan alınan 400 vaginal svap örneğinden izole edilen 22 adet *L. monocytogenes*'in 21'ini *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J genleri yönünden pozitif bulduklarını ve bir izolatın ise sadece *hyl*A ve *inl*A genlerinin varlığı açısından pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Arslan ve Baytur (92) piliç eti ve kırmızı et örneklerinden izole ettikleri toplam 33 adet *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J gen bölgelerini de içeren 7 farklı virulens geninin var olduğunu saptamışlardır. Kotzamanids ve ark. (93) Yunanistan'da koyun ve keçi ensefalitis vakalarından izole edilen 31 klinik orijinli ve çiğ sütten izole edilen 26 gıda kaynaklı *L. monocytogenes* izolatının

tamamında, Basha ve ark. (94) balık ve balıkçılık bölgelerindeki çevresel örneklerden izole edilen 11 adet *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A, *inl*A, *inl*C ve *inl*J gen bölgelerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Matle ve ark. (95) Güney Afrika'da 2014-2016 yılları arasında et ve et ürünlerinden izole edilen 296 adet *L. monocytogenes* izolatının 135'inde *hyl*A, 96'sında *inl*A, 140'ında *inl*C ve 292'sinde *inl*J gen bölgesi belirlediklerini bildirmişlerdir. Çoban ve ark. (96) Türkiye'de tavuk mezbahaları ve satış noktalarından alınan 500 adet kanatlı eti örneğinden izole ettikleri 103 *L. monocytogenes* izolatının tamamında *hyl*A gen bölgesini tespit ettiklerini, 98 örnekte ise *inl*A, *inl*C ve *inl*J gen bölgesi belirlediklerini rapor etmişlerdir. Bu sonuçlara göre halk sağlığını korumak ve salgınları engellemek açısından gerekli koruyucu önlemlerin alınmasının gerektiği sonucuna varmışlardır. Osman ve ark. (97) Mısır'da gıda, insan, hayvan ve çevre orijinli 27 *L. monocytogenes* izolatında virulens özelliklerini belirlemek yaptıkları PCR sonucunda 7 izolatta *inl*A, 8 izolatta *inl*C, 9 izolatta inlJ ve 2 izolatta da *hyl*A genini saptayamadıklarını bildirmişlerdir. 12 izolatta ise her 4 gen varlığı yönünden pozitif olarak bulunmuştur.

Sunulan bu çalışmada incelenen 7 klinik orijinli *L. monocytogenes* izolatının 6'sında araştırılan *inl*A, *inl*C. *inl*J ve *hyl*A bölgelerinin tamamı saptanırken, koyun beyninden elde edilen 1 örnekte ise sadece *inl*J ve *hyl*A gen bölgeleri tespit edildi. Gıda kaynaklı izolatlara bakıldığında 21 izolatın 12'sinde araştırılan her dört gen bölgesinin var olduğu, 2 örneğin *inl*A ve *hyl*A gen bölgesini taşıdığı, 2 örneğin de *inl*J ve *hyl*A gen bölgelerine sahip olduğu belirlenirken, 4 örnekte araştırılan gen bölgelerinin hiç birisi tespit edilemedi. Her ne kadar bazı araştırıcılar (82, 83, 98, 85, 90, 92, 91, 98) inceledikleri klinik, gıda ya da çevresel orijinli *L. monoıcytogenes* izolatlarının tamamını bu çalışmada da araştırılan tüm genlerin (*inl*A, *inl*C. *inl*J ve *hyl*A) varlığı yönünden pozitif olarak belirlemiş olsalar da, Santana (99) ile Arslan ve Özdemir (96) analiz ettikleri gıda orijinli izolatların tamamında *inl*A, *inl*C ve *inl*J olmak üzere üç virulens geni tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Liu ve ark. (25) da 36 izolatın tamamını *inl*A yöünden pozitif bulurken, *inl*C genini 29, *inl*J genini de 28 izolatta saptamışlardır. Pournajaf ve ark. (87), 14 klinik, 32 gıda ve çevresel orijinli toplam 46 izolatın tamamında *inl*A geni, 36 izolatın *inl*C, 33 izolatın da *inl*J geni varlığı yönünden pozitif olarak belirlemişlerdir. Diğer taraftan incelenen izolatlarda *inl*A genin tespit edilme oranını Osman ve ark. (95) %26, Matle ve ark. (93) %32,4, Çoban ve ark. (94) %95, Wu ver ark (61) %99,6 olarak rapor

etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise incelenen 28 *L. monoıcytogenes* izolatının 22'sinde (%78,6) bakterinin konakçı hücresine girmesini sağlayan molekülün sentezini kodlayan *inl*A geni tespit edildi. Bu oran klinik orijinli izolatlarda %85,7, gıda orijinli örneklerde %66,7 olarak hesaplandı. İzolatların tamamı değerlendirildiğind eise bu oran %71,4 olarak belirlendi. Hücreye girişi sağlayan molekülü kodlayan *inl*A gen bölgesi *L. monocytogenes* türe özgü bir belirteç olarak kabul edilse de, bazı araştırmalar, *L. monocytogenes* izolatlarında *inl*A PMSC mutasyonlarının, düşük virulensten sorumlu olduğunu göstermiştir (98,100,101). Bu bölgede gerçekleşen mutasyonların incelenen bütün izolatlarda *inl*A geninin tespit edilmesine engel olabileceği düşünülmektedir.

Listeriolizin O proteininin üretimini kodlayan *hly*A geni, fosfolipaz A (plcA) ve B (plcB) ile birlikte primer ve sekonder fagozomun parçalanmasını teşvik ederek konak hücrede patojenin salınmasına ve çoğalmasına neden olur (25). Yine pek çok araştırıcı (82,83,98,85,90,92,91,99) inceledikleri *L. monocytogenes* izolatlarında araştırılan hlyA gen bölgesini %100 oranında saptamışlardır. Lomonaco ve ark. (80) peynir orijinli 53 izolatta *hly*A, *inl*C ve *inl*J genleri için pozitif izolat sayısını sırasıyla 53, 52 ve 53 olarak rapor etmişlerdir. Heiderzadeh ve ark. (89) inceledikleri 22 izolatta *inl*A ve *hyl*A genlerini %100 olarak saptarken, *inl*C ve *inl*J genleri için pozitiflik oranını %94,5 olarak bildirmişlerdir. Benzer olarak Samad ve ark. (97) *inl*A ve *hyl*A genleri için %100, *inl*C için %70 ve *inl*J için %50 pozitiflik saptamışlardır. Diğer taraftan *hyl*A gen pozitiflik oranlarını Matle ve ark. (93) %45,6, Das ve ark. (69) %64, Osman ve ark. (95) %92,5 olarak saptamışlardır. Bu çalışmada da klinik örneklerde %100 oranında *hyl*A geni saptanırken, gıda orijinli 21 izolattan 17'sinde (%80,1) pozitiflik belirlendi. İncelenen izolatların geneli değerlendirildiğinde ise pozitiflik oranı %85,7 olarak saptandı. Çalışmada elde edilen *hyl*A geni bulunma oranının araştırıcıların tespit ettikleri oranlara benzer olduğu değerlendirilmektedir.

Bakterinin sahip olduğu ve avirulent *L. monocytogenes* suşlarında bulunmadığı için etkenin virulens belirteçleri olarak kabul edilebilecek iki gen bölgesi *inl*C *ve inl*J bölgeleridir. Bazı araştırıcılar (82, 83, 86, 85, 90, 92, 91,99) *inl*C ve *inl*J genlerinin saptanma oranını %100 olarak bildirse de, sırasıyla Das ve ark. (98) %40, % 72, Liu ve ark. (25) %80,5, %77,8, Pornajaf ve ark.(87) %64, %57, Osman ve ark. (95) %70,3, %66,7, Matle ve ark. (93) %47,3, %98,7, Wu ve ark. (61) %98, %99,2 olarak bildirmişlerdir. Abdollahzadeh ve ark. (84) her iki gen için de %91,7 oranında pozitiflik

saptarken, Sharma ve ark. (88) 5 süt orijinli izolatta pozitiflik oranını *inl*C için %100, *inl*J için %0 olarak bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada *inl*C geni klinik orijinli izolatlarda %85,7, gıda orijinli olanlarda %76,2 genel değerlendirmede ise %78,6, *inl*J geni ise klinik izolatlarda %100, gıda izolatlarında %71,4, toplam değerlendirmede ise %78,6 oranında saptandı. Yine elde edilen bu pozitiflik oranları diğer araştırıcıların bildirdiği değerlere benzerdir.

Bu çalışmada incelenen gıda orijinli izolatların 4'ünde araştırılan *inl*A, *inl*C, *inl*J ve *hyl*A genlerinin hiç birisi tespit edilememiştir. Elde edilen bu sonuç Matle ve ark. (93) ile Osman ve ark. (95) da yapmış oldukları çalışmalarda araştırılan bu 4 gen bölgesinin hiç birisini bulamadıkları yönündeki bulguları ve Das ve ark. (98)'nın *inl*C, *inl*J ve *hyl*A varlığını araştırdığı bir çalışmada 25 izolatın 1'inde her 3 genin de negatif bulunduğu yönündeki bildirimleriyle uyumludur. Bunun nedeninin *L. monocytogenes*'in çok fazla sayıda virulens faktörüne sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde ikisi tür spesifik, ikisi de virulens belirteci olmak üzere 4 gen bölgesinin tespit edilmesi için tasarlanan multipleks PCR tekniğinin hızlı ve kullanılabilir bir teknik olduğu kanısına varıldı. Bu çalışmadaki bulgulara göre incelenen klinik orijinli 7 izolatın 6'sı araştırılan her 4 gen bölgesini taşıdığından, diğer bir izolat da tür spesifik *hyl*A ve virulens belirteci *inl*J gen bölgelerini taşıdığından, bu izolatların tamamı virulent *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Gıda orijinli izolatlar değerlendirildiğinde ise 13 izolat her 4 gen yönünden pozitif, 2 izolat *hyl*A ve *inl*J yönünden pozitif olarak değerlendirilmiş ve toplam 15 izolat virulent *L. monocytogenes* olarak belirlenmiştir. İncelen 2 izolat tür spesifik *inl*A ve *hyl*A genleri açısından pozitif, virulens belirteci *inl*C ve *inl*J genleri açısından negatif belirlendiği için avirulent *L. monocytogenes* olarak değerlendirilmiştir. İncelenen 4 adet izolatta multipleks PCR testi ile araştırılan 4 gen bölgesinden hiç birisi tespit edilemedi. Çalışmada kullanılan izolatların tamamı çalışmaya alınmadan önce mini VIDAS (bioMérieux, France) ve MALDI-TOF MS (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) cihazlarında test edilerek *L. monocytogenes* oldukları teyit edildi. Bu nedenle bu çalışmada dizayn edilen multipleks PCR ile araştırılan genlerin tamamı negatif olarak saptanan izolatlarda, diğer virulens genlerinin araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmda dizayn edilen multipleks PCR tekniği ile gerek klinik örneklerden izole edilen, gerekse de özellikle halk sağlığı açısından gıda kaynaklı bulaşma yolu nedeniyle büyük risk oluşturan *L. monocytogenes* izolatlarının virulent olup olmadığı çok kısa sürede belirlenebilecektir. Bu nedenle gerekli tedbirlerin alınması açısından büyük zaman kazandıracak bir multipleks PCR protokolü oluşturulduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z et al. *Listeria monocytogenes* Infection in Israel and Review of Cases Worldwide. Emerg. Infect. Dis. 2002 Mar;8(3):305.
2. Morrison HA, Lowe D, Robbins JR, Bakardjiev, AI. In Vivo Virulence Characterization of Pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* Infections. Infect. Immun. 2018 Aug;86(11).
3. Farber JM, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a Food-borne Pathogen. Microbiol Rev 1991 Sept;55:476-511.
4. Whitman KJ, Bono JL, Clawson ML, Loy JD, Bosilevac JM, Arthur TM et al. Genomic-based Identification of Environmental and Clinical *Listeria monocytogenes* Strains Associated with an Abortion Outbreak in Beef Heifers. BMC Vet. Res. 2020 Feb;16:1-13.
5. Fenlon DR, Wilson J, Donachie W. The Incidence and Level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial Processing. J. Appl. Microbiol. 1996 May;81(6):641-50.
6. Rijpens N, Vlaemynck G, Rossau R, Herman L, Jannes G. Unidentified *Listeria* Like Bacteria Isolated from Cheese. Lett. Appl. Microbiol. 1998 Jul;27:198-202.
7. Blatter S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Phenotypic and Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* Isolated from the Processing Environment and Products of a Sandwich-producing Plant. Food Control 2010 Nov;21(11):1519-23.
8. Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S, Malik SVS et al. Listeriozis in Animals, its Public Health Significance (Food-borne Zoonosis) and Advances in Diagnosis and Control: a Comprehensive review. Vet Q. 2015 Feb;35(4):211-35.
9. U. S. Food and Drug Administration 2018. Get the facts about *Listeria*! 2021 :https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-health-literacy/get-facts-about-listeria#animals)).

10. Scott, PR. 2014. Overview of Listeriozis. Merck Veterinary Manual. 2021:https://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/Listeriozis/overview-ofListeriozis?query=listeria).

11. Buchanan RL, Gorris LG, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A Review of *Listeria monocytogenes*: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-response, Ecology, and Risk Assessments. Food control 2017;75:1-13.

12. Matereke LT, Okoh AI. *Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A rev. Pathogens 2020 Jun;9(7):528.

13. Çiçek S. Gıda Kaynaklı Enfeksiyon ve İntoksikasyonlar 2021. http:// www.tarimkutuphanesi.com/Gida_kaynakli_enfeksiyon_ve_intoksikasyon lar_ Serpil_CICEK__Veteriner_Hekim_01432.html)

14. Doganay M. Listeriozis: Clinical Presentation FEMS Microbiol. Immunol. 2003 Apr;35(3):173-5.

15. Vardar-Ünlü G, Bakıcı MZ. Incidence of *Listeria spp.* from Raw Milk in Sivas. Turk. J. Med. Sci. 1998 Apr;28(4):389-92.

16. Gray ML, Killinger A. *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. Bacteriol. Rev. 1966 Jun;*30*(2):309-82.

17. Peiris WIP. *Listeria monocytogenes*, a Food-borne Pathogen. The thesis for a Master of Science Degree in the field of Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Upsala 2011.

18. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A Disease of Rabbits Characterised by a Large Mononuclear Leucocytosis, Caused by a Hitherto Undescribed Bacillus *Bacterium monocytogenes*. The Journal of Pathology and Bacteriology 1926;*29*(4):407-39.

19. Rocourt J, Buchrieser C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In: Ryser ET, Marth EH, Editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. 3rd ed. New York: CRC Pres; 2007. p.1-20.

20. Letchumanan V, Wong PC, Goh BH, Ming L. C, Pusparajah P, Wong SH. at al. A Review on the Characteristics, Taxanomy and Prevalence of *Listeria monocytogenes*. Progress In Microbes and Molecular Biology, 2008;1(1).

21. Parte AC. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2014. https://lpsn.dsmz.de/genus/listeria

22. Orsi RH, Wiedmann M. Characteristics and Distribution of *Listeria spp*. Including *Listeria* Species Newly Described Since 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006;100(12):5273-87)

23. Rocourt J. The Recognition and Identification of *Listeria* Species by Classical Methods. J. Infect 1988;2(4): 471-85.

24. Seeliger HPR, and Jones D. *Listeria* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 9th ed. USA; 1986.p.3001.

25. Schmid MW, Ng EY, Lampidis R, Emmerth M, Walcher M, Kreft J et al. Evolutionary History of the Genus *Listeria* and its Virulence Genes. Syst. Appl. Microbiol. 2005 Jan;28(1):1-18.

26. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJA multiplex PCR for Species- and Virulence-specific Determination of *Listeria monocytogenes.* J. Microbiol. Methods 2007 Aug;71(2):133-40.

27. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. J. Food Prot. 2002 Mar;65(11):1811-29.

28. Tamburro M, Ripabelli G, Fanelli I, Maria Grasso G, Lucia Sammarco M. Typing of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated in Italy by inlA Gene Characterization and Evaluation of a New Cost Effective Approach to Antisera Selection for Serotyping. J. Appl. Microbiol. 2010;108(5):1602-11.

29. Liu D. Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic *Listeria.* Microbiol. Insights 2013 Jul;6:59-69.

30. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the Isolation and Identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: FEMS Microbiol. Rev. 2005 Nov:29(5);851-75.

31. Liu D. Identification, Subtyping and Virulence Determination of *Listeria monocytogenes*, an Important Foodborne Pathogen. J. Med. Microbiol. 2006 Jun 1;55(6):645-59.

32. Liu D. *Listeria monocytogenes*: Comparative Interpretation of Mouse Virulence Assay, FEMS Microbiol. Lett. 2004 Apr;233:159-64.

33. Yavuz M, Korukluoğlu M. *Listeria monocytogenes*' in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2010;24(1):1-10.

34. Goudar V, Prasad N. A Critical Review on *Listeria monocytogenes*. IJIBCS, Volume 13, 2020;95-103

35. Seeliger HPR, Jones D. *Listeria*. In: Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, Holt JG (eds), Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. 1986;1235-45.

36. Jami M, Ghanbari M, Zunabovic M, Domig K. J, Kneifel W. *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products—a Rev. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2014 Aug;13(5):798-813.

37. Ghanbari M, Jami M, Domig K. J, Kneifel W. Seafood Biopreservation by Lactic Acid Bacteria–a Rev. LWT-Food Sci. Technol. 2013 Dec;54(2):315-24.

38. Zhu M, Du M, Cordray J, Ahn DU. Control of *Listeria monocytogenes* Contamination in Readyto Eat Meat Products. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2005 Mar;4(2):34-42.

39. Cabanes D, Dussurget O, Dehoux P, Cossart P. Auto, a Surface Associated Autolysin of *Listeria monocytogenes* Required for Entry into Eukaryotic cells and Virulence. Mol. Microbiol. 2004 Feb;51(6):1601-14.

40. Smith A. M, Tau NP, Smouse SL, Allam M, Ismail A, Ramalwa NR et al. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: Laboratory Activities and Experiences Associated with Whole-genome Sequencing Analysis of Isolates. Foodborne Pathogens and Disease 2019 Jul;16(7):524-30.

41. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP et al. *Listeria*-review of Epidemiology and Pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect 2007 Jan; 40(1): 4.

42. Velge P, Roche SM. Variability of *Listeria monocytogenes* Virulence: a Result of the Evolution between Saprophytism and Virulence?. Future Microbiol. 2010 Dec;5(12):1799-1821.

43. Schlech III, WF. Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection. Microbiol. Spectr. 2019 May;7(3):7-3.

44. Schlech III, WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane E et al. Epidemic Listeriozis—Evidence for Transmission by Food. N. Engl. J. *Med.*. 1983 Jan.;308(4):203-06.

45. Pang X, Wong C, Chung HJ, Yuk HG. Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* and its Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in a Simulated Salmon Processing Environment. Food Control 2019; 98:200-08.

46. National Institute for Communicable Diseases. 2017. Situation Report on Listeriozis Outbreak, South Africa 2017. 2017 Dec; 4:1–3 https://www.who.int/csr/don/02-May.-2018-Listeriozis-south-africa/en/

47. Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitão E, Sousa S, Cabanes D. The Arsenal of Virulence Factors Deployed by *Listeria monocytogenes* to Promote its Cell Infection Cycle. Virulence 2011 Sep;2(5):379-94.

48. Wampler JL, Kim KP, Jaradat Z, Bhunia AK. Heat Shock Protein 60 acts as a Receptor for the *Listeria* Adhesion Protein in Caco-2 cells. Infect. Immun. 2004 Feb;72(2):931-36.

49. Cossart P. Illuminating the Landscape of Host–pathogen Interactions with the Bacterium *Listeria monocytogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2011 Jun;108(49): 19484-491.

50. Abdul-Aziz T. Listeriozis in poultry. Merck Veterinary Manual. Accessed2020: https://www.merckvetmanual.com/poultry/Listeriozis/Listeriozis-in-poultry).

51. Al-Swailem AA, Al-Dubaib MA, Al-Ghamdi G, Al-Yamani A, Al-Naeem A. M, Al-Mejali A et al. Cerebral Listeriozis in a She-camel at Qassim Region, Central Saudi Arabia-a case report. Vet Arh 2010;80(4):539-47.

52. Antal EA, Løberg EM, Dietrichs E, Mæhlen J. Neuropathological findings in 9 cases of *Listeria monocytogenes* Brain Stem Encephalitis. Brain Pathol. 2005;15(3):187-91.

53. Dons L, Jin Y, Kristensson K, Rottenberg ME. Axonal transport of *Listeria monocytogenes* and Nerve-cell-induced Bacterial Killing. J. Neurosci. Res. 2007;85(12):2529-537.

54. Kumar H, Singh BB, Bal MS, Kaur K, Singh R, Sidhu PK et al. Pathological and Epidemiological Investigations into Listerial Encephalitis in Sheep. Small Rumin. Res. 2007 Mar. 23;71(1-3):293-97.

55. Atıl E. Hayvan, Gıda ve Çevre Örneklerinden *Listeria*'ların İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 2009.

56. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Grohn YT, Wiedmann, M. Evaluation of Farm Management Practices as Risk Factors for Clinical Listeriozis and Fecal Shedding of *Listeria monocytogenes* in Ruminants. J. Am. Vet. Med. 2005 Dec;227(11):1808-14.

57. Spickler A. R. (2019). Listeriozis. Accessed 2020: http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php).

58. Oie *Listeria monocytogenes* Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control Potential Impacts of Disease Agent Beyond Clinical Illness References.

59. Johnson GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA. Evaluation of Laboratory Tests for Confirming the Dagnosis of Encephalitic Listeriozis in Ruminants. J. Vet. Diagn. Invest. 1995 Apr;*7*(2):223-28.

60. Kuhn M, Goebel W. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes.* Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker 1999;97-130.

61. Wu S, Wu Q, Zhang J, Chen M, Yan ZA, Hu, H. *Listeria monocytogenes* Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China. PLoS One, 2015 Aug;10(8).

62. Kocaman N, Sarımehmetoğlu B. *Listeria monocytogenes* Soylarının Genetik ve Virülens Farklılıkları. Vet Hekim Der Derg 2017 Temmuz;89(1):97-107.

63. Ooi A, Hussain S, Seyedarabi A, Pickersgill, RW. Structure of Internalin C from *Listeria monocytogenes.* Acta Crystallographica Section D: Biol. Crystallogr. 2006 Jul;62(11):1287-93.

64. Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P, Bierne H. LPXTG protein InlJ, a Newly Identified Internalin Involved in *Listeria monocytogenes* Virulence. Infect. Immun. 2005 Oct;73(10):6912-22.

65. Jamali H, Thong K. L. Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* from Eeady-to-eat Foods. Food Control 2014 Oct;44:1-6

66. Lopes-Luz L, Mendonça M, Bernardes Fogaça M, Kipnis A, Bhunia AK, Bührer-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: Review of Pathogenesis and Virulence Determinants-targeted Immunological Assays. Crit. Rev. Microbiol. 2021 Apr;1-20.

67. Scortti M, Monzó H. J, Lacharme-Lora L, Lewis DA, Vázquez-Boland JA. The PrfA Virulence Regulon. *Microbes* Infect 2007 May;9(10):1196-207.

68. Nguyen BN, Portnoy DA. An inducible Cre-lox system to analyze the role of LLO in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Toxins 2020:*12*(1);38.

69. Das S, Malık S, Shrıvastava S, Gandhale P, Kumar S, Shoukat S et al. Virulence Marker Based Multiplex Pcr For Detecting Internalin C (InlC), Internalin J (InlJ) and Listeriolysin O (HlyA) Genes In *Listeria spp.* 2014 Apr.

70. Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C, Hess J, Lottspeich F, Goebel W et al. A new PrfA Regulated Gene of *Listeria monocytogenes* Encoding a Small, Secreted Protein Which Belongs to the Family of Internalins. Mol. Microbiol. 1996 Aug;21(4):823-37.

71. Meghdadi H, Khosravi AD, Sheikh AF, Alami A, Nassirabady N. Isolation and Characterization of *Listeria Monocytogenes* from Environmental and Clinical Sources by Culture and PCR-RFLP Methods. Iran J Microbiol. 2019 Feb;11(1):7.

72. Furrer B, Candrian U, Hoefelein C, Luethy J. Detection and Identification of *Listeria Monocytogenes* in Cooked Sausage Products and in Milk by in Vitro Amplification of Haemolysin Gene Fragments. J. Appl. Microbiol. 1991 Sept;70(5):372-79

73. Blais BW, Turner G, Sooknanan R, Malek LTA Nucleic Acid Sequence-Based Amplification System for Detection of *Listeria monocytogenes* Hlya Sequences. Appl. Environ. Microbiol. 1997 Jan;63(1):310-13.

74. Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouln E, Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into Cells is Mediated by Internalin, A Repeat Protein Reminiscent of Surface Antigens from Gram-Positive Cocci. Cell, 1991 Jun;65(7):1127-41.

75. Almeida PF, Almeida RCC. A PCR Protocol Using inlA Gene as a Target for Specific Detection of *Listeria monocytogenes.* Food Control 2000;11(2):97-101

76. Jung YS, Frank JF, Brackett RE, Chen J. Polymerase Chain Reaction Detection of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters Using Oligonucleotide Primers Targeting the Genes Encoding Internalin AB. J. Food Prot. 2003;66(2):237-41.

77. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 2004 Aug;42(8):3819-22.

78. Poyart C, Trieu-Cuot P, Berche P. The inlA Gene Required for Cell İnvasion is Conserved and Specific to *Listeria monocytogenes*. Microbiology 1996;142(1):173-80.

79. Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence M. L. Characterization of Virulent and Avirulent *Listeria monocytogenes* Strains by PCR Amplification of Putative Transcriptional Regulator and Internalin Genes. J. Med. Microbiol. 2003;52(12):1065-70.

80. Lomonaco S, Patti R, Knabel SJ, Civera T. Detection of Virulence-Associated Genes and Epidemic Clone Markers in *Listeria monocytogenes* Isolates from PDO Gorgonzola Cheese. Int. J. Food Microbiol. 2012;160(1):76-9.

81. Pournajaf A, Rajabnia R, Sedighi M, Kassani A, Moqarabzadeh V, Lotfollahi L et al. Prevalence, and Virulence Determination of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Clinical and Non-Clinical Samples by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2016; 49:624-27.

82. Sharma S, Sharma V, Dahiya DK, Khan A, Mathur M, Sharma A. Prevalence, Virulence Potential, and Antibiotic Susceptibility Profile of *Listeria monocytogenes* Isolated from Bovine Raw Milk Samples Obtained from Rajasthan, India. *Foodborne* Pathog. Dis. 2017;14(3):132-40.

83. Arslan S, Özdemir F. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria* Species and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from Retail Ready-To-Eat Foods. FEMS Microbiol. Lett. 2020;367(4):006.

84. Samad A, Asmat R, Naeem M, Ali H, Mustafa MZ, Abbas F et al. Isolation and İdentification of *Listeria monocytogenes* from Raw Vegetables and Meat Sold in Quetta, Pakistan. Pak. J. Zool. 2020;52(2):817-20.

85. Eldaly EA, El-Gaml AM, Marwa EE. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Some Slaughtered Animals at Dakahlia Province Slaughterhouses-Egypt 2013.

86. Soni DK, Singh M, Singh DV, Dubey SK. Virulence and Genotypic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from Vegetable and Soil Samples. BMC Microbiol. 2014;14(1):1-10.

87. Gelbicova T, Kolackova I, Karpiskova R. Genotyping and Virulence Factors of *Listeria monocytogenes* in Terms of Food Safety. J. Food Nutr. Res. (ISSN 1336-8672) 2015;54(1):79-84.

88. Abdollahzade E, Ojagh SM, Hossein, H, Irajian G, Ghaemi EA. Prevalence and Molecular Characterization of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* Isolated from Fish, Shrimp, And Cooked Ready-To-Eat (RTE) Aquatic Products İn Iran. LWT 2016; 73:205-11.

89. Du XJ, Zhang X, Wang XY, Su YL, Li P, Wang S. Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese Food Obtained from the Central Area of China. Food Control 2017; 74:9-16.

90. Da Silva DAL, Dias MR, Cossi MVC, De Castilho NPA, Camargo AC, Nero LA. Hygiene and Safety in the Meat Processing Environment from Butcher Shops: Microbiological Contamination and *Listeria monocytogenes.* J. Food Prot. 2016;79(4):628-34.

91. Heidarzadeh S, Dallal MMS, Pourmand MR, Pirjani R, Foroushani AR, Noori M et al. Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, Serotyping and Virulence Genes Screening of *Listeria monocytogenes* Strains at a Tertiary Care Hospital in Tehran, Iran. Iran. J. Microbiol. 2018;10(5):307.

92. Arslan S, Baytur S. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Listeria Species and Subtyping and Virulence Factors of *Listeria monocytogenes* from Retail Meat. J. Food Saf. 2019;39(1):12578.

93. Kotzamanidis C, Papadopoulos T, Vafeas G, Tsakos P, Giantzi V, Zdragas A. Characterization of *Listeria monocytogenes* from Encephalitis Cases of Small Ruminants from Different Geographical Regions, in Greece. J. Appl. Microbiol. 2019;126(5):1373-82.

94. Basha KA, Kumar NR, Das V, Reshmi K, Rao BM, Lalitha KV et al. Prevalence, Molecular Characterization, Genetic Heterogeneity and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Associated with Fish and Fishery Environment in Kerala, India. Lett. Appl. Microbiol. 2019;69(4):286-93.

95. Matle I, Mbatha KR, Lentsoane O, Magwedere K, Morey L, Madoroba E. Occurrence, Serotypes, and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Meat and Meat Products in South Africa Between 2014 and 2016. J. Food Saf. 2019;39(4):12629.

96. Coban A, Pennone V, Sudagidan M, Molva C, Jordan K, Aydin A. Prevalence, Virulence Characterization, and Genetic Relatedness of *Listeria monocytogenes*

Isolated from Chicken Retail Points and Poultry Slaughterhouses in Turkey. Braz. J. Microbiol. 2019;50(4):1063-73.

97. Osman KM, Kappell AD, Fox EM, Orabi A, Samir A. Prevalence, Pathogenicity, Virulence, Antibiotic Resistance, and Phylogenetic Analysis of Biofilm-Producing *Listeria monocytogenes* Isolated from Different Ecological Niches in Egypt: Food, Humans, Animals, and Environment. Pathogens 2020;9(1):5.

98. Prates DDF, Haubert L, De Fátima Würfel S, CavicchioliVQ, Nero LA, Da Silva WP. *Listeria monocytogenes* in Dairy Plants in Southern Brazil: Occurrence, Virulence Potential, and Genetic Diversity. J. Food Saf. 2019;39(6):12695.

99. Sant'Ana AS, Igarashi MC, Landgraf M, Destro MT, Franco BD. Prevalence, Populations and Pheno-And Genotypic Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-To-Eat Vegetables Marketed in São Paulo, Brazil. Int. J. Food Microbiol. 2012;155(1-2):1-9.

100. Nightingale KK, Ivy RA, Ho AJ, Fortes ED, Njaa BL, Peters RM et al. InlA Premature Stop Codons are Common Among *Listeria monocytogenes* Isolates from Foods and Yield Virulence-Attenuated Strains that Confer Protection Against Fully Virulent Strains. Appl. Environ. Microbiol. 2008 Nov;74(21):6570-83.

101. Manuel CS, Van Stelten A, Wiedmann M, Nightingale KK, Orsi RH. Prevalence and Distribution of *Listeria monocytogenes* inlA Alleles Prone to Phase Variation and inlA Alleles with Premature Stop Codon Mutations Among Human, Food, Animal, and Environmental Isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2015 Dec;81(24):8339-45.